

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA
TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO: INDUCCIÓN DE
GENES DE RESISTENCIA, PRODUCCIÓN DE FENOLES,
FLAVONOIDES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN
LECHUGA (*Lactuca sativa*)”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SAMUEL CASASOLA ZAMORA

DIRIGIDA POR

Dr. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA TOLERANCIA A
ESTRÉS ABIÓTICO; INDUCCIÓN DE GENES DE
RESISTENCIA, PRODUCCIÓN DE FENOLES, FLAVONOIDES Y
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LECHUGA (*Lactuca sativa*).”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SAMUEL CASASOLA ZAMORA

DIRIGIDA POR

DR. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ

SINODALES

Dr. RAMON GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ.
DIRECTOR

Dr. IRINEO TORRES PACHECO.
SINODAL

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ.
SINODAL

Dra. ANA ANGÉLICA FERREGRINO PÉREZ.
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Estrés	3
II.2 Estrés biótico	3
II.3 Estrés abiótico	3
II.4 Estrés por déficit de agua, sequía	4
II.5 Estrés por salinidad	4
II.6 Respuesta a estrés	5
II.7 Especies reactivas de oxígeno	5
II.8 Mecanismos de respuesta a estrés	6
II.9 Mecanismo no enzimático	7
II.10 Mecanismo enzimático	7
II.11 Metabolitos secundarios	8
II.12 Síntesis de metabolitos secundarios	8
II.13 Inducción de metabolitos secundarios	9
II.14 Función del ácido salicílico en estrés	11
II.15 Elicitores y factores inductores de metabolitos	12
II.16 Mecanismo de acción de elicitores	12
II.17 Clasificación y función de metabolitos secundarios	13
II.18 Aplicación de metabolitos secundarios	13
II.19 Modelo de estudio: Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	14
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	17
IV.1 General	17

IV.2 Específicos	17
V. METODOLOGÍA	18
V.1 Materiales, reactivos y equipos	18
V.1.1 Material Biológico	18
V.1.2 Materiales	18
V.1.3 Equipos y software	18
V.1.4 Reactivos	19
V.2 Métodos	20
V.2.1 Germinación y siembra de lechugas	20
V.2.2 Tratamiento estrés abiótico	20
V.2.3 Determinación de características agronómicas	21
V.2.4 Muestreo	21
V.2.5 Extracción metanólica de fenoles y flavonoides	21
V.2.6 Determinación de Fenoles	21
V.2.7 Determinación de flavonoides	22
V.2.8 Determinación de capacidad antioxidante	22
V.2.9 Determinación de prolina	23
V.2.10 Diseño de oligonucleótidos para PCR	23
V.2.11 RT-PCR	24
V.3 Diseño experimental	25
VI. RESULTADOS	29
VI.1 Germinación de plantas de lechuga.	29
VI.2 Cambios en parámetros agronómicos.	30
VI.3 Análisis de porcentaje de agua en tejido fresco y seco.	32
VI.4 Análisis del efecto de los tratamientos de sequía moderada y severa.	33
VI.5 Determinación de fenoles	35
VI.6 Determinación de flavonoides	37
VI.7 Determinación de prolina	38
VI.8 10 Contenido de clorofila	38
VI.9 Determinación de capacidad antioxidante	39

VI. Evaluación de expresión de genes de resistencia.	40
VII DISCUSIÓN	45
VII.1 La aspersion foliar de ácido salicílico 0.1mM aumenta la turgencia celular en condiciones estresantes para la planta	45
VII.2 Efecto de la aspersion de ácido salicílico en condiciones de salinidad.	46
VII.3 Efecto del ácido salicílico en la acumulación de compuestos osmoprotectores	47
VII.4 Efecto del ácido salicílico en la síntesis de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.	48
VII.5. Efecto del ácido salicílico en la inducción de genes de resistencia a estrés	49
VIII CONCLUSIÓN	50
VII. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de compuestos fenólicos. Estos compuestos se sintetizan por medios del metabolismo fenilpropanoide y participan en algunas reacciones de defensa.	12
2	Descripción de los tratamientos y los grupos establecidos para el estudio.	28
3	Resumen de datos peso fresco, seco y proporción de biomasa.	32
4	Resumen de datos sobre capacidad antioxidante	42
5	Oligonucleótidos usados para la reacción en cadena de la polimerasa	43
6	Expresión de genes de resistencia. Cuantificación de los resultados de la PCR.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de compuestos fenólicos. Estos compuestos se sintetizan por medios del metabolismo fenilpropanoide y participan en algunas reacciones de defensa.	15
2	Germinación y trasplante de plantas de lechuga. (<i>Lactuca sativa</i>)	29
3	Gráficas de parámetros agronómicos: altura, número de hojas, peso fresco y peso seco.	31
4	Gráficas de composición del peso fresco.	33
5	Estado de las plantas al día 0 de tratamientos	34
6	Periodo de recuperación de la sequía.	35
7	Contenido de fenoles	36
8	Contenido de flavonoides	37
9	Capacidad antioxidante	38
10	Contenido de prolina y clorofila	41
11	Condiciones de temperatura y fragmentos esperados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	42
12	Electroforesis de RNA en gel de agarosa desnaturalizante	43
13	RT-PCR: PAL, CAT, SOD	44

RESUMEN

A diferencia de los animales, las plantas no son capaces de moverse para evitar condiciones desfavorables para su desarrollo, por lo que han desarrollado diferentes mecanismos para responder a estas condiciones estresantes. Se considera estrés a los cambios en las condiciones de crecimiento de las plantas que tiene como resultado pérdida de la homeostasis metabólica. Una planta sometida a estrés no letal, puede tolerar e incluso volverse resistentes al factor de estrés. La tolerancia a estrés se consigue por medio de la restitución de la homeostasis metabólica primaria, lograda por medio del metabolismo secundario y otras reacciones de defensa de las plantas. El metabolismo secundario se induce por condiciones desfavorables bióticas o abióticas así como también por moléculas químicas denominadas elicitores e inicia la síntesis de metabolitos de resistencia, en su mayoría polifenoles. Este trabajo se centra en evaluar la inducción del metabolismo secundario, en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) sometidas a distintos tipos de estrés abiótico, por elicitores así como correlacionar la expresión de genes de resistencia con la síntesis de fenoles y flavonoides por medio de técnicas bioquímicas y moleculares. Al relacionar la respuesta bioquímica con la expresión de genes que participan en el metabolismo secundario en plantas sometidas a estrés abiótico tratadas y no tratadas con ácido salicílico fue evidente que al tipo de respuesta depende de la combinación entre el tipo de estrés y el ácido salicílico. En plantas sometidas a sequía, se presentó un efecto menor del estrés en las plantas tratadas y un periodo de recuperación a la sequía más corto, las plantas sometidas a salinidad y SA mostraron señales de senescencia y baja inducción del metabolismo secundario. El entender los mecanismos de respuesta permitirá desarrollar procesos productivos enfocados a desarrollar una agricultura sustentable.

I. INTRODUCCIÓN

Desde el origen del hombre, la dieta se ha basado principalmente en el consumo de vegetales y hortalizas. Las hortalizas son de gran importancia cultural, nutricional y económica. En México, se destinan 20,031 millones de hectáreas para cultivos, repartidas en forrajes, oleaginosas, frutas, granos y hortalizas. Del total de hectáreas sembradas solamente el 3% se utilizan para producción de hortaliza, sin embargo aportan 16% al producto interno bruto nacional. La lechuga es una planta herbácea anual, de raíz corta y poco profunda, presenta inflorescencia amarilla, su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 16 y 25°C. Es originaria de la India desde donde se distribuyó al resto del mundo, ha estado presente en la dieta de numerosas culturas generalmente como base de ensaladas. Se han identificado componentes nutricionales como betacaroteno, ácidos ascórbico, aspártico y cítrico, vitaminas A, C, E, B1, B2, B3, entre otros nutrientes. En 2010, se produjeron en México un promedio de 315,800 toneladas de lechuga.

A diferencia de los animales, las plantas no se pueden mover para evitar situaciones de estrés, por lo que han desarrollado mecanismos moleculares para responder a él. El estrés se define como situaciones que alteran el equilibrio fisiológico de un organismo. En las plantas se pueden presentar 2 tipos de estrés, estrés biótico ocasionado por la interacción con fitopatógenos, y estrés abiótico provocado por factores físicos o químicos, como salinidad, sequía, exceso de agua, presión, metales pesados, radiación UV, variaciones de temperatura, entre otros. Cuando una planta sufre condiciones de estrés, se alteran procesos fisiológicos como respiración y fotosíntesis generando altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales supero óxido (O_2^-) e hidroxilo (OH), alterando el equilibrio fisiológico de las plantas. Las plantas responden de manera enzimática (SOD, CAT, POX) o no enzimática (glutación y ácido ascórbico) para disminuir el estrés oxidativo. El mecanismo de defensa contra estrés abiótico se basa en la síntesis de enzimas y compuestos antioxidantes que inactivan los compuestos oxidantes. Las plantas pueden sufrir estrés letal, ocasionado por altos niveles de estrés que llevan a la

planta a un estado senescente y posteriormente a la muerte o un estrés subletal, en donde la planta desarrolla resistencia o adaptación al estrés. Este proceso de adaptación o resistencia ocurre por la capacidad de la planta de reaccionar frente el estrés y esta mediado por los cambios fisiológicos y moleculares que ocurren cuando este se presenta.

Estos cambios moleculares se encuentran regulados a nivel génico. En condiciones no óptimas para la planta, se activan factores de transcripción que inducen la síntesis de enzimas involucradas en rutas metabólicas que permiten la síntesis de compuestos secundarios que presentan actividad de defensa. Entre estas rutas, se encuentra la ruta del ácido shikímico. Uno de los productos de esta vía es el aminoácido fenilalanina, a partir de la cual se sintetizan distintos fenoles y flavonoides. Este proceso se inicia con la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) que convierte la fenilalanina en ácido cinámico, iniciando así el metabolismo de los fenilpropanoides. Los fenoles y flavonoides son metabolitos secundarios producto del metabolismo fenilpropanoide de las plantas. Son utilizados para distintas funciones fisiológicas como defensa de la planta, atracción de insectos polinizadores, defensa ante herbívoros, protección contra luz UV y presentan una alta capacidad antioxidante.

Como mecanismos de regulación de las respuesta a estrés, las plantas han desarrollado sistemas químicos inducibles. Los mecanismos de defensa de la planta se activan por moléculas sintetizadas en condiciones de estrés. Entre las moléculas inductoras de defensa destacan ácido salicílico (SA), jasmonato (JA), etileno (ET) y ácido absísico (ABA). De manera general, estas moléculas activan cascadas de señalización que tienen como resultado la activación de factores de transcripción y la activación de genes de resistencia a estrés, estas moléculas inductoras de respuestas de defensa se denominan elicitores. Entender el metabolismo secundario de las plantas así como su regulación a nivel molecular y genético, permitirá sentar las bases para desarrollar sistemas de producción agrícola sustentable, reduciendo el uso de agroquímicos, de igual forma permitirá elevar la calidad nutricional y funcional de productos agrícolas.

II. ANTECEDENTES

II.1 Estrés

El estrés se define de manera general como cambios en las condiciones de crecimiento de la planta que tienen como resultado pérdida o alteraciones en la homeostasis metabólica. Las plantas son susceptibles a sufrir estrés por factores bióticos y abióticos (Shulaev y col., 2008).

II.2 Estrés biótico

El estrés biótico es causado por patógenos como son virus, bacterias, hongos, helmintos y fitoplasmas, que afectan el rendimiento de la planta al alterar las funciones fisiológicas normales (Agris, 2005). Una planta puede sufrir estrés biótico cuando se conjugan 3 factores, que son clima adecuado para el patógeno y para la planta, huésped susceptible a infección y un patógeno específico. Estos factores se denominan triángulo de la enfermedad (Scholthof, 2007), en algunas ocasiones no se cumple completamente el triángulo pero la planta induce mecanismos de respuesta, como es en el caso de la resistencia sistémica inducida, potenciada por interacciones con rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) (Vallad y Goodman, 2004; Mejía-Teniente y col., 2010).

II.3 Estrés abiótico

Todas las plantas tienen la habilidad de adaptarse a variaciones ambientales circadianas o estacionales. Estas variaciones ambientales controlan el ciclo de vida de las plantas (floración, germinación, senescencia, entre otras). Aparte de estas variaciones circadianas y estacionales pueden ocurrir disturbios ambiental imprevistos por la planta, resultando en condiciones que alteran el equilibrio fisiológico (Groover y col, 2001). Este desequilibrio fisiológico se denomina estrés por factores abióticos y ocurre cuando las plantas se enfrentan a variaciones físicas o químicas, producto de cambios ambientales, contaminación, erosión del suelo, variaciones de temperatura, radiación UV, sequía, presión, salinidad, entre

otros. (Grover y col, 2001). La alteración las funciones metabólicas resulta en la pérdida de homeostasis, por lo que las plantas adaptan rutas metabólicas, para recuperar el equilibrio fisiológico (Shulaev y col., 2008).

II.4 Estrés por déficit de agua, sequía

El agua es un compuesto de vital importancia para todos los organismos vivos. La falta de agua afecta las funciones fisiológicas normales, reduce el crecimiento y desarrollo de las plantas (Shinozaki y Yamaguchi 2006). Las plantas han evolucionado mecanismos que les permiten sobrevivir al déficit de agua. Se pueden inducir mecanismos de escape de la sequía o de resistencia, dividiendo resistencia en: tolerancia y evasión a sequía. El objetivo de estos mecanismos es mantener el potencial de agua en los tejidos (Harb y col., 2010).

Escape de la sequía se define como la habilidad de las plantas para completar su ciclo de vida antes de sufrir daños severos debidos al estrés, mientras que la evasión de la sequía ocurre cuando las plantas pueden mantener el potencial de agua en los tejidos, logrando esto al mejorar la absorción de agua por las raíces y disminuir la perdida por evaporación (reducción de la transpiración y reducción de superficie de evaporación, área de hoja) (Harb y col., 2010).

Por otro lado, la tolerancia a sequía se define como la habilidad para sobrevivir a déficit de agua con bajo potencial de agua en los tejidos, esto ocurre por la acumulación de compuestos que aumentan la turgencia y reducen la evaporación (Shinosaki y Yamaguchi, 2006; Harb y col, 2010).

II.5 Estrés por salinidad

La salinidad es la condición de la tierra caracterizada por tener altas concentraciones de sales solubles. Un suelo se considera salino cuando tiene una conductividad eléctrica (EC) mayor o igual a 4 ds/m (deciSiemens por metro), que es equivalente a una concentración 40 mM de cloruro de sodio (NaCl) que genera un aumento en la presión osmótica de 0.2 MPa (Munns y Tester, 2008).

El estrés por salinidad, se relaciona directamente con la sequía debido a que concentraciones de sales en el suelo dificultan la absorción de agua por las raíces, afectando las funciones fisiológicas normales. Sin embargo, en situaciones de estrés salino prolongado se acumulan concentraciones tóxicas de sales en los tejidos (Munns y tester, 2008; Ahmed y col, 2010).

II.6 Respuesta a estrés

Cuando una planta sufre factores adversos, se desencadenan una serie de respuestas bioquímicas enfocadas a ajustar las rutas metabólicas para alcanzar un nuevo estado de homeostasis, proceso conocido como aclimatación (Mittler, 2006). En una primera etapa, la planta siente los cambios en las condiciones externas y desencadena una red de cascadas de señalización; seguida por la transducción de señales que induce la síntesis de proteínas y compuestos para recuperar el equilibrio. Se producen principalmente tres tipos de compuestos: componentes involucrados en la aclimatación (como antioxidantes y osmoprotectores), subproductos de estrés que aparecen en las células debido a la interrupción de la homeostasis (especies reactivas de oxígeno y algunos antioxidantes) y finalmente moléculas involucradas en la transducción de señales para mediar la aclimatación, que pueden ser moléculas recién sintetizadas o compuestos que se liberan de forma conjugada, como el ácido salicílico (SA) (Shualeyv y col, 2008).

II.7 Especies reactivas de oxígeno

El metabolismo aeróbico de las plantas, respiración y fotosíntesis, producen de manera inherente subproductos como especies reactivas de oxígeno (ROS) en las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. Cada vez existe más evidencia que indica que los ROS también actúan como moléculas de señalización involucradas en la regulación del desarrollo de la planta y en las reacciones de defensa contra patógenos (Apel y Hirt, 2004). En altas concentraciones los ROS causan daño oxidativo a la planta. En condiciones de equilibrio los ROS son degradados por diferentes componentes antioxidativos de defensa (Grene, 2002, Foyer y Noctor, 2005; Liu y col, 2010).

El equilibrio entre producción y degradación de ROS puede ser alterado por diversos tipos de estrés. Como resultado de este desequilibrio, los niveles intracelulares de ROS se incrementan rápidamente, proceso denominado “explosión oxidativa” (oxidative burst) (Apostol y col, 1989; Foyer y Noctor, 2005). El incremento en las concentraciones de ROS ocurre por diferentes mecanismos y es inducido por señales específicas. En estrés biótico, ocurre un incremento de ROS en el sitio de invasión, ocasionada por la interacción planta-patógeno. Esta interacción induce la síntesis de compuestos involucrados en la generación de ROS, desencadenando una reacción hipersensible en la planta que puede inducir muerte celular programada como mecanismo de defensa (Gangl y Jones, 2001, Mur y col., 2008).

En contraste, en situaciones de estrés abiótico se alteran funciones fisiológicas de la planta como fotosíntesis y respiración que resultan en la generación de ROS. Las especies reactivas de oxígeno se producen continuamente durante el transporte de electrones de la fotosíntesis y son simultáneamente removidas por reducción y asimilación. Existen tres procesos que consumen oxígeno altamente relacionados con la fotosíntesis, estos son: la reacción oxigenasa de la ribulosa-1,5 bifosfato caroxilasa oxigenasa (RUBISCO), la reducción directa de oxígeno molecular por el transporte de electrones en el fotosistema I y la cloro-respiración. (Keller y col, 1998, Zsigmond y col, 2008)). Al verse afectados estos procesos por variaciones ambientales, se altera el equilibrio entre producción y remoción de especies reactivas generando altas concentraciones de ROS tóxicas para la planta, por lo que han tenido que desarrollar mecanismos especializados para responder a esto (Miller y col, 2007).

Una planta reacciona de manera diferente dependiendo del nivel de estrés al que es sometida. En caso de estrés severo y prolongado, sufre estrés letal, la planta entra en estado senescente y posteriormente muere. Si el estrés es moderado o subletal, la planta se puede adaptar o volverse resistente (Grover y col, 2001).

II.8 Mecanismos de respuesta a estrés

Los ROS se caracterizan por causar daño oxidativo a proteínas, lípidos y DNA, por lo que las plantas han diseñado sistemas enzimáticos y no enzimáticos para eliminarlos. En presencia de iones de metales de transición, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede ser reducido a radical hidroxilo (OH^\cdot) por acción del ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El peróxido de hidrógeno y el ion superóxido son menos reactivos que el radical hidroxilo OH^\cdot (Asada, 2006; Del Río y col, 2006). El riesgo para una célula que produzca estos intermediarios radica en que las interacciones entre ellos pueden llevar a la formación del radical hidroxilo, altamente reactivo y dañino para la célula. Al no existir un mecanismo para degradar al radical hidroxilo, la manera de evitar su formación consiste en regular los intermediarios que lo forman. Para esta finalidad existen 2 mecanismos fundamentales, el mecanismo enzimático y el no enzimático (Apel y Hirt, 2004).

II.9 Mecanismo no enzimático

El mecanismo antioxidante no enzimático se compone de los amortiguadores celulares glutatión y ascorbato, así como también tocoferoles, flavonoides, alcaloides y carotenoides. Cuando el glutatión es oxidado por la acción de las ROS, se forma el compuesto glutatión oxidado, mientras que la oxidación de ascorbato produce monodehidroascorbato y dehidroascorbato. A través del ciclo glutatión-ascorbato, las formas oxidadas de estos compuestos son reducidas a su estado original (Vanaker y col., 2000).

En situaciones de estrés abiótico se incrementan los niveles de enzimas para la biosíntesis de glutatión y ascorbato. Para que este mecanismo sea eficiente, se necesita la participación de enzimas específicas que mantengan proporciones mayores de glutatión y ascorbato reducido que las concentraciones de ROS. Estas enzimas son glutatión reductasa, monohidroascorbato reductasa y dehidroascorbato reductasa, usando NADPH como poder reductor (Apel y Hirt, 2004; Mhamdi, 2010).

II.10 Mecanismo enzimático

El mecanismo enzimático se compone de enzimas como Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Ascorbato peroxidasa (APX) y Glutathion Peroxidasa (GPX). La enzima SOD convierte al ión superóxido en peróxido de hidrógeno, haciendo que sea susceptible a la detoxificación por acción de catalasa, ascorbato y glutathion peroxidasa. Estas últimas 2 enzimas requieren de la regeneración del ciclo ascorbato-glutathion para detoxificar el peróxido de hidrógeno (Asada, 2006).

Las reacciones de defensa en las plantas varían dependiendo del tipo de estrés al que es sometida. En estrés biótico, la planta aumenta la síntesis de ROS vía oxidasas de NADPH, peroxidasa de membrana y amino oxidasas. En estas condiciones aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno, ya sea de manera directa, por interrupción de funciones fisiológicas en los cloroplastos y las mitocondrias ó por acción de SOD (Navrot, 2006), esto ocurre porque el peróxido de hidrógeno puede desempeñar una función doble, en bajas concentraciones se puede difundir hacia otras células induciendo reacciones de adaptación a estrés en toda la planta (Mur y col., 2008), mientras que altas concentraciones llevan a muerte celular programada. La concentración de peróxido de hidrógeno favorable en los tejidos se logra por la acción de enzimas detoxificadoras como catalasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa, glutathion reductasa y monohidroxiascorbato reductasa (Gill y Tuteja, 2010).

II.11 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos que no participan de manera directa en los procesos celulares primarios, como división celular, crecimiento, fotosíntesis y respiración pero que se asocian a diferentes funciones de la planta, entre ellas a reacciones de defensa (Hyun y col., 2009).

Los metabolitos secundarios son producto del metabolismo secundario, término acuñado en 1891 por el ganador del premio nobel doctor Albertch Kossel, que resalta la diferencia entre el metabolismo primario, presente en todas las células

vivas capaces de dividirse, del metabolismo secundario, presente incidentalmente y no estrictamente necesario para la vida celular (Karlovsky, 2008).

Los metabolitos secundarios, desempeñan un papel muy importante en la adaptación de las plantas a condiciones ambientales estresantes, ya que presentan funciones de defensa variadas, abarcando desde toxicidad y resistencia a luz UV hasta transducción de señales. Las distintas funciones de los metabolitos secundarios se deben a las interacciones moleculares entre ellos y otros compuestos, mediadas por la composición química que presentan Cuadro 1 (Edreva y col., 2008).

II.12 Síntesis de metabolitos secundarios.

La evolución que han tenido las plantas a lo largo de 500 millones de años en el ambiente terrestre les ha permitido adaptarse a condiciones de estrés biótico y abiótico. La adaptación metabólica más sobresaliente que han desarrollado es el metabolismo de los fenilpropanoides, mediante el cual se sintetizan la mayoría de los metabolitos secundarios (Ferrer y col., 2008).

El precursor para la biosíntesis de fenilpropanoides es el ácido cinámico, mismo que se forma a partir del aminoácido fenilalanina por medio de la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima altamente conservada entre las plantas superiores considerada como la enzima clave que divide el metabolismo primario del secundario. (Bate y col., 1994; Groover, 2001; Ferrer y col., 2008).

La acción de PAL produce ácido trans-cinámico, este ácido aromático es oxidado por la enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H) para producir ácido 4-coumarico, al que posteriormente se le une una molécula de coenzima A por medio de la enzima 4-coumaroil-CoA-ligasa (4CL) generando 4-coumaroil-CoA. Esta molécula probé un intermediario activo para la biosíntesis de fenilpropanoides. Estas 3 enzimas, PAL, C4H y 4CL son importantes para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas ya que la mayor proporción de 4-coumaroil-CoA es usado para la síntesis

de lignina, molécula estructural de la pared celular, dejando una pequeña proporción para la síntesis de polifenoles y flavonoides. La enzima clave en la divergencia hacia la ruta para la biosíntesis de metabolitos secundarios es la enzima chalcona sintasa (CHS) (Dixon y Palva, 1995; Yu y Jes, 2008).

La ruta para biosíntesis de fenilpropanoides produce la mayoría de los compuestos fenólicos encontrados en la naturaleza. Actualmente se han documentado más de 7,000 compuestos fenilpropanoides (Wink, 2003). En condiciones óptimas para la planta se han descrito distintos roles de fenilpropanoides en actividades fisiológicas, como polímeros de lignina que constituyen la pared celular, antocianinas como pigmentos florales para atraer polinizadores, sabores y esencias derivadas de fenilpropanoides (Yu and Jez, 2008). Por otro lado, en situaciones desfavorables para la planta se induce la síntesis de metabolitos secundarios de defensa para responder a los distintos tipos de estrés, biótico y abiótico (Korkina, 2007). Las respuestas de defensa en las plantas se asocian generalmente con la síntesis de metabolitos secundarios y enzimas específicas (Hyun-jin, 2009), sin embargo también pueden participar metabolitos primarios como prolina y ácido absisico (Younis y col., 2009).

II.13 Inducción de metabolitos secundarios

El mecanismo de defensa es inducido por condiciones adversas para la planta. En estrés biótico se inicia por las interacciones planta-patógeno (Agrios, 2005; Ferrari, 2010), mientras que en condiciones abióticas desfavorables, el mecanismo de defensa se induce por el desequilibrio entre producción y degradación de ROS (Miller y col, 2007).

La percepción del estrés inicia reacciones de defensa mediante cascadas de transducción de señales. Estas cascadas de señalización tienen como resultado la activación de genes en el núcleo celular iniciando la síntesis de proteínas de defensa y metabolitos secundarios protectores. La transducción de señales se activa por el reconocimiento de señales de estrés o moléculas derivadas de

patógenos, denominadas elicitores, resultando en la biosíntesis de compuestos tipo hormonas como ácido salicílico (SA), Jasmonato (JA) y etileno (ET). Estas moléculas generan cambios a nivel transcripcional, activando genes de resistencia a estrés desencadenando acciones de defensa específicas, como la síntesis de metabolitos secundarios (Menke y col., 1999; Janda y col., 2007).

II.14 Función del ácido salicílico en estrés.

En reacciones planta-patógeno la actividad de las enzimas detoxificadoras de ROS catalasa y ascorbato peroxidasa es suprimida por efecto del ácido salicílico y óxido nitroso, disminuyendo la habilidad de la planta para degradar ROS, generando concentraciones tóxicas para la planta que inducen muerte celular programada en el sitio de infección, además de funcionar como moléculas de señalización para inducir síntesis de proteínas de defensa (Klessig y col., 2000, Dangl y Jones, 2001, Janda y col., 2007).

La relación del ácido Salicílico con estrés biótico ha sido descrita en distintos trabajos y está bien comprendida, sin embargo, no se ha descrito completamente la ruta por la cual actúa en casos de estrés abiótico pero se cree que tiene efecto parecido a la aclimatación y tolerancia a estrés abiótico. (Horváth y col., 2007).

Se ha reportado que concentraciones altas de SA endógeno pueden causar intoxicación en la planta ya que induce altos niveles de peróxido de hidrogeno en los tejidos, vía inhibición de catalasas y peroxidases, desencadenando una reacción similar a la reacción hipersensible producida por estrés biótico resultando en muerte celular programada (Foyer y Noctor, 2005), pero en bajas concentraciones (0.05 -0.5mM) el SA desempeña un papel de protección, pues

Cuadro 1. Relación de la estructura química de los metabolitos secundarios con la función de protección que desempeñan.

Característica Química	Tipo de interacción	Función
Disponibilidad de carga eléctrica. (Cargas positivas en compuestos que contengan grupos amino e imino protonados.)	Electrostática	Estabilización de estructuras
Presencia de grupos: -COOH, -OH, -NH ₂	Unión covalente	Estabilización de estructuras (reforzamiento de pared celular)
	Polimerización Condensación	Anti microbial (Bloqueo de sitios activos) Respuesta Hipersensible
Presencia de dobles enlaces conjugados. (electrones des localizados)	Absorción de luz ultra-violeta Disipación de energía	Fotoprotector
Disponibilidad de grupos: -NH ₂ , -SH, -OH	Transferencia de electrones	Actividad Antioxidante Actividad Anti radical
Cadenas de carbono insaturadas -CH ₂ -CH=CH-		

desencadena niveles moderados de peróxido en los tejidos, lo que a su vez induce una generación moderada de ROS induciendo los mecanismos naturales para degradarlos resultando en el incremento de la capacidad antioxidante de la planta, actuando como un proceso de refuerzo contra mayores niveles de estrés (Janda y col., 2008). Por otro lado, el SA también actúa como molécula de señalización, induciendo la expresión de genes para la biosíntesis de compuestos de protección, denominados metabolitos secundarios (Arias y col., 2008).

II.15 Elicitores y factores inductores de metabolitos secundarios (FIMS)

Los elicitores son moléculas que activan respuestas de defensa en plantas. Pueden ser de origen abiótico como iones metálicos o compuestos inorgánicos y de origen biótico, como moléculas derivadas de hongos, virus, bacterias, herbívoros o químicos derivados de plantas liberados en las zonas de infección (Ferrari, 2010). Los elicitores son reconocidos por la planta e inducen el mecanismo de defensa.

II.16 Mecanismo de acción de elicitores.

La activación del mecanismo de defensa de las plantas se inicia por el reconocimiento de las moléculas que conforman al elicitor por receptores específicos, seguido por reacciones de fosforilación y desfosforilación de proteínas membranales y citosólicas, flujo de iones, despolarización de la membrana plasmática, alcalización extracelular y acidificación intracelular (Janda y col., 2007).

Estos eventos ocurren en un lapso de tiempo posterior a la recepción del elicitor mediante la activación de respuestas río abajo. Después de estos cambios, se activan oxidasas de NADPH y peroxidasas que llevan a una acumulación masiva de ROS, en coordinación con la producción de moléculas de señalización específicas como SA, ET y JA, resultando en respuestas tardías de defensa asociadas a la síntesis de metabolitos secundarios (Ferrari, 2010) ya que la percepción del elicitor por la planta activa enzimas involucradas en el metabolismo secundario.

Los elementos involucrados en las rutas de transducción de señales pueden ser activados de manera diferencial en respuesta a elicitores específicos. También existe una colaboración cruzada entre las diferentes rutas de señalización que llevan a respuestas específicas a diferentes estímulos, ya sean bióticos o abióticos (Farag y col, 2008).

El tipo de reacción de defensa es diferente en ambos casos. En estrés biótico se aumenta la concentración de ROS para inducir muerte celular programada en células infectadas, mientras que en condiciones de estrés abiótico se intenta disminuir el daño Oxidativo causado por ROS (Apel y Hirt, 2004). La intensidad de la respuesta varía dependiendo de la fuerza del estímulo al que la planta es sometida (Ferrari, 2010).

II.17 Clasificación y funciones de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios se pueden clasificar en compuestos fenolicos, carotenoides, alcaloides, compuestos que contienen nitrógeno y compuestos organosulfurados. Los más estudiados son los fenólicos y carotenoides Figura 1. (Hai Liu, 2004).

La función en la naturaleza de estos compuestos es dar color a las plantas, protegerlas de la luz ultravioleta, responder a estrés biótico o abiótico, proteger el ADN y permitirles superar las inclemencias de su entorno. (Craig, 2009).

II.18 Aplicaciones de metabolitos secundarios

La inducción controlada de reacciones de defensa de la planta, las prepara para resistir mayores niveles y tipos de estrés. Este enfoque permite aplicar tratamientos para lograr sistemas de agricultura sustentable; ya que al inducir los mecanismos naturales de defensa de las plantas de manera previa a que sufran estrés, les permite tolerar condiciones desfavorables de manera natural, disminuyendo el uso de compuestos químicos usados de manera tradicional. El entendimiento y

aplicación del metabolismo secundario de las plantas es una herramienta hacia el desarrollo de una agricultura sustentable (Mejía-Teniente y col., 2010).

Otra ventaja de los mecanismos inducidos por estrés es que algunos metabolitos secundarios producidos aportan beneficios a la salud al ser consumidos. Las plantas han estado presentes en la dieta desde el origen del hombre por su aporte nutricional básico, sin embargo también contienen compuestos secundarios bioactivos, llamados fitoquímicos de manera coloquial (LPI, 2010). Los fitoquímicos son metabolitos secundarios, considerados como nutrimentos no esenciales, el cuerpo no necesita para vivir, pero tienen efecto en la prevención y tratamiento de enfermedades. Entre los mecanismos propuestos por los que actúan los fitoquímicos, se encuentran: antioxidantes, función hormonal, estimulación de enzimas, interferencia con la replicación del DNA, efecto antibacterial y acción física (algunos fitoquímicos se unen a la membrana evitando así la interacción de patógenos con la membrana celular del huésped) (Korinka, 2007; Yu y Jez, 2008).

II.19 Modelo de estudio: Lechuga (*Lactuca sativa*)

La lechuga es la planta más importante del grupo de las hortalizas de hoja, es ampliamente conocida y cultivada en casi todos los países del mundo. Es originaria de Europa y Asia, cultivada desde hace 2000 años, a partir de ahí se distribuyó al resto del mundo, llegando al continente Americano aproximadamente en el año 1494 (Ryder, 1979).

La lechuga (*L. sativa*) pertenece a la familia de las plantas compuestas, es una planta anual, de raíz corta y poco profunda, presenta inflorescencias amarillas. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 16 y 25°C. (A. I. C. 1999).

La importancia cultural de la lechuga radica en que ha estado presente de manera cotidiana en la dieta de numerosas culturas, principalmente como base de ensaladas y otros platillos, además de aportar al consumidor una gran variedad de nutrientes esenciales, aporta vitaminas A, C, E, B, minerales como potasio,

magnesio, calcio, aminoácidos, fibra dietética, entre otros componentes (S.N.D. 2009).

Según el reporte de Expectativas de Producción Agropecuaria y Pesquera 2009 de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en México se destina una superficie de 20, 031 millones de hectáreas para siembra en general y se destinan 15,856.6 Ha para el cultivo de lechuga (SAGARPA, 2009), logrando una producción de 317,780.92 toneladas representando un ingreso de \$773,602,690.00 pesos al año (SIAP, 2009). Se estima que el mexicano promedio consume 56 kilos de verdura al año, en su mayoría lechuga, jitomate, cebolla y chile.

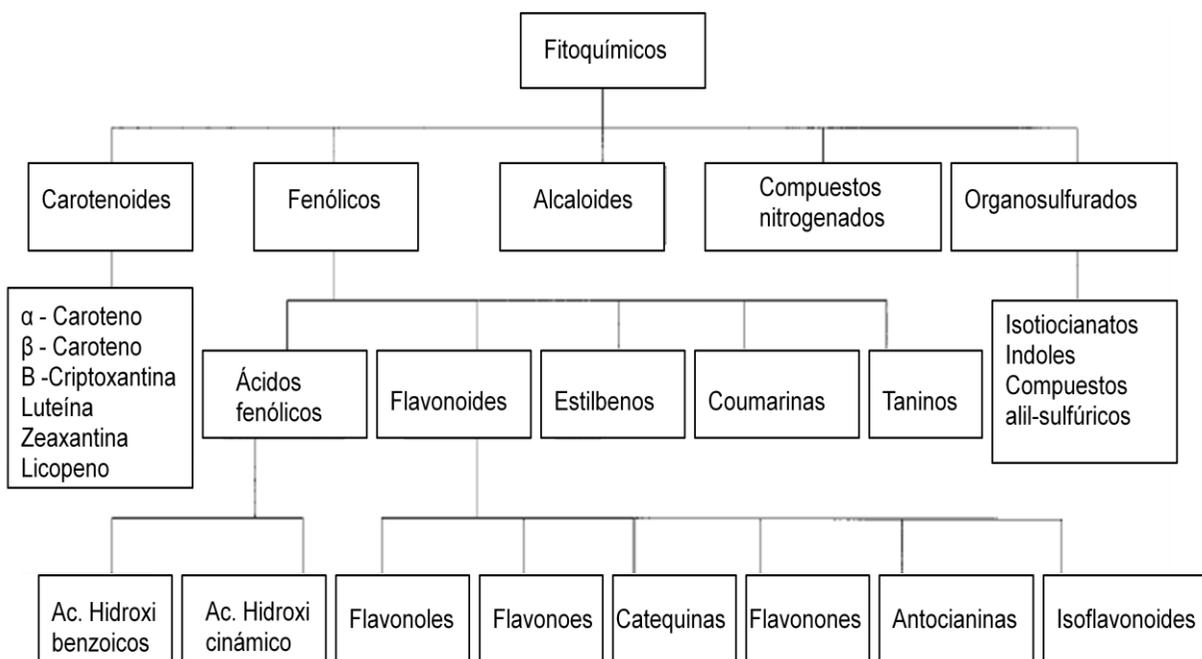


Figura 1. La figura muestra la clasificación de los compuestos fenólicos. Estos compuestos se sintetizan por medios del metabolismo fenilpropanoide y algunos participan en reacciones de defensa. Adaptado de Hai liu, 2004.

III. HIPÓTESIS

La aspersion foliar de ácido salicílico induce la expresión de genes de resistencia a estrés que aumentan la concentración de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en la planta de lechuga, reduciendo las afecciones ocasionadas por estrés abiótico.

IV. OBJETIVOS

IV.1 GENERAL

Evaluar la relación de genes inducidos por estrés abiótico y ácido salicílico con la producción de fenoles, flavonoides, capacidad antioxidante y su efecto en la resistencia a estrés en lechuga (*Lactuca sativa*).

IV.2 ESPECÍFICOS

Evaluar diferencias a nivel de rendimiento (biomasa) en plantas de lechuga sometidas a los distintos tratamientos.

Determinar contenido de algunos metabolitos primarios y secundarios y su correlación con los tratamientos aplicados.

Determinar actividad antioxidante en tejido de lechuga procesado.

Evaluar expresión de genes relacionados con estrés en lechuga.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales, reactivos y equipos

V.1.1 Material Biológico

Plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad PX 06516006 sometidas a diferentes tratamientos de estrés abiótico. Las muestras se colectan en sobres de papel aluminio y congeladas al instante en nitrógeno líquido.

V.1.2 Materiales

- Guantes
- Sobres papel aluminio 15X20 cm.
- Hielera
- Termo para Nitrógeno Líquido
- Tubos 50 ml (Falcon)
- Tubos de ensayo 13X100
- Tubos 1.5 a 2 ml (Eppendorf)
- Tubos para PCR
- Puntas para micropipeta
- Puntas para micropipeta tratadas con DEPC
- Matraz Erlenmeyer 250ml
- Viales ambar 5ml con rosca
- Gradillas

V.1.3 Equipos y software

- Micropipetas .5-10, 2-20, 20-200, 100-1000 μ L (RAININ)
- Refrigerador (4°C)
- Congelador (-20°C)
- Ultra congelador (REVCO)
- Cámara digital (Cannon powershot 6.0 Mega pixeles)

- Vortex (VELP científica)
- Microcentrífuga refrigerada (PRISM Labnet International)
- Plato Caliente con agitador (IKA C-MAG H57)
- Termociclador (TECHNE TC-4000)
- Cámara para electroforesis (SELECT Bioproducts)
- Fuente de poder (THERMO electron corporation)
- Horno de Microondas (Whirlpool)
- Computadora personal (DELL)
- Fotodocumentador UV-VIS (DNR)
- Espectrofotómetro (Bio-rad Smartspe Plus)
- Programa Gel Capture (DNR)
- Programa Gel Quant (DNR)
- Programa Amplif X 1.5.4 (REALbasics)
- Programa Serial Cloner 2.1 (SERIALbasics)

V.1.4 Reactivos

- Agua destilada
- Sustrato Orgánico (PEAT MOSS)
- Vermiculita (Intersum Dm3)
- Hipoclorito de sodio 10% (CLOROX)
- Ácido salicílico 0.1mM
- Cloruro de Sodio (NaCl)
- Dietilen-Piro-Carbonato DEPC
- Nitrógeno Líquido
- TRIZOL Reagent (Invitogen)
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol DEPC 75%
- Agua DEPC

- KIT SuperScript ⁱⁱⁱ (Invitrogen)
- dNTP's (Promega)
- Titanium Polimerasa
- Tampón PCR titanium Polimerasa
- Oligonucleotidos específicos PAL, CAT, SODmn, β -TUB (Invitrogen)
- Bromuro de Etidio
- Tampón de carga
- Tampón de corrida TAE
- Tampón de corrida MOPS
- Formaldehido 37%
- Agarosa
- Ácido Gálico
- Reactivo Folin-Ciocalteu
- Carbonato de Sodio
- Rutina
- 2-aminoetildifenil borato
- Metanol
- 2,2-difenil-1-pirohidracil DPPH
- Trolox
- Ácido Sulfosalicílico
- Ninhidrina
- Prolina
- Tolueno

V.2 Métodos

V.2.1 Germinación y siembra de lechugas

Se utilizaron semillas comerciales de lechuga (*Lactuca sativa* var. PX 06516006). Las semillas fueron hidratadas 12 horas y desinfectadas con solución de hipoclorito

al 10% previamente a la siembra, usando como sustrato una mezcla de materia orgánica comercial Peat Moss y vermiculita en proporción 3:1, germinándose en almácigos de 200 pozos. Se mantuvieron con riego diario y posteriormente se trasplantaron las plántulas cuando las lechugas tenían altura homogénea y presenten de 5 a 7 hojas verdaderas. Se manejó un periodo de 8 días para aclimatación posterior al trasplante.

V.2.2 Tratamiento estrés abiótico

Para los fines de este estudio, se manejaron 2 tipos de estrés en 4 condiciones diferentes, estrés salino usando concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl) de 40 y 80mM; estrés hídrico por déficit de agua clasificado como sequía moderada (3 días sin riego) y sequía severa (6 días sin riego). Se clasificaron en grupos de tratamiento de estrés y estrés mas aspersión foliar de SA concentración 0.1 mM cada 5 días.

V.2.3 Determinación de características agronómicas.

Se realizaron observaciones diarias por 16 días de tratamiento, documentando cambios fenotípicos. El último día de tratamiento, se cosecharon las plantas para determinar altura, número de hojas, peso fresco y seco de la parte foliar y raíz. Las plantas se secaron en un horno a 60° C por 24 horas. Para la determinación de clorofila, se tomaron de 3 a 5 mediciones por planta en hojas no marchitas utilizando el equipo SPAD Minolta y se calculó el promedio.

V.2.4 Muestreo

Se colectaron muestras de tejido en momentos donde se observen cambios fenotípicos importantes. Se prepararon sobres de papel aluminio, rotulados. Se cortó una hoja de 3 plantas escogidas al azar por tratamiento y se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después, fueron guardadas a -70°C hasta su procesamiento.

V.2.5 Extracción metanólica de fenoles y flavonoides

Moler muestras de tejido en un mortero usando nitrógeno líquido. Posteriormente tomar 0.2g de tejido en un matraz forrado con papel aluminio, agregar 10 ml de metanol, tapar agitar por 24 horas.

V.2.6 Determinación de fenoles

La cuantificación de fenoles se llevó a cabo con la siguiente metodología: Realizar una curva de calibración con concentraciones de estándar de ácido gálico en cantidades de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 μg , partiendo de una solución base de 0.1mg/mL. La solución de ácido gálico debe ser preparada al momento. Colocar los μL correspondientes de solución base para cada concentración de la curva en una vial color ámbar y añadir volúmenes de agua destilada hasta completar un volumen de 500 μL : 20 μL ácido gálico + 480 μL de agua. Posteriormente se agregan 250 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y 1250 μL de carbonato de sodio al 20%. Las muestras se deben dejar reposar 2 horas en obscuridad a temperatura ambiente. Para terminar se lee la absorbancia a 760nm en espectrofotómetro UV-VIS. Se grafican los valores de absorbancia para obtener la curva de calibración, se determina la línea de tendencia, la ecuación de la curva y el valor de R^2 , que debe ser mayor a 0.99. Para la cuantificación de fenoles en la muestras, tomar 40 μL del sobrenadante del extracto metanólico y seguir el mismo proceso que para realizar la curva. Se interpolan las absorbancias de las muestras en la curva para calcular mg equivalentes de a. gálico.

V.2.7 Determinación de flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides totales se empleará el análisis espectrofotométrico propuesto por (Oomah y col., 2005) con estándar de rutina. La curva de calibración se realiza usando concentraciones del estándar de 50, 25, 10, 5, 2.5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al blanco de la curva se le añaden 230 μL de metanol y 20 μL de 2-aminoetildifenil borato al 1%. Posteriormente, se colocan 50 μL de cada concentración del estándar por triplicado en una placa de 96 pozos y se le

adicionan 180 μL de metanol + 20 μL de 2-aminoetildifenil borato al 1%, para tener un volumen final de reacción de 250 μL . Se lee la absorbancia a 404 nm en el equipo Multiskan (Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascent, modelo 51118307). Graficar la absorbancia de las soluciones estándar para obtener la curva de calibración, calcular línea de tendencia, valor de R^2 y ecuación de la curva. Para la cuantificación de las muestras se toman 50 μL del sobrenadante del extracto metanólico, se añaden 180 μL de metanol y 20 μL de solución de 2-aminoetildifenil borato al 1%. Se prepara un blanco de muestra añadiendo 50 μL del extracto metanólico y 200 μL de metanol, esto se realiza para eliminar factores de ruido en la medición debido al contenido de clorofila en el extracto metanólico. Para calcular el contenido de flavonoides en el tejido, interpolar la absorbancia de las muestras en la curva de calibración.

V.2.8 Determinación de la capacidad antioxidante.

La determinación de la capacidad antioxidante se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de reducir al radical DPPH. De forma oxidante, el DPPH tiene color azul y al inactivarse se torna amarillo. Primero se realiza una curva de calibración usando Trolox como estándar, el Trolox es un homólogo hidrosoluble de la vitamina A. Se prepara en concentraciones desde 800 a 100 μM . A continuación, en una placa de 96 pozos se agregan 20 μL de cada concentración por triplicado así como también de cada muestra, se cargan pozos control que contienen 20 μL de metanol y también pozos de blanco con 220 μL de metanol. Posteriormente, utilizando una pipeta multicanal se le añaden 200 μL de DPPH a cada pozo con excepción del blanco, esto debe realizarse en menos de 1 minuto, y se lee la absorbancia en Multiskan (Thermo Electron Corporation, Multiskan Ascent, modelo 51118307) cada 10 minutos durante 90 minutos. Se grafican las absorbancias de la curva y se calculan porcentajes de degradación y EC50.

V.2.9 Determinación de prolina

La determinación de prolina se basa en la coloración que se obtiene al reaccionar ninhidrina con prolina. El complejo que se forma tiene una coloración rojiza. Se

realiza una curva de calibración usando concentraciones de prolina de 500 a 50 μ M. Las concentraciones estándar de prolina se disuelven en ácido sulfosalicílico al 3%. Tomar 2 ml de las concentraciones en un tubo de ensayo y agregar 2 ml de ninhidrina ácida + 2 ml de ácido acético glacial. La mezcla se calienta a 100°C durante una hora y se termina la reacción incubando 5 minutos en hielo. Posteriormente se le agregan 4 ml de tolueno y se agita en vortex 20 de 10 a 20 segundos. Se recupera la fase orgánica y se mide la absorbancia a 520nm. Para las muestras, se toman 0.5 gramos de tejido molido en nitrógeno líquido y se disuelven en 10ml de ácido sulfosalicílico. A continuación se filtran con papel filtro. Para la reacción se toman 2 ml del extracto y se prosigue de la misma forma que para la curva. Se interpolan las mediciones en la curva de calibración para calcular la concentración de prolina por gramo de tejido fresco.

V.2.10 Diseño de oligonucleótidos para PCR

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se necesitan diseñar oligonucleótidos específicos para la secuencia del ARN mensajero de los genes de interés. Para el diseño primero se debe realizar un análisis bioinformático de secuencias reportadas en la base de datos del NCBI de genes del organismo de interés. Los números de acceso de las secuencias de interés para este trabajo son: PAL (AF299330), CAT (GW397519.1), SOD (AJ310449), PER (GW397557.1) y β -TUB (AB232706), obtenidos de la base de datos del NCBI. Con estas secuencias, se diseñan los oligonucleótidos utilizando programas bioinformáticos como AMPLIFX 1.5.4 y SerialCloner 2.1. Par diseñar el oligonucleótido se debe considerar la longitud de las secuencias amplificada, proporción de guaninas-citosinas y no más de 2 grados centígrados de diferencia en las temperaturas de alineamiento por par de oligonucleótido. Para fines prácticos, los pares de oligonucleótidos que se pretende diseñar amplificarán fragmentos de 350 a 550 pares de bases en promedio. El proceso de diseño consiste en buscar la secuencia de los mensajeros en las bases de datos, posteriormente identificar regiones en la secuencia con contenido de G-C favorable para el oligonucleótido y se toman de 18 a 25 pares de bases de esta región para conformar el oligo-sentido. Para

diseñar el oligo-antisentido se toma una región con características similares a la anterior, después se construye la secuencia complementaria y se invierte el orden, para tenerla en dirección 5´ a 3´. Los pares de oligonucleótidos teóricos se deben evaluar realizando PCR virtual en programas bioinformáticos. Finalmente las secuencias que cumplen con los requisitos de especificidad y eficiencia en el PCR virtual se mandan sintetizar con un proveedor especializado.

V.2.11 RT-PCR

Para la extracción de RNA se utilizará el método de extracción por Trizol®. Brevemente, se tritura el tejido en nitrógeno líquido. Posteriormente se agrega 1ml de Trizol y se mezcla en vortex hasta homogenizar la mezcla, a continuación se centrifuga a 10,000 RMP por 10 minutos. Se recupera el sobrenadante y se incuba 5 min. a temperatura ambiente. Se le agrega después 0.2mL de cloroformo y se agita manualmente 15 segundos. A continuación se centrifuga a 10,000 RMP por 15 minutos. Se forman 2 fases y se recupera la fase acuosa, se la agrega 0.5mL de isopropanol para precipitar el RNA y se incuba 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga 10 minutos a 10,000 RPM y se desecha el sobrenadante, para finalizar se lava la pastilla con 1 mL de etanol al 75% en agua tratada con DEPC, se centrifuga a 10,000 RPM 5 minutos y se desecha el sobrenadante. Para terminar la extracción de RNA se deja secar la pastilla y se re suspende en 30µL agua tratada con DEPC. Es necesario correr un gel de agarosa desnaturalizante (30g agarosa + 24.9ml de agua tratada con DEPC + 3.5ml de MOPS 10X + 1.2ml de formaldehído al 37%, el gel se corre usando MOPS1X como tampón de corrida) para verificar la integridad del RNA, a continuación se cuantifica y se prosigue con la síntesis de la primera cadena complementaria. Si no se usa el mismo día, se debe guardar en el ultracongelador.

Posteriormente a la extracción, se sintetiza cDNA. Este proceso se realiza siguiendo el protocolo de OligoDT usando el Kit Superscriptⁱⁱⁱ (INVITROGEN). Para este método primero se realizan las mezclas de reacción. En una primera etapa se mezclan en un tubo para PCR de 1 a 5ug de RNA, 1µL de mezcla de

DNTP's, 2µL de oligonucleótidos DT y 2µL de agua tratada con DEPC. Esta mezcla se incuba a 65°C por 5 minutos. Aparte se realiza la segunda mezcla de reacción en donde se agregan 2µL de Buffer RT, 4µL de MgCl₂, 2µL de DTT y 1µL de RNase OUT. Para realizar la reacción se agregan 9µL de la mezcla 2 a la que contiene RNA. Se incuba 2 minutos a 25°C. Posteriormente se le agrega 1µL de la enzima Superscript IIRT y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Se incuba después 50 minutos a 42°C y se termina la reacción a 70°C por 15 minutos, para finalizar la síntesis se le agrega 1µL de RNaseH, se incuba 20 minutos a 37°C y se almacena a -20°C.

Para comprobar la expresión de genes, se realiza PCR usando oligonucleótidos específicos para la secuencia de interés. Para realizar la reacción de PCR, se realiza una mezcla de reacción que contiene 2.5µL de regulador MINUS10X, 1µL de oligonucleótido sentido y 1µL de antisentido, 0.5ul dNTP, 0.75µL de MgCl₂, 0.1µL de TAQ polimerasa, 18.7µL de agua y 1µL de cDNA para obtener un volumen final de 25µL. Posteriormente se realizan 35 ciclos de temperatura para que la reacción se lleve a cabo y se termina 15 minutos a 94°C. Finalmente se realiza una electroforesis y se cuantifican las bandas de interés usando el programa GelQuant (DNR).

V.3 Diseño experimental

Variables independientes: Aspersión foliar de ácido salicílico 0.1 mM + diferentes tipos y niveles de estrés abiótico: sequía severa y moderada, salinidad 40 y 80mM.

Variables dependientes: Altura, número de hojas, peso fresco y seco de raíz y parte foliar, contenido de fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y expresión de genes de interés.

Unidad experimental: Grupo de 8 a 9 individuos de lechuga (*L. sativa*) var. *PX 06516006* por tratamiento, altura promedio 15cm. de 5 a 6 hojas verdaderas.

Aleatorización: Las lechugas crecieron en la misma parcela bajo invernadero, se formarán los grupos al azar estandarizando el tamaño de las plantas. El acomodo

en los tratamientos no será aleatorio, pero se pretende realizar otra repetición en otra época del año para disminuir la temperatura ambiental como variable.

Repeticiones: 2 repeticiones, en determinaciones de fenoles y flavonoides se realizarán 2 repeticiones por triplicado por determinación.

Controles: 2 controles, Control riego normal y control riego normal + aspersion de ácido salicílico; riego con agua destilada debido a que los tratamientos de salinidad utilizan soluciones de NaCl en agua destilada. Se usaron estos controles para comparar el desempeño de las lechugas en condiciones normales y con aspersion de salicílico, esto es con el fin de evaluar el efecto del ácido en situaciones de estrés abiótico. Cuadro 2

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos y los grupos establecidos para el estudio

Tratamiento	Control	Sequía moderada	Sequía severa	Salinidad 40mM	Salinidad 80mM
<i>L. sativa</i>	Riego diario	Riego cada 3 días	Riego cada 6 días	Riego diarios con solución NaCl 40mM	Riego diarios con solución NaCl 80mM
<i>L. sativa</i> + aspersion de SA 0.1mM cada 5 días.	Riego diario	Riego cada 3 días	Riego cada 6 días	Riego diarios con solución NaCl 40mM	Riego diarios con solución NaCl 80mM

*Las plantas se riegan con 50ml de agua o solución de NaCl.

VI RESULTADOS

Se analizaron grupos de 8 a 9 individuos sometidos a los distintos tratamientos descritos en el cuadro 2. Para eliminar variaciones ambientales se realizó una repetición de los tratamientos en otra época del año. En total se analizaron de 16 a 18 individuos por tratamiento para las mediciones fenotípicas y 8 individuos para las determinaciones bioquímicas y de expresión genética.

VI.1 Germinación de plantas de lechuga.

Las semillas se sembraron en almácigos de 200 pozos en sustrato en proporción 3:1, peat moss: vermiculita, previamente al sembrado se realizó la desinfección de las semillas con solución de hipoclorito al 10%. Las semillas se hidrataron 12 horas en agua destilada estéril. Se obtuvo una eficiencia de germinación de 92.5%. Figura 2.A. Las plántulas fueron trasplantadas a macetas cuando alcanzaron una altura de 5 a 7 cm. y tenían de 5 a 6 hojas verdaderas Figura 2.B. Posterior al trasplante, se manejó un periodo de recuperación de 1 semana para aclimatación y recuperación del estrés post trasplante. Después de este periodo, se dividieron en grupos de 8 individuos de manera aleatoria para homogenizar las plantas de cada tratamiento. Los tratamientos aplicados se describen en el cuadro 2.

A)



B)



Figura 2. Estado de las plantas antes de la aplicación de los tratamientos. A) Germinación de las semillas, se obtuvo una eficiencia de germinación de 92.5%. B) Plantas de lechuga, previo al inicio de los tratamientos.

VI.2 Cambios en parámetros agronómicos.

Se evaluaron los cambios en parámetros agronómicos en los grupos de manera diaria, llevando un registro fotográfico. El último día de tratamiento se cosecharon las plantas y se determinaron parámetros agronómicos como altura, número de hojas, peso fresco y seco. Las plantas sometidas al tratamiento de sequía severa alcanzaron el coeficiente de marchitez permanente para los dos tratamientos (con y sin ácido salicílico), entrando en estado senescente y posteriormente murieron.

Al comparar la altura de las plantas, se observó mayor altura en las plantas sometidas a sequía moderada tratadas con ácido salicílico 0.1mM, sin embargo no se encontraron diferencias significativas con los controles. Las plantas de este mismo tratamiento que no fueron tratadas con ácido salicílico presentaron una altura menor significativamente diferente comparada con las si tratadas, como se muestra en la Figura 3.A. Al comparar los individuos de los tratamientos de salinidad, se observó mayor altura en las plantas regadas con NaCl concentración 40mM con aspersion foliar de SA y menor altura en las regadas con solución salina a 80mM con aspersion de SA pero no se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles.

En relación al número de hojas, el tratamiento que presentó menor número fue el tratamiento de sequía moderada sin aspersion de ácido salicílico, seguido por los tratamientos de salinidad 80mM y 40mM + SA. Figura 3.B.

La determinación de peso fresco se realizo inmediatamente después de cosecharlas, El tratamiento de salinidad 80mM sin aspersion de SA presento el menor peso fresco, presentando diferencias significativas con respecto al control, que fue el tratamiento con el mayor peso fresco. La aspersion foliar de ácido salicílico evitó la disminucion de peso fresco en plantas sometidas a estrés salino concentración 80 y 40mM, pues en ambos tratamientos se presento un mayor peso fresco en las plantas tratadas con ácido salicílico que en la no tratadas, como se muestra en la figura 3.C. El análisis de peso seco mostró resultados similares, las plantas sometidas a estrés por déficit de agua y estrés salino tratadas con ácido

salicílico presentaron mayor peso seco que las no tratadas, sin embargo únicamente se encontraron diferencias significativas en el tratamiento de salinidad 40mM sin aspersión de SA en comparación con el control, que fue el grupo con el mayor peso seco. No se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a estrés, como muestra la figura 3.D.

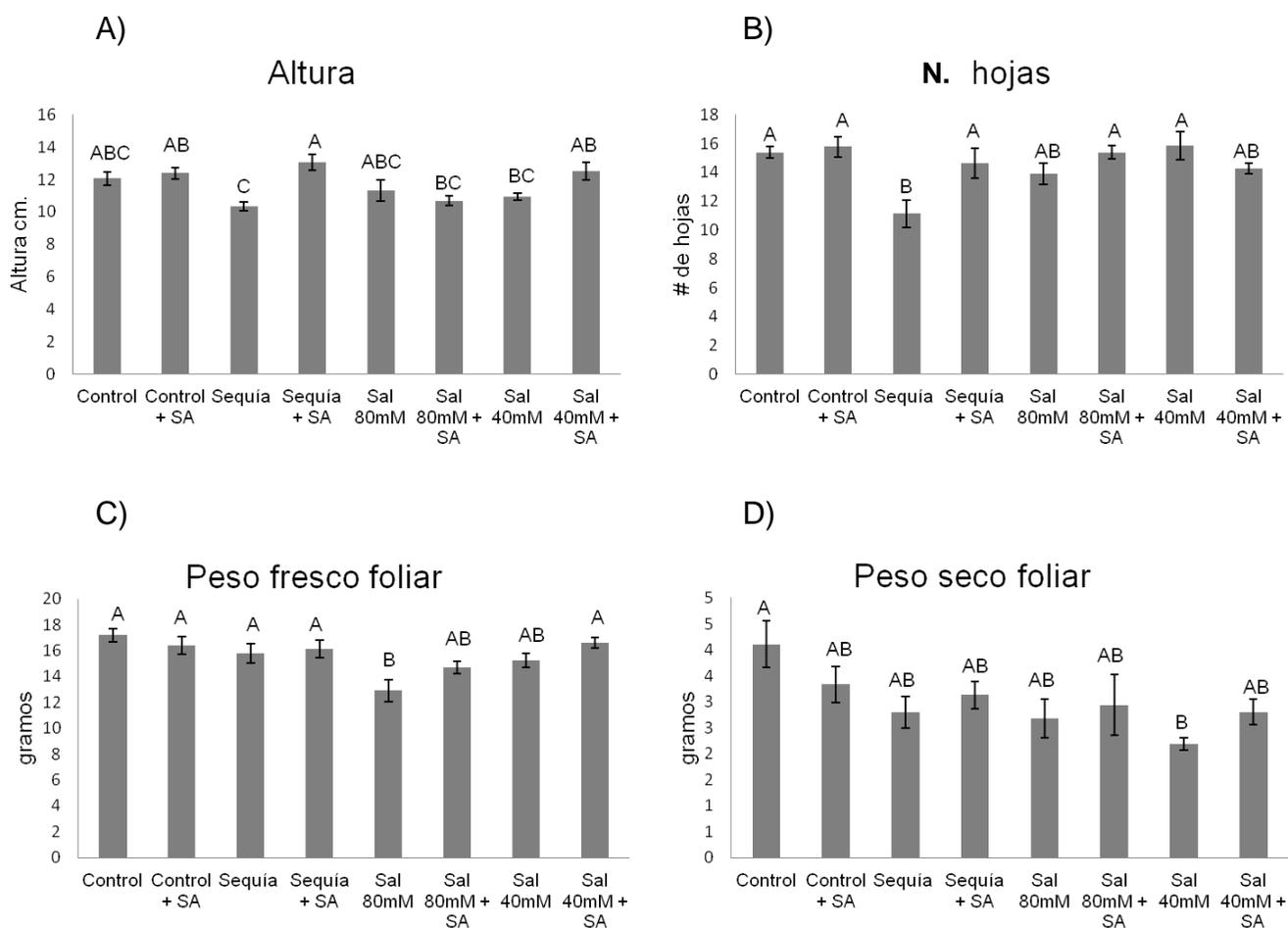


Figura 3. Promedios de parámetros agronómicos al momento de la cosecha, se tomaron mediciones de 10 individuos. Las barras representan la media +/- el error estándar. Las letras representan los resultados de la comparación de medias por el método de Tukey-Kramer HSD, letras diferentes entre grupos indican diferencias significativas. A) Gráfica de la altura al día de la cosecha. B) Gráfica del promedio del número de hojas por planta. C) Gráfica del peso fresco. D) Gráfica del peso seco.

VI.3 Análisis de porcentaje de agua en tejido fresco y seco.

Se calculó el porcentaje de agua y biomasa en la composición del peso fresco. Analizar la composición del peso es importante pues los mecanismos de resistencia o tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico se asocian con la capacidad de las plantas para mantener niveles óptimos de potencial de agua en los tejidos así como también con la capacidad para completar su ciclo biológico en un menor periodo (Harb y col., 2010). Esto se realizó calculando la proporción del peso seco en el peso fresco, considerando el peso fresco de cada tratamiento como 100%. Con este análisis se pudo observar que las plantas del tratamiento salinidad 40mM con y sin aspersión de ácido salicílico presentaron la mayor acumulación de agua en los tejidos y la menor proporción de biomasa, mostrado en la figura 4 A y B, siendo el no tratado con SA el que presentó la menor proporción de biomasa.

Cuadro 3. Resumen de datos peso fresco, seco y proporción de biomasa.

Tratamiento	Peso fresco	Agua en tejido		Biomasa	
		Peso (g)	%	Peso (g)	%
Control	17.195 ^A	13.090 ^A	76.1	4.105 ^A	23.9
Control + SA	16.418 ^A	13.080 ^{AB}	79.7	3.338 ^{AB}	20.3
Sequía	15.809 ^A	13.297 ^{AB}	82.3	2.512 ^{AB}	17.7
Sequía + SA	15.801 ^A	13.290 ^{AB}	80.6	2.512 ^{AB}	19.4
Salinidad 80mM	12.904 ^B	10.227 ^{AB}	79.3	2.677 ^{AB}	20.7
Salinidad 80mM + SA	14.708 ^{AB}	11.769 ^{AB}	80.0	2.939 ^{AB}	20.0
Salinidad 40mM	15.269 ^{AB}	13.083 ^B	85.7	2.186 ^B	14.3
Salinidad 40mM + SA	16.606 ^B	13.805 ^{AB}	83.1	2.801 ^{AB}	16.9

Únicamente se encontraron diferencias significativas entre este tratamiento y el control. En las plantas sometidas a sequía, se obtuvo una ligera proporción mayor de biomasa en las plantas tratadas con SA, mientras que en las sometidas a estrés salino 80mM se observó un resultado inverso, con mayor proporción de biomasa en las no tratadas con SA, sin encontrar diferencias significativas en ambos casos. Estos resultados se muestran en la figura 4.C y se presenta un resumen de datos en la cuadro 3.

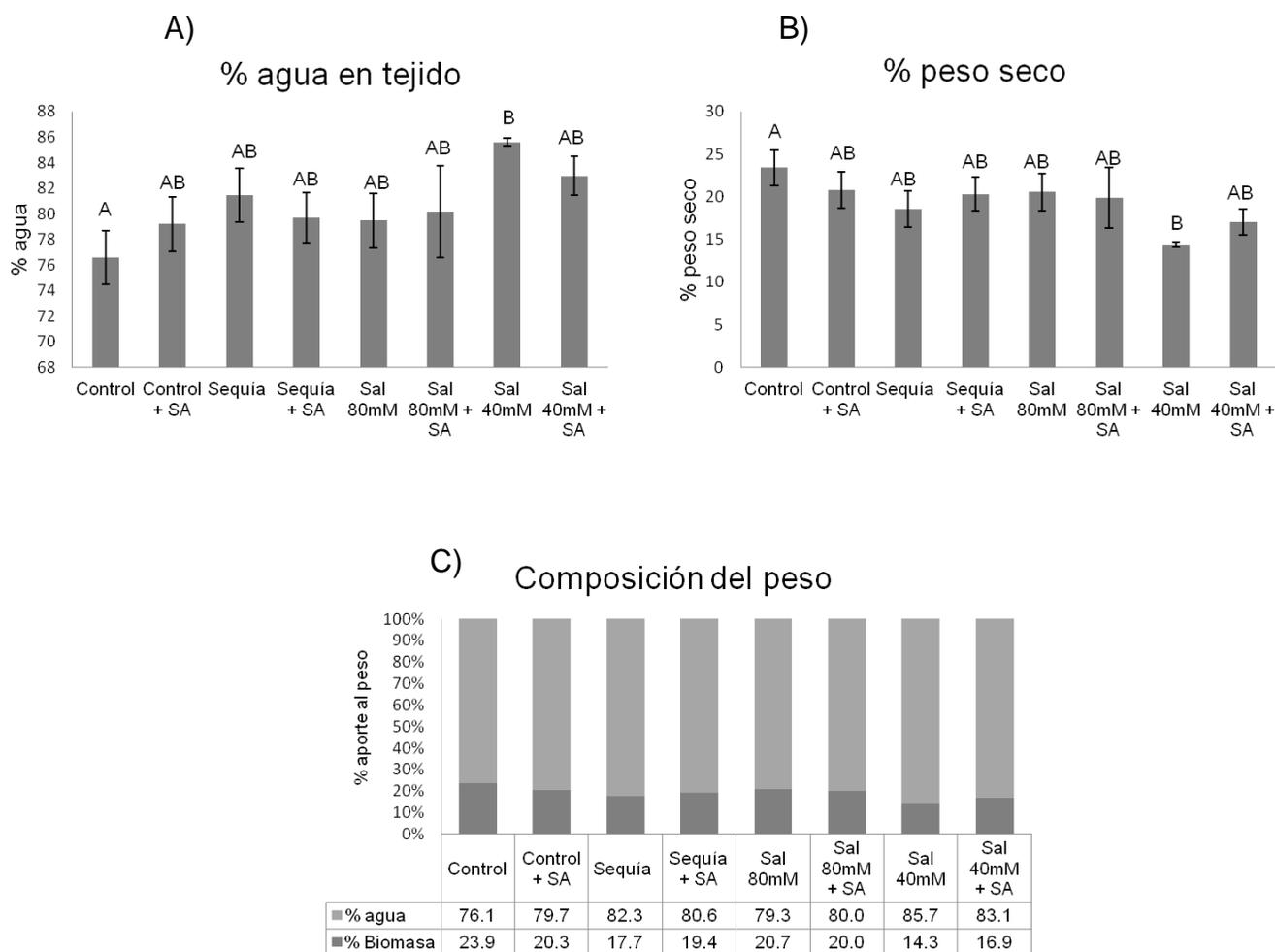


Figura 4. Composición del peso fresco, los datos se obtuvieron calculando la proporción del peso seco en el peso fresco, considerando la diferencia entre peso fresco y seco y el aporte de agua en los tejidos al peso fresco y el peso fresco de cada tratamiento como 100%. Las barras de error representan la media +/- el error estándar y las letras los resultados de la comparación de medias por el método de Tukey-Kramer HSD, letras diferentes entre grupos indican diferencias significativas. A) Gráfica de la proporción de agua en tejido. B) Gráfica de la proporción de biomasa en el peso fresco. C) Suma de las proporciones de agua en tejido y biomasa.

VI.4 Análisis del efecto de los tratamientos de sequía moderada y severa.

Los efectos de la sequía en las plantas a nivel fenotípico consisten en marchitamiento de la planta, pérdida de vigor, enrollamiento y rigidez de las hojas, coloración opaca y posteriormente muerte de las hojas afectadas. A nivel fisiológico se presenta una disminución de la actividad fotosintética y transpiración reduciendo el crecimiento y desarrollo de la planta (Shinozaki y Yamaguchi 2006). En la figura 5 se muestra el estado de las plantas previo al inicio del estrés.

Como se mencionó anteriormente, las plantas sometidas a sequía severa se marchitaron considerablemente y posteriormente murieron, ningún individuo de las plantas tratadas y no tratadas con SA sobrevivió este nivel de estrés. Por otro lado, en las plantas sometidas a sequía moderada fueron apreciables diferencias a nivel fenotípico entre las plantas tratadas y no tratadas con SA en el número de hojas y la altura. Otra diferencia observable consistió en el periodo de recuperación posterior al estrés.

Se evaluó el tiempo en que las plantas superaban los efectos de la sequía, observando un periodo más corto en las plantas tratadas con ácido salicílico. Se suspendió el riego de las plantas por 3 días restaurándose al día 4. Al quinto fue apreciable una mayor mejoría en las plantas tratadas con aspersion foliar de ácido salicílico 0.1mM. Estas diferencias se muestran en la figura 6.

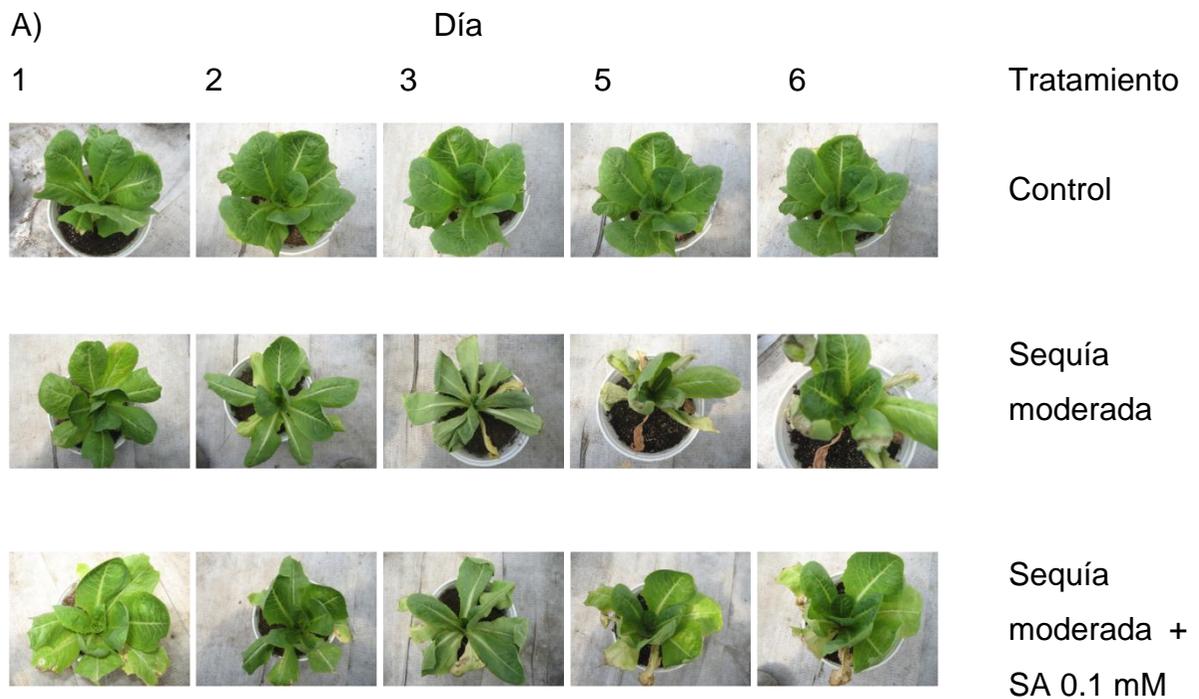
VI.6 Determinación de fenoles

Al identificar diferencias en la expresión en el gen PAL, gen clave que divide el metabolismo primario del secundario, se procedió a medir el contenido de metabolitos secundarios como fenoles y flavonoides así como también la capacidad antioxidante de las plantas sometidas a los distintos tipos de estrés. En la cuantificación fueron apreciables cambios en el contenido de fenoles entre las plantas tratadas y no tratadas con SA en los distintos tipos de estrés. En condiciones de no estrés para la planta, se presento un mayor contenido en las plantas tratadas con SA, sin encontrarse diferencias significativas entre ellas. En

las plantas sometidas a sequía, las plantas tratadas con SA presentaron niveles de fenoles similares a los de los controles mientras que en las no tratadas se obtuvo menor concentración. Sin embargo, el contenido de fenoles aumentó considerablemente en estas plantas durante el periodo de recuperación alcanzando una concentración similar a la de los controles. El mayor contenido de fenoles se presentó en el tratamiento de sequía tratado con SA durante el periodo de recuperación. En las plantas sometidas a salinidad 80mM se observó un efecto inverso al de sequía, pues se determinó menor concentración de fenoles en las plantas tratadas con SA y un alto contenido de fenoles en las no tratadas, encontrándose diferencias significativas comparándolas con los controles. Estos datos se muestran en la figura 7.



Figura 5. Estado de las plantas al día 0 de tratamiento, En la fila superior se muestran las plantas no tratadas con SA 0.1mM, en la inferior las que fueron tratadas con aspersion foliar de SA 0.1 mM cada 5 días. Los grupos se organizaron de izquierda a derecha en control, sequía moderada, sequía severa, salinidad 40 y 80 mM



B)



C)



Figura 6. Apariencia visual de las plantas sometidas a los tratamientos de sequía moderada durante la etapa de estrés y el periodo de recuperación. A) Las columnas muestran los días del tratamiento. La primera fila muestra la misma planta del grupo control, la segunda una planta sometida a sequía moderada sin tratamiento de ácido salicílico y la tercera a un individuo sometido a sequía tratado con aspersión foliar de ácido salicílico 0.1 mM. B) Plantas del grupo sometido a sequía moderada sin aspersión de SA, al día 5 del estudio. C) Plantas sometidas a sequía tratadas con SA. Fotos al día 5 de tratamiento.

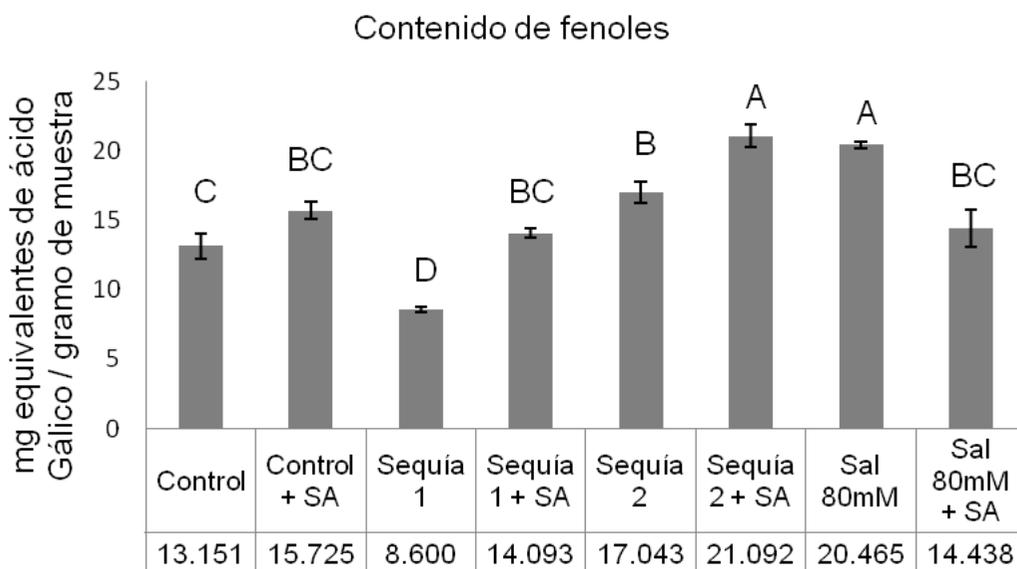


Figura 7. Determinación de fenoles, expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. Las barras de error representan el error estándar y las letras los resultados del análisis estadístico por el método de Tukey HSD, se usó un valor α de 0.1. Letras diferentes entre grupos indican diferencias significativas.

VI.7 Determinación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides mostró una tendencia similar a la de fenoles. En condiciones de no estrés se presentó mayor concentración en las plantas tratadas con SA, fueron apreciables diferencias significativas entre las plantas de estos grupos. Durante la etapa de estrés en las plantas sometidas a sequía se determinó una menor concentración en las plantas no tratadas con SA que las si tratadas y un incremento del doble de concentración de flavonoides durante el periodo de recuperación. La combinación de sequía y aspersion foliar de ácido salicílico indujeron el mayor contenido de flavonoides entre todos los grupos, observándose diferencias significativas con los demás. En las plantas sometidas a salinidad 80mM se obtuvo menor concentración en las plantas tratadas con SA que en las no tratadas, las no tratadas mostraron alto contenido de flavonoides, encontrándose diferencias significativas con los controles, como se muestra en la figura 8.

VI.9 Determinación de prolina

Para evaluar el efecto del ácido salicílico en los mecanismos de resistencia a estrés se cuantificó la acumulación de prolina en los tejidos. Este aminoácido participa manteniendo el potencial de agua en los tejidos, lo que le permite a la planta resistir estrés hídrico y osmótico. En condiciones no estresantes para la planta se presentaron concentraciones de prolina bajas en el tejido, incluso con aspersión foliar de SA. Al someter las plantas a estrés el contenido de prolina en los tejidos aumentó en los 2 tratamientos, sequía y salinidad 80mM. Fue apreciable que al combinar el tratamiento de ácido salicílico con estrés se tuvo una mayor acumulación de prolina, como se puede ver en la figura 9. A

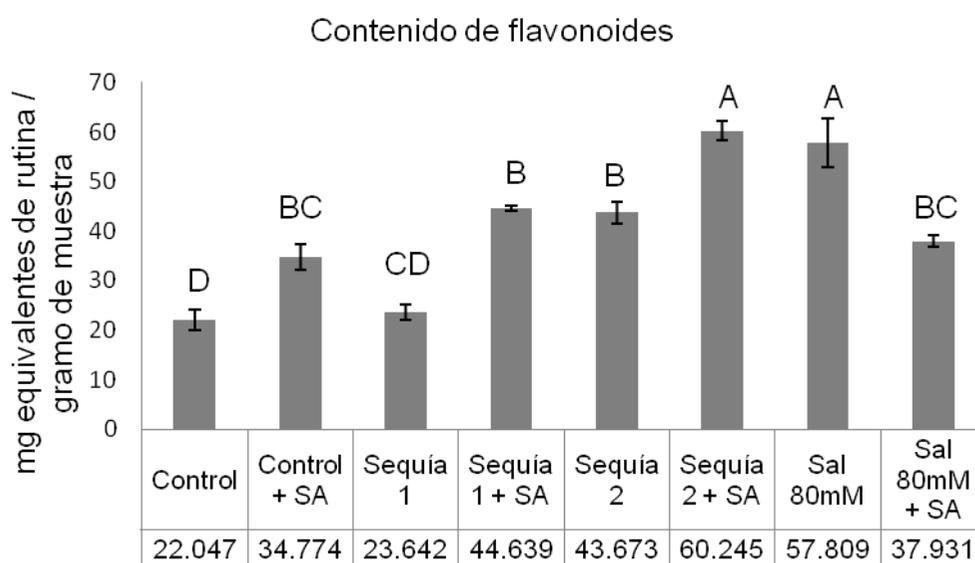


Figura 8. Determinación de flavonoides. Expresado como miligramos equivalentes de rutina por gramo de muestra. Las barras de error representan el error estándar y las letras los resultados del análisis estadístico por el método de Tukey HSD, se usó un valor α de 0.1. Letras diferentes entre grupos indican diferencias estadísticamente significativas.

VI.10 Contenido de clorofila

Para evaluar de manera indirecta cambios en la actividad fisiológica en las plantas sometidas a estrés, se determinó la cantidad de clorofila usando un medidor de clorofila SPAD marca Minolta. La coloración en las hojas se relaciona directamente con la cantidad de clorofila y la cantidad de nitrógeno en la hoja. Este

análisis mostro diferencias significativas únicamente en las plantas sometidas a sequía sin aspersión de ácido salicílico, presentando menor cantidad de clorofila en el tejido. Las plantas bajo estrés salino no mostraron diferencias comparándolas con los controles. Figura 9.B

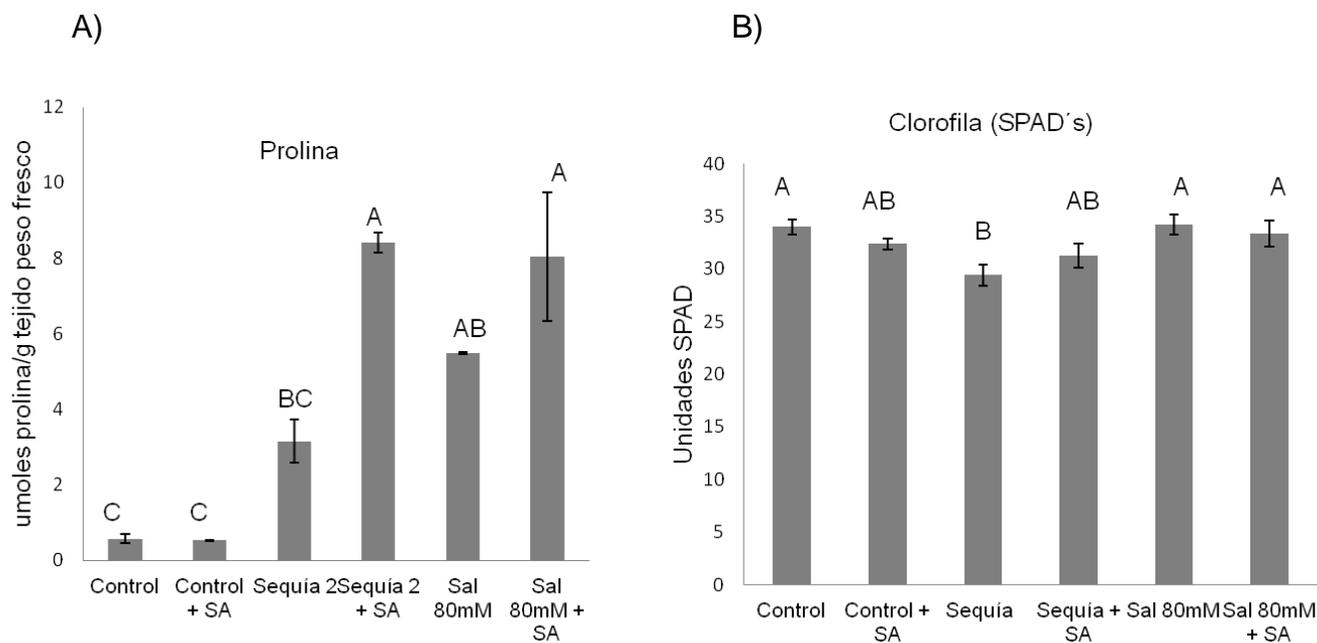


Figura 9. Cuantificación de prolina y clorofila. A) contenido de prolina, resultados expresados como µmoles de prolina por gramo de muestra. B) contenido de clorofila, determinaciones SPAD. Las barras de error representan el error estándar y las letras los resultados del análisis estadístico por el método de Tukey HSD, letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos.

VI.8 Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se relaciona con el contenido de metabolitos secundarios activos presentes en el tejido. Para abordar este análisis se calcularon la concentración de antioxidantes presentes en el tejido como µmoles equivalentes de trolox por miligramo de muestra, el porcentaje de DPPH degradado por tratamiento y el *t*-EC50, que es un parámetro usado para evaluar la eficiencia en la degradación de DPPH calculando el tiempo que tarda en degradarse el 50% de DPPH, a menor *t*-EC 50 más eficiente se considera la degradación del compuesto oxidante. Los resultados obtenidos se relacionan directamente con la

concentración de fenoles y flavonoides. Las gráficas de concentración de antioxidantes equivalentes a trolox y de porcentaje de DPPH degradado siguen la misma tendencia que las gráficas de contenido de fenoles y flavonoides.

En los análisis anteriores se pudo observar en las plantas del grupo control mayor concentración de fenoles y flavonoides en las plantas tratadas con ácido salicílico, viéndose esto reflejado en la concentración de antioxidantes equivalentes a trolox y por consiguiente una mayor degradación de DPPH en las plantas tratadas con SA. En las plantas sometidas a sequía durante el periodo de estrés se aprecia una baja concentración de antioxidantes en las plantas no tratadas y una concentración similar a las del control en las plantas tratadas. En este mismo grupo se aumenta la concentración de antioxidantes durante el periodo de recuperación del estrés.

En el grupo de plantas sometidas a salinidad 80mM se observó una menor concentración de antioxidantes y una menor degradación en las plantas que fueron tratadas con ácido salicílico, sin embargo las plantas no tratadas sometidas a salinidad presentaron una alta degradación de DPPH correlacionada con la alta concentración de antioxidantes presentes en los tejidos. Estos datos se muestran en la figura 10 A y B.

El tratamiento más eficiente para degradar la mayor cantidad de DPPH fue el de las plantas sometidas a salinidad 80mM sin aspersion de SA seguido por las plantas en periodo de recuperación de sequía tratadas con ácido salicílico. Es importante resaltar que las plantas sometidas a sequía durante el periodo de estrés sin tratamiento con ácido salicílico presentaron poca concentración de antioxidantes pero una eficiencia mayor para degradar DPPH que las plantas tratadas con SA pues presentaron un t -EC50 menor, como se muestra en la figura 10.C. En el cuadro 4 se presenta un resumen de los datos de capacidad antioxidante.

VI.5 Evaluación de expresión de genes de resistencia.

Se realizó un análisis bioinformático para identificar secuencias reportadas de RNA mensajero de lechuga (*Lactuca sativa*) en la página del NCBI. Se determinó utilizar

las secuencias de los genes fenilalanina amonio liasa (PAL), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) por su participación en reacciones de resistencia a distintos tipos de estrés para evaluar los cambios en expresión genética en relación con estrés abiótico. Se seleccionó el gen betatubulina (β TUB) como control interno. Se diseñaron los oligonucleótidos respectivos para cada gen usando los programas Genius, AmplifX y Serialcloner y se evaluaron realizando reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) virtuales en los programas AmplifX y Serialcloner. De este análisis se obtuvieron fragmentos esperados de entre 340 y 550 pares de bases. Las secuencias de los oligonucleótidos y el tamaño de los fragmentos esperados se muestran en el cuadro 5. Posterior a la evaluación virtual de los oligonucleótidos se estandarizaron las condiciones de temperatura y mezcla de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa. La estandarización de la técnica se realizó con DNA genómico de lechugas del tratamiento control. Las condiciones de temperatura se muestran en la figura 11. Los oligonucleótidos fueron diseñados con temperaturas de hibridación similares entre genes para facilitar la reacción.

Cuadro 4. Resumen de datos sobre capacidad antioxidante.

Tratamiento	μ mol eq. trolox	% degradación DPPH	<i>t</i> - EC 50
Control	561.339	52.227	34.416
Control + SA	716.136	64.611	32.635
Sequía 1	239.269	24.632	24.224
Sequía 1 + SA	592.543	54.723	32.831
Sequía 2	762.636	68.331	28.664
Sequía 2 + SA	841.564	74.645	21.881
Salinidad 80mM	853.801	75.624	19.767
Salinidad 80mM + SA	600.497	55.360	34.692

Cuadro 5. Oligonucleotidos usados para la reacción en cadena de la polimerasa.

Gen	Oligonucleotidos		pb.
	Sentido 5' a 3'	Antisentido (5' a 3') ⁻¹	
PAL	aatggctcggacctcaaatcgaagtaatc	cgctttgaacatggttggtgactgg	375
CAT	tcggaggagctaatacacagccatgc	acctggatcacagtcctttcacgggttc	544
SOD	gttcaatggcggagggtcatgtgaatc	gcatgctcccaaacgtctatgccaag	309
β-TUB	attcccttggtggtggaacaggatcag	tagatggcgggaagcggtgaggtagc	535

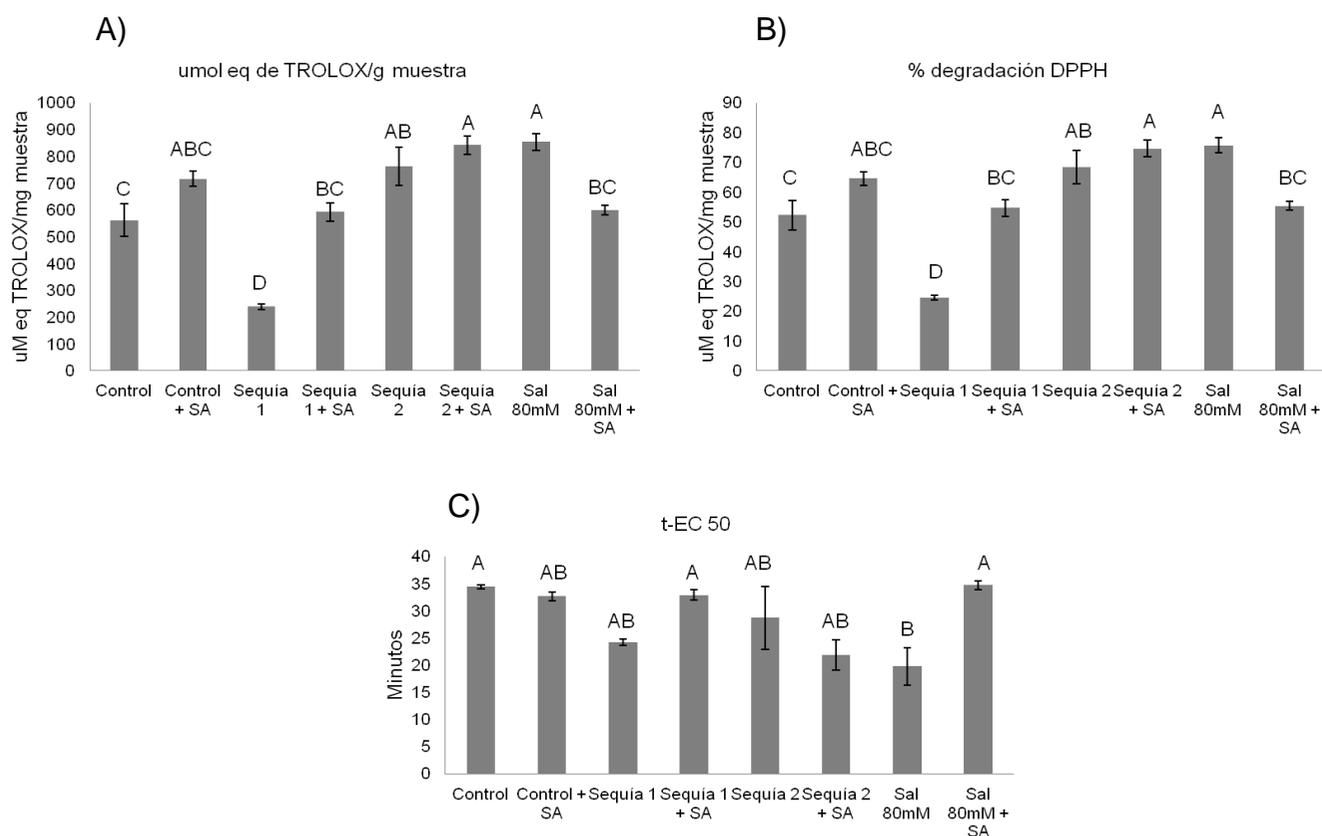


Figura 10. Análisis de capacidad antioxidante. Las barras representan el promedio de las determinaciones de cada grupo. Las barras de error muestran el error estándar y las letras los resultados del análisis estadístico por el método de Tukey HSD, se usó un valor α de 0.05. Letras diferentes entre grupos indican diferencias estadísticamente significativas. A) Concentración de compuestos antioxidantes equivalentes de trolox, expresado como μ moles equivalentes de trolox por mg de muestra. B) Porcentaje de DPPH degradado por tratamiento. Calculado como proporción de la absorbancia de DPPH sin antioxidantes, a partir de la formula $(1 - \text{abs muestra}/\text{abs DPPH}) * 100$. C) Gráfica del t -EC₅₀, expresado en minutos y calculado al interpolar el valor medio de absorbancia en la ecuación de la gráfica. A menor t -EC₅₀ mayor eficiencia para degradar DPPH.

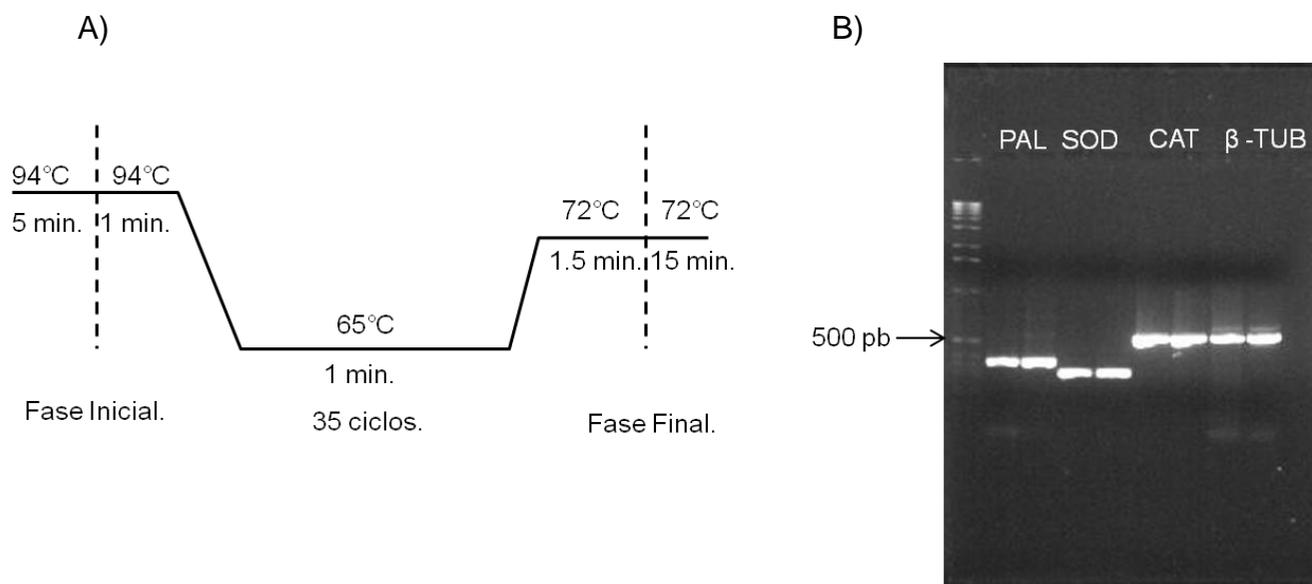


Figura 11. Condiciones de temperatura y fragmentos esperados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) A) Muestra la rampa de temperatura utilizada así como los tiempos de cada ciclo. B) Estandarización de las condiciones de PCR y evaluación de los oligonucleótidos.

Posterior a la estandarización, se extrajo RNA total por el método de trisol, descrito en materiales y métodos y se verificó la integridad del RNA por medio de electroforesis usando geles de agarosa desnaturalizante. El RNA extraído se cuantificó con el programa Gelquant y se procedió a sintetizar DNA complementario, cargando la misma cantidad de RNA en nano gramos para cada tratamiento. El estado del RNA se muestra en la figura 12.

Al realizar PCR se encontraron diferencias en la expresión de todos los genes analizados, siguiendo tendencias similares. La aspersion foliar de ácido salicílico 0.1mM indujo ligeramente la expresión de los tres genes analizados (PAL, CAT y SOD) en condiciones de no estrés para la planta y en sequía. En las plantas sometidas a sequía hubo muy poca expresión en las plantas no tratadas con SA, las bandas no fueron apreciables a simple vista pero fueron detectadas por el programa de cuantificación. Durante el periodo de recuperación de la sequía aumentó considerablemente la expresión de los genes analizados. La expresión de PAL aumentó aproximadamente 10 veces en las plantas no tratadas mientras que

en las tratadas aumentó el doble. De igual manera se incremento la expresión de catalasa y superóxido dismutasa durante el periodo de recuperación del estrés.

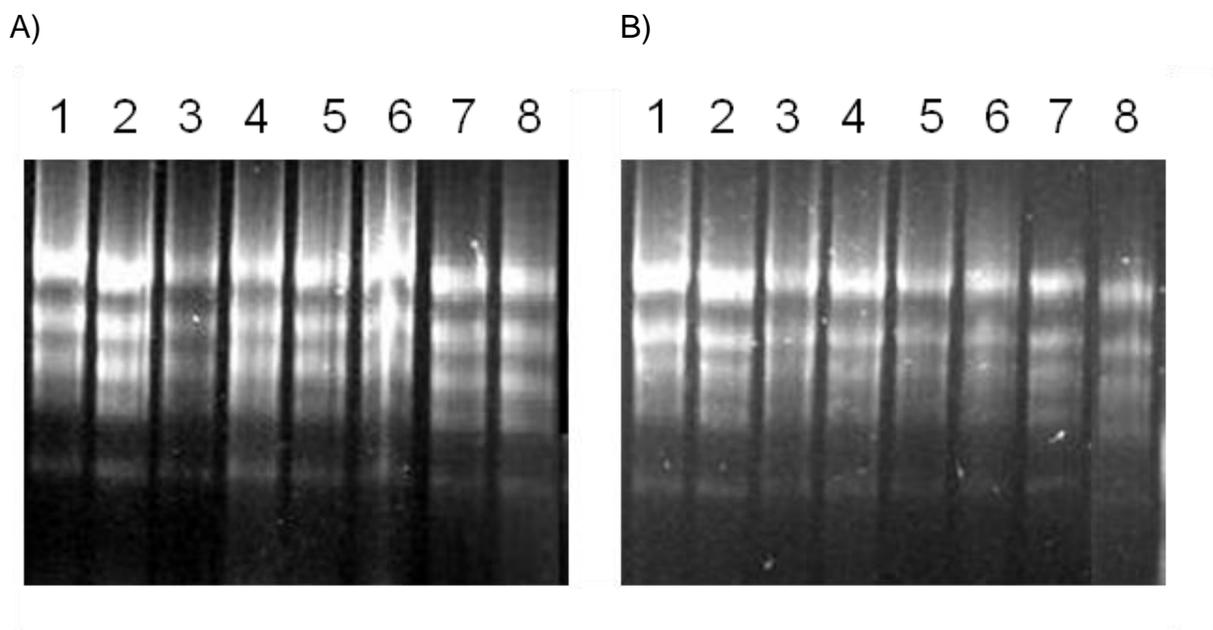


Figura 12. Electroforesis de RNA en gel de agarosa desnaturizante. Carril 1: control, carril 2: control + SA, carril 3: Sequía estrés, carril 4: sequía estrés + SA, carril 5: sequía recuperación, carril 6: sequía recuperación + SA, carril 7: salinidad 80mM, carril 8: salinidad 80mM + SA. A) Muestra la integridad del RNA total extraído de plantas de lechuga. B) Electroforesis de RNA posterior a la cuantificación, se cargó la misma cantidad de RNA en cada poso.

En los tratamientos de sequía fue apreciable el efecto del ácido salicílico exógeno en la expresión de genes, no siendo así en las plantas sometidas a salinidad 80mM, pues se observó una expresión similar en las plantas tratadas y no tratadas con SA a la expresión presente en los controles. Estos resultados se muestran en la figura 13 y en el cuadro 6. No se muestran los resultados del gen beta tubulina, porque no fue posible utilizarlo como control de carga porque al ser un gen estructural, se afecta su expresión de manera proporcional al nivel de estrés,

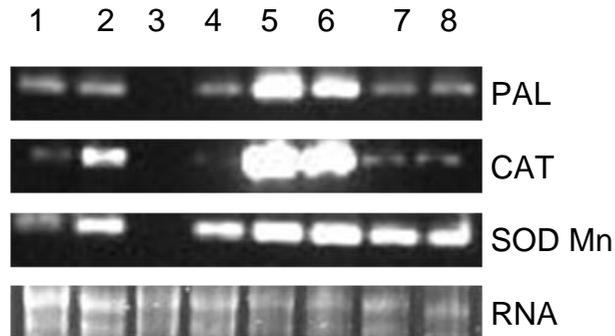


Figura 13. RT-PCR de genes de resistencia a estrés. Los carriles corresponden a los distintos tratamientos. Carril 1:control, carril 2:control + SA, carril 3:sequía, carril 4:sequía + SA, carril 5:sequía recuperación, carril 6:sequía recuperación + SA, carril 7:salinidad 80mM y carril 8:salinidad 80mM + SA. La primer fila corresponde al gen fenilalanina-amonioliasa (PAL), la segunda fila a catalasa (CAT), la tercera al gen superóxido dismutasa (SOD Mn) y la última fila muestra el RNA usado para la síntesis de la primer cadena complementaria.

Cuadro 6. Expresión de genes de resistencia. Cuantificación de los resultados de la PCR.

Expresión genes de resistencia, nano gramos DNA				
Tratamiento	β -TUB	PAL	CAT	SOD Mn
Control	9.6	17.80	7.0	24.20
Control + SA	4.7	20.16	33.66	37.66
Sequía 1	4.1	4.4	4.5	4.7
Sequía 1 +SA	6.0	15.30	9.9	34.33
Sequía 2	31.00	47.33	74.00	45.66
Sequía 2 + SA	15.01	38.33	72.00	48.00
Salinidad 80mM	5.9	14.26	11.20	40.00
Salinidad 80mM + SA	7.8	14.80	10.53	32.60

VII DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo se centra en evaluar la relación de genes inducidos por estrés y ácido salicílico con la producción de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante, así como el efecto de estos genes con la resistencia a distintos tipos de estrés abiótico. En plantas sometidas a sequía se observó la inducción de la enzima PAL en plantas tratadas con SA y se determinó un mayor contenido de fenoles y flavonoides así como una mayor capacidad antioxidante, permitiéndole a la planta reponerse más rápidamente de la sequía. Por otro lado, en plantas sometidas a salinidad hubo una menor inducción de la enzima PAL que en las plantas de sequía, la aspersión foliar de ácido salicílico tuvo un efecto negativo en la síntesis de fenoles y flavonoides pues se determinó una menor concentración de estos compuestos en las plantas tratadas con SA, sin embargo se observó inducción del gen SOD, lo que muestra que el mecanismo inducido para la tolerancia a salinidad se relaciona con el estrés Oxidativo generado por la acumulación de iones Na^+ en tejido.

VII.1 La aspersión foliar de ácido salicílico 0.1mM aumenta la turgencia celular en condiciones estresantes para la planta.

Al someter a las plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) a condiciones de sequía se observó una reducción en el crecimiento de las plantas, presentaron menor altura y menor proporción de biomasa en comparación con el control. Cuando las plantas se enfrentan a estrés hídrico, el contenido de agua dentro de la planta disminuye considerablemente, la célula se encoge y la pared celular se relaja. Este cambio en el volumen disminuye la presión de turgencia y aumenta la concentración de solutos en la célula (Zeiger y Taiz, 2007). Al reducirse la presión de turgencia se afectan las actividades dependientes de ella, como el crecimiento, desarrollo celular y actividades metabólicas como fotosíntesis. Al disminuir el desarrollo celular se reduce la superficie de área foliar, disminuyendo así la pérdida de agua por transpiración ayudando a la planta a usar al máximo el suministro de agua disponible. El objetivo de los mecanismos para resistir el déficit de agua es

mantener el potencial de agua en los tejidos (Janda y col., 2007, Harb y col., 2010). Las plantas tratadas con aspersión foliar de ácido salicílico presentaron una altura y peso fresco comparable al de los controles y mayor biomasa en comparación con las plantas del mismo tratamiento sin aspersión de SA. Además presentaron un periodo de recuperación del estrés menor, lo que nos indica que los mecanismos para mantener la turgencia celular y mantener así las funciones celulares fueron inducidos en alguna manera por el ácido salicílico. Las plantas tratadas con SA presentaron síntomas de sequía menos severos que las plantas no tratadas, como se observa en la figura 6. Sin embargo no se tienen datos de peso fresco y seco de las plantas durante la etapa estrés para determinar el contenido de agua en el momento del estrés.

VII.2 Efecto de la aspersión de ácido salicílico en condiciones de salinidad.

El estrés salino afecta de 2 formas el equilibrio fisiológico, generando diferencias de presión osmótica en la raíz impidiendo la absorción normal de agua generando un “estrés hídrico por falta de agua” inducido por sales así como también por acumulación de iones Na^+ generando concentraciones tóxicas en los tejidos (Ahmed y col, 2010). Las altas concentraciones de Na^+ desequilibran el potencial iónico fomentando la entrada de iones Cl^- , inhiben la función de algunas enzimas y reducen la fotosíntesis induciendo la creación de ROS (Munns y Tester, 2008). Los mecanismos de tolerancia a salinidad se pueden agrupar en 3 categorías. La primera es una respuesta a la presión osmótica que impide la absorción de agua por la raíz, esta respuesta está enfocada a mantener el potencial de turgencia en los tejidos. El segundo mecanismo se enfoca a evitar la entrada de iones Na^+ a la planta, por medio de exclusión en las raíces minimizando la concentración en hojas. El tercer mecanismo se enfoca en regular las concentraciones tóxicas en el citoplasma, esto ocurre por medio de la compartimentalización de iones en vesículas, la expulsión de iones y también la acumulación de compuestos protectores de bajo peso molecular (Munns y Tester, 2008). En las plantas sometidas a estrés salino durante este experimento fue visible el efecto osmótico de la solución salina 40 y 80mM. Las plantas sometidas a salinidad 40mM

presentaron una inhibición en el crecimiento y menor peso fresco y seco que las plantas tratadas con SA. La aspersión de SA disminuyó la pérdida de biomasa causada por el estrés por déficit de agua inducido por la concentración 40mM de NaCl. Ambos tratamientos tratados y no tratados con SA tuvieron una acumulación mayor de agua en tejido en comparación con los controles. Las plantas sometidas a un nivel mayor de salinidad también presentaron disminución de crecimiento pero en estas plantas fue observable el efecto de toxicidad por iones Na^+ en las hojas pues presentaban señales de senescencia. Hubiera sido conveniente evaluar las señales de senescencia de manera más puntual para determinar el efecto del ácido salicílico en la acumulación de iones Na^+ . Con este nivel de estrés no fueron apreciables diferencias claras entre plantas tratadas y no tratadas con ácido salicílico foliar. Las plantas no tratadas presentaron mayor altura pero menos peso fresco y seco, en comparación con las tratadas. Se ha reportado en trabajos previos que el efecto protector del ácido salicílico en distintos tipos de estrés abiótico depende del estado de la planta al momento de la aplicación así como también de la forma de aplicación y concentración (Horváth y col., 2007, Munns y Tester, 2008).

VII.3 Efecto del ácido salicílico en la acumulación de compuestos osmoprotectores.

Mantener niveles óptimos de turgencia en los tejidos es algo clave para las plantas en condiciones de estrés. Esto se puede lograr con la acumulación intracelular de compuestos de bajo peso molecular, como prolina para mantener un ajuste osmótico adecuado para la célula (Harb y col., 2010). Las plantas sometidas a estrés durante este estudio mostraron mayor concentración de prolina en comparación con los controles y una aún mayor concentración al combinar el estrés con ácido salicílico. Esto se debe a que el ácido salicílico desencadena cascadas de señalización que tienen como objetivo encender genes de resistencia a estrés (Yu y Jez, 2008). Hubiera sido interesante medir la expresión de otras enzimas involucradas en la ruta fenilpropanoide para determinar el mecanismo para la acumulación en prolina en diferentes tipos de estrés. En sequía se indujo PAL y síntesis de fenoles y flavonoides con ácido salicílico así como la

acumulación de prolina, sin embargo en sequía no aumento la síntesis de PAL ni concentración de antioxidantes con la aspersion de ácido salicílico, pero si la acumulacion de prolina.

VII.4 Efecto del ácido salicílico en la síntesis de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.

Las plantas cuentan con mecanismos específicos para responder al estrés oxidativo, como los son el mecanismo enzimático y no enzimático. Dentro del mecanismo no enzimático se agrupan el ácido ascórbico, glutatión, fenoles y flavonoides, entre otros metabolitos secundarios (Sarvaajet y Narendra, 2010). Como se ha mencionado antes, la enzima PAL es la enzima clave que divide el metabolismo primario del secundario, su importancia radica en que esta enzima inicia la síntesis de toda una división de compuestos con actividades específicas dependiendo de su estructura. Estos compuestos incluyen a los fenilpropanoides que son precursores de flavonoides, coumarinas, isoflavonoides, estibenos y otros compuestos fenólicos (Junli y col., 2010). Estos compuestos tienen importantes funciones en la naturaleza como protectores contra patógenos, luz UV, moléculas regulatorias en la transducción de señales, de comunicación con otros organismos y antioxidantes (Ferrer, 2008). Muchos productos de la ruta fenipropanoide tienen función antioxidante porque cuentan con múltiples grupos hidroxilo y dobles enlaces, permitiéndoles interactuar con radicales libres e iones oxidantes (Yu y Jez, 2008).

La síntesis de PAL puede ser inducida por múltiples estímulos ambientales, aumentando de esta manera la biosíntesis de fenilpropanoides. La aspersion foliar de ácido salicílico amentó ligeramente la expresion de PAL en el grupo control, relacionándose directamente con el mayor contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en el tratamiento control tratado con SA. La mayor diferencia entre las plantas sometidas a sequía consistió en la rápida recuperacion del estrés de las plantas tratadas con SA, relacionado con el aumento de expresion de PAL y contenido de compuestos antioxidantes. Durante la etapa de

recuperación, estas plantas mostraron una mayor eficiencia para degradar DPPH que las plantas no tratadas con SA, aún cuando ambos tratamientos presentaron niveles similares de antioxidantes en el periodo de recuperación.

En el grupo salinidad 80mM se determinó una menor expresión de PAL en ambos tratamientos en comparación con los controles. Sin embargo, el tratamiento no tratado tuvo una alta concentración de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante, además de alta expresión de SOD. Estos datos suponen respuesta a niveles tóxicos de iones en tejidos. Las plantas tratadas con SA aunque presentaron mayor peso fresco y seco, tuvieron menor capacidad antioxidante que las no tratadas. Con esta concentración de NaCl el ácido salicílico contribuyó a aumentar la turgencia en tejido pero no indujo la síntesis de PAL y redujo la síntesis de fenoles y flavonoides.

VII.5 Efecto del ácido salicílico en la inducción de genes de resistencia a estrés.

En artículos publicados se describe el rol del ácido salicílico como participante en la señalización e inductor de factores de transcripción en condiciones de estrés biótico y abiótico. Inducen genes de proteínas relacionadas a patógenos en estrés biótico y genes para adaptación o tolerancia a estrés abiótico, como por ejemplo genes para síntesis de enzimas con capacidad antioxidantes, polifenoles y de otros mecanismos de señalización (Klessing y col., 2000, Agrios, 2005, Horváth y col., 2007, Janda y col., 2007, Zhixiang y col., 2009, Sarvaajet y Narendra, 2010). En condiciones de estrés abiótico el ácido salicílico induce la reacción hipersensible fomentando la síntesis de ROS's (Mur y col., 2008). En situaciones de estrés abiótico el SA puede tener efectos perjudiciales o benéficos para la planta, dependiendo en gran manera de la concentración (Klessing y col., 2000, Horváth y col., 2007). En bajas concentraciones induce cantidades moderadas de ROS's que desencadenan estrés oxidativo moderado, lo que activa mecanismos naturales para contrarrestar los compuestos oxidantes, de esta manera cuando se presentan factores de estrés abiótico la planta está preparada para contrarrestar los efectos oxidantes, producto de la interrupción de la interrupción de las funciones

fisiológicas normales, permitiéndole restituir el equilibrio fisiológico (Apel y Hirt, 2004, Sarvaajet y Narendra, 2010). En los experimentos realizados en este trabajo, fue observable el efecto del ácido salicílico al inducir la expresión de PAL, CAT y SOD en condiciones de no estrés para la planta, figura 9. Las plantas control tratadas con SA mostraron una mayor expresión de estos genes. Este efecto también fue apreciable en las plantas del grupo sometido a estrés por déficit de agua durante la etapa de estrés. Al aplicar el periodo de recuperación la expresión de estos genes aumentó en ambos tratamientos, pero de mayor manera en las plantas no tratadas pues en las que fueron tratadas ya se tenía niveles altos de expresión. Las plantas tratadas mostraron un periodo más corto de recuperación de la sequía. En el tratamiento de salinidad no se apreciaron diferencias en los niveles de expresión de estos genes, sin embargo es notoria la expresión de la enzima SOD para contrarrestar los efectos de toxicidad en las hojas.

VIII CONCLUSIÓN.

Los resultados obtenidos indican que la aspersión foliar de ácido salicílico en baja concentración puede encender mecanismos de tolerancia o resistencia a estrés abiótico. Esto ocurre por su participación en la transducción de señales teniendo como fin la expresión de genes involucrados en distintas rutas que le permiten a las plantas resistir el estrés. Sin embargo, por la participación del ácido salicílico en reacciones de defensa a estrés biótico, puede tener un efecto favorable o perjudicial para la planta, dependiendo en manera importante de la concentración de SA que se utilice para inducir los mecanismos de defensa. Otro factor importante para lograr el efecto protector del SA exógeno es el tipo de estrés al que se somete la planta así como del estado fisiológico en que se encuentre cuando se aplique el tratamiento de SA. Fue posible observar esto con al comparar visualmente las plantas, las diferencias en expresión de los genes analizados, el contenido de fenoles, flavonoides, prolina y capacidad antioxidante entre los grupos sometidos a sequía y salinidad pues se apreciaron efectos diferentes entre los factores de estrés..

VII. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Quinta edición. ELSEVIER, Burlington EUA: 4-8, 23-27, 54-60

Ahmed, AM., Kharusi, L., Al-Miqbali, H., Khan, M. **2010.** Effects of Salinity Stress on Growth of Lettuce (*Lactuca sativa*) under Close-recycled Nutrient Film Technique. International Journal of Agriculture and Biology. Vol. 12: 377-380

Arias, M., Angarita, MJ., Aguirre, M., Restrepo, JM., Montoya, C. **2008.** Strategies for the Improvement of Secondary Metabolites Production in Plant Cell Cultures. Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellin. Universidad Nacional de Colombia. Vol. 62: 4881-1895

Apel, K., Hirt, H. **2004.** Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction. Plant Biology. Vol. 55: 373-399

Apostol, I., Heinstein, P., Low, P. **1989.** Rapid stimulation of an Oxidative Burst during elicitation of Cultures Plant Cells. Plant Physiology vol. 90: 109-116

Asada, K. 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and their functions. Plant Physiology Vol. 141: 391-396

Bate, N.J., Orr, J., Weiting, N., Meromi, A., Nadler, H.T., Doerner, P., Dixon, R., Lamb, C., Elkind, Y. **1994.** Quantitative relationship between phenylalanine ammonia lyase levels and phenylpropanoids accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol.91 : 7608 - 7612.

Craig, W.J. 2009. Health effects of vegan diet. The American Journal of Clinical Nutrition. Vol. 89: 1627-1633.

Dangl, J. Jones, J. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature Vol. 411: 826 - 833

Del Río, L., Sandalio, L., Corpas, F., Palma, J.M., Barroso, J.B. **2006.** Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging and Role in Cell Signaling. Plant Physiology Vol. 141: 330-335

Dixon, R., Palva, N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. American Society of Plant Physiologists, Vol. 7: 1085 -1097

Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürvel, A., Aktas, L., Gesheva, E. 2008. Stress Protective Role of Secondary Metabolites: Diversity of Functions and Mechanism. Plant Physiology. Vol. 34: 67-78

Ferrari, S. 2010. Biological Elicitors of Plant Secondary Metabolites: Mode of Action and Use in the Production of Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology Springerlink. Vol. 698: 152-166

Ferrer, J.L., Austin, M.B., Stewart, C., Noel, J.P. 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiology and Biochemistry. Vol. 46: 356–370.

Foyer, C., Noctor, G. 2005. Oxidant and Antioxidant Signaling in Plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant Cell and Environment Journal. Vol. 28: 1056-1071

Farag, M., Huhman, D., Dixon, R., Summer, Y., 2008. Metabolomics Reveals Novel Pathways and Elicitor-Specific Responses in Pheylpropanoid and Isoflavonoid Biosynthesis in *Medicago Truncatula* Cell Cultures. Plant Physiology. Vol. 146: 387-402.

Gill, S., Tuteja N. 2010 Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. Plant Physiology and Biochemistry Journal. Vol. 48:909-930

Grene, R. 2002. Oxidative Stress and Acclimatation Mechanism in Plants. American Society of Plant Biologist. Vol. 1: 2-20

Groover, A., Kapoor, A., Lakshimi, O., Agarwal, S., Sahi, C., Katiyar, S., Dubey, H. 2001. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. Plant physiology Plant molecular biology. Vol. 80: 206-216.

Hai Liu, R. 2004. Potential Synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. The Journal of Nutrition. Vol. 20: 3479-3485.

Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M., Pereira, A. 2010. Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimatation in Plant Growth. Plant Physiology. Vol. 154: 1254-1271

Hyun, J.K., Kwon, D.Y., Yoon, S.H. 2009. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Segunda edición. CRC press Tylor and Francis Group, Pacific Northwest : 249 – 258.

Horvath, E., Szalai, G., Janda, T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid. Journal of Plant Growth Regulation. Vol. 26: 290-300

Janda, T., Horvath, E., Szalai, G., Paldi, E. 2008. Salicylic Acid, A Plant Hormone. Primera edición. Springer, Alemania: 91:150

Junli, H., Min, G., Zhibing, L., Baofang, F., Kai, S., Yan-Hong, Z., 2010 Functional Analysis of the Arabidopsis PAL Gene Family in Plant Growth, Development and Response to Environmental Stress. Plant Physiology. Vol.143: 1526-1538.

Karlovsky, P. 2008. Secondary Metabolites in Soil Ecology. Primera edición. Springer, Alemania: 1-9

Keller, T., Damude, H., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R., Lamb, C. 1998 A plant homolog of the Neutrophil NADPH Oxidase GP91^{phox} Subunit Gene Encodes a Plasma Membrane Protein with Ca²⁺ binding motifs. The Plant Cell Journal. Vol 10: 255-266

Klessig, D., Durner, J., Noad, R., Navarre, D., Wednehenne, D. 2000. Nitric Oxide and Salicylic Acid signaling in plant defense. Proceedings of the National Academy of Science PNAS USA Vol. 97: 8849-8855

Korkina, L.G. 2007 Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defence to human health. Cellular Molecular Biology. Vol.1: 15 - 25

Liu, X., Williams, C., Nemacheck, J., Wang, H., Subramanyam, S., Zheng, C., Chen, N. 2010 Reactive Oxygen Species are Involved in Plant Defense against Gall Midge. Plant physiology. Vol. 152: 985-999

LPI. 2010. Linus Pauling Institute. 4 de Febrero de 2011.

Mhamadi, A., Hagger, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, L., Saindrenand, P., Gouia, H., Issakidis, E., Pierre, J., Noctor, G. 2010. Arabidopsis Glutathione Reductasa1 Plays a Crucial Role in Leaf Response to Intracellular Hydrogen Peroxide and in Ensuring Appropriate Gene Expression through both Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling Pathway. Plant Physiology. Vol. 153: 1144-1160

Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., González-Chávira M.M., Ocampo-Velazquez, R., Herrera-Ruiz, G., Chapa-Oliver, A.M., Guevara-González, R.G. 2010. Use of Elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9: 9155-9162

Menker, F., Champion, A., Kijne, J.W., Memelink, J. 1999. A novel Jasmonate and Elicitor Responsive Element in the Periwinkle Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Str Interacts with a Jasmonate and Elicitor Inducible AP2 Domain Transcription Factor , *Orca 2. European Molecular Biology Organization Journal EMBO*. Vol. 18: 4455-4463

Miller, G., Suzuki, N., Rizhsky, L., Hegie, A., Koussevitzky, S., Mittler, R. 2007. Double Mutant Deficient in Cytosolic and Thylakoid Ascorbate Peroxidase Reveal a Complez Mode of Interaction between Reactive Oxygen Species, *Plant Development and Response to Abiotic Stresses. Plant Physiology* Vol. 144: 1777-1785

Mittler, R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Sciences. ELSEVIER*. Vol. 11: 15-19

Munns, R., Tester M. 2008 Mechanism of Salinity Tolerance. *The Annual Review of Plant Biology Journal*. Vol. 59: 651-681

Mur, L., Laarhoven, L., Harren, F., Hall, M., Smith, A. 2008. Nitric Oxide Interacts with Salicylate to regulate Biphasic Ethylene Production during the Hypersensitive Response. *Plany Physiology*. Vol. 148: 1536-1543

Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J.P., Rouhier, N. 2006. Plant Glutathione Peroxidases Are Functionals Peroxiredoxines Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and Abiotic Stress. *Plant Physiology* Vol. 142: 1364-1379

Noel, J., Austin, M., Bomati, E.K., 2005. Structure-Function relationships in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Biology ELSEVIER* Vol. 8: 243-253

Oomah, B.D., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. 2005 Phenolics and Oxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 85: 935-942

- Ryder, E.J., 1979.** Leafy salad vegetables. Avi Publishing Co. West Port, EUA: 15-22
- Sarvaajet, SG., Narendra. T. 2010.** Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol.48:909-930.
- Shinosaki, K., Yamaguchi, K. 2006.** Gene Network Involved in Drought Stress Response and Tolerance. *Journal of Experimental Botany* Vol. 58: 221-227
- SAGARPA. 2009.** Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Agosto 12 de 2011
- Scholthof, K. 2007.** The disease triangle, the environment and society. *Nature*. Vol. 5: 152-156
- Self Nutrition Data. 2009.** www.nutritiondata.self.com
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., Mittler, R. 2008.** Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum Journal*. Vol. 132: 199 - 208
- Vanacker, H., Carver, T., Foyer, C. 2000.** Early H₂O₂ Accumulation in Mesophyll Cells Leads to the induction of Glutathion during the Hyper Sensitive Response in Barley-Powdery Mildew Interaction. *Plant Physiology* Vol. 123: 1289-1300.
- Vallad, G., Goodman, R. 2004.** Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Sciences* Vol. 44: 1920-1934
- Wink, M. 2003.** Evolution of secondary metabolites from an ecological and phylogenetic perspective. *Phytochemistry Journal*. Vol. 64: 03-19
- Younis, M.E., Hasaneen, M., Toury, S. 2009.** Plant growth, Metabolism and Adaptation in relation to stress conditions. XXIV Salinity-biofertility interactive effects on proline, glycine, and various antioxidants in *Lactuca sativa*. *The Plantomics Journal* Vol. 2: 197 -205
- Yu, O., Jez, J.M. 2008.** Nature's Assembly lines: biosynthesis of simple Phenylpropanoids and Poliketides. *The plant Journal*, Vol.54: 750 -762
- Zeiger, E., Taiz L. 2007.** *Plant Physiology 4ta Edición* Sinauer Associates. Inc., Publisher. Sunderland, Massachusetts. USA. p.p 639 - 672

Zixiang, C., Zuyu, Z., Junli, H., Zhibing, L., Baofang, F. 2009. Biosynthesis of Salicylic Acid in Plants. *Plant Signaling and Behavior*. Vol. 4:496-496.

Zsigmond, L., Rigo, G., Szarka, A., Szekely, G., Ötvös, K., Darula, Z., Medzihradzky, K., Koncz, C., Koncz, Z., Szabados, L. 2008. Arabidopsis PPR40 Connects Abiotic Stress Response with Mitochondrial Electron Transport. *Plant Physiology* Vol. 146: 1721-1737