

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
"Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre"

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**ESTRÉS OXIDATIVO Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA
EN DAÑO POR FRÍO EN NOCHEBUENA**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

ALEJANDRO MANELIK GARCÍA LÓPEZ

Chapingo, Estado de México. Junio de 2009.



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Instituto de Horticultura

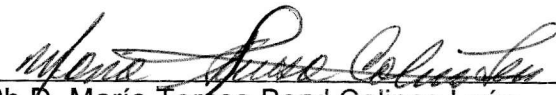
**ESTRÉS OXIDATIVO Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN DAÑO POR
FRÍO EN NOCHEBUENA**

Tesis realizada por **ALEJANDRO MANELIK GARCÍA LÓPEZ** bajo la dirección
del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

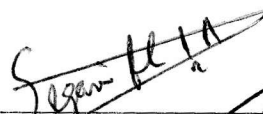
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

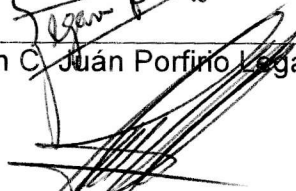
DIRECTORA


Ph.D. María Teresa Beryl Colinas León

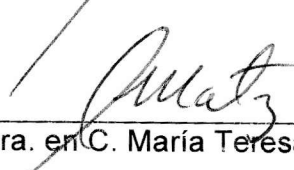
ASESOR


Dr. en C. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR


Dr. en C. Irán Alia Tejacal

ASESOR


Dra. en C. María Teresa Martínez Damián

**LECTOR
EXTERNO**


Dra. en C. Dolores Vargas Álvarez

DEDICATORIA

A **DIOS**, por darme vida y salud para poder realizar las actividades que me he propuesto.

A mi esposa, **KAREN C. CABALLERO MONTES**. Por su amor incondicional, cariño y compromiso.

A mis padres, **RAYMUNDO** y **SANDRA**. Esperando que este pequeño paso sea motivo de satisfacción y orgullo.

A mi hermano, **YOSAFAT**. Es de sabios equivocarse, pero el que se levanta y sigue su camino renace como el ave de fuego. Recuerda, la abejita tiene miel en su pancita.

A la familia Martínez García, **CITLALI, JESÚS** y mi sobrino **YAMÍN AQUILES**. Por su apoyo, esperando dar un buen ejemplo a mi sobrino.

A la familia Caballero Montes, **MOISÉS, ISABEL, HELEN Y EDWIN**. Por su apoyo total hacia su nuevo "miembro".

A la familia **AYALA GARCÍA**, mis tíos. Por su cariño, hospitalidad y apoyo total e incondicional que siempre me brindan.

A mis colegas y compañeros del Doctorado en Ciencias en Horticultura, principalmente a la generación 2006-2008. ¡Y arriba los plebes!

It's not who i am underneath but what i do that defines me.

Bruce Wayne, 2005.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**, particularmente al personal que conforma el Posgrado en Ciencias en Horticultura del Departamento de Fitotecnia.

Al **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)**, el cual nuevamente confió y apoyó con los gastos para llevar a cabo satisfactoriamente la culminación de mis estudios.

A mi comité asesor conformado por:

Ph. D. MARÍA TERESA BERYL COLINAS LEÓN.

Quien creyó en mi persona y en el proyecto que se desarrollo y que sin su apoyo incondicional no hubiera llegado a buen término.

Dr. en C. JUÁN PORFIRIO LEGARIA SOLANO.

Por ser más que un profesor, sino un mentor. Gracias por compartir su conocimiento.

Dr. en C. IRÁN ALIA TEJACAL.

Por sus consejos, apoyo y amistad durante mis estudios.

Dra. en C. MARÍA TERESA MARTÍNEZ DAMIÁN.

Por su don de servicio y siempre recibir a todos con una sonrisa.

Dra. en C. DOLORES VARGAS ALVAREZ.

Por fungir como lector externo del presente trabajo y su amistad.

Al los laboratoristas **CECILIO BAUTISTA BAÑUELOS** y **ÁNGELA BARRERA**. Por su ayuda en todo momento.

DATOS BIOGRÁFICOS

Alejandro Manelik García López es originario de Culiacán de Rosales, Sinaloa. Realizó estudios en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa obteniendo el título de Licenciado en Ciencias Agropecuarias en el Área de Horticultura en el 2002 con el trabajo de tesis "Calidad poscosecha en frutos de pepino (*Cucumis sativus* L.) tratados con ceras", bajo la dirección de la Dra. en C. María Dolores Muy Rangel. Posteriormente fue aceptado para realizar estudios de Maestría en 2003 en el Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo. Bajo la dirección de la Ph. D. María Teresa Beryl Colinas León realizó el trabajo de tesis "Crecimiento y pigmentación en nochebuena en dos localidades". Al terminar sus actividades de posgrado laboró en la empresa LABSA S.A. de C.V. como laboratorista y encargado en la producción de productos biológicos para el control principalmente de patógenos del suelo. En 2006 ingresó al programa doctoral del Instituto de Horticultura bajo la tutela nuevamente de la Ph. D. Colinas León.

ESTRÉS OXIDATIVO Y MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN DAÑO POR FRÍO EN NOCHEBUENA

OXIDATIVE STRESS AND PROGRAMMED CELL DEATH BY CHILLING INJURY IN POINSETTIA

Alejandro Manelik García-López¹; Ma. Teresa Colinas-León².

RESUMEN

Plantas de nochebuena de las variedades Red Elf, Cinammon Star y Da Vinci antes del tapado (sin inducción floral) y en fecha comercial (planta inducida) fueron expuestas a 7, 2, 0 °C (96% HR) y ambiente (23 °C; 50% HR) por 72 horas. Las variables evaluadas fueron: color, actividad enzimática de la chalcona isomerasa, producción de etileno y CO₂ en hojas separadas, actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa, superóxido dismutasa, proteasa, peroxidación lipídica, fragmentación de ADN y expresión de genes de respuesta a frío en la variedad Da Vinci expuesta a 0 °C por 72 horas. Antes del tapado: la luminosidad y la cromaticidad aumentaron una vez expuestas las variedades a baja temperatura hasta la fecha comercial; el °Hue disminuyó en todas las variedades en la fecha comercial. La actividad de la chalcona isomerasa aumentó conforme disminuyó la temperatura de exposición. La respiración aumentó después de la exposición a baja temperatura, pero disminuyó en la fecha comercial; la producción de etileno se mantuvo similar durante todo el estudio. La actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa disminuyó al someter las variedades a baja temperatura (≤ 2 °C), mientras que la peroxidación lipídica aumentó después del tratamiento a frío. La fragmentación del ADN se observó en todas las variedades y en las bajas temperaturas, además la actividad de la proteasa aumentó mientras más disminuía la temperatura de exposición. En la fecha comercial: la luminosidad se vio afectada solo a 0 °C, mientras que la cromaticidad y el °Hue no fueron afectados a baja temperatura. La actividad de la chalcona isomerasa fue afectada a 2 y 0 °C. La respiración se vio disminuida, mientras que la producción de etileno aumentó ligeramente después de ser sometidas las variedades a baja temperatura. Las enzimas oxidativas y la peroxidación lipídica redujeron su actividad a baja temperatura, solo las variedades mostraron diferencia estadística antes del tratamiento. La fragmentación de ADN se observó en todas las variedades así como en las temperaturas de exposición. La actividad de la proteasa aumentó a 7, 2 y 0 °C. Mediante hibridación sustractiva y supresora se lograron obtener 3 genes de respuesta a frío en la variedad Da Vinci expuesta a 0 °C por 72 horas.

Palabras clave: Daño por frío, enzimas oxidativas, muerte celular programada, genes de respuesta a frío.

ABSTRACT

Poinsettia plant varieties Red Elf, Cinammon Star and Da Vinci without floral induction and commercial date (induced plant) were stored at 7, 2, 0 °C (96% RH) and 23 °C (50 % RH) for 72 hours. The variables considered were: color, chalcone isomerase enzymatic activity, CO₂ and ethylene production in cut leaves, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase and protease enzymatic activities, lipid peroxidation, DNA fragmentation and cold responsive gene expression in Da Vinci variety at 0 °C for 72 hours. Without floral induction: brightness and chroma increased once exposed the varieties to low temperature until commercial date; °Hue decreased in all the varieties at the commercial date. Chalcone isomerase activity arise during low temperature exposure. Respiration increased after low temperature exposition but decreased at commercial date; ethylene production remained relatively constant during the study. Ascorbate peroxidase and superoxide dismutase enzymatic activities decreased when the varieties were stored at less than 2 °C, while lipid peroxidation increased after low temperature exposure. DNA fragmentation was observed in varieties to low temperature, also protease enzymatic activity increased while low temperature decrease. Commercial date: brightness was only affected at 0 °C, while chroma and °Hue were not affected by low temperature. Chalcone isomerase activity was influence at 2 and 0 °C. Respiration rate decreased, while ethylene production increased slightly after exposure to low temperature. Oxidative enzymes and lipid peroxidation reduced their activity at low temperature, the varieties only showed differences before treatment. DNA fragmentation was shown in all varieties and at low temperatures. Protease activity increased at 7, 2 and 0 °C. By Suppression subtractive hybridization method, 3 cold responsive genes were obtained in the Da Vinci variety at 0 °C for 72 hours.

Key words: Chilling injury, oxidative enzymes, programmed cell death, cold responsive genes.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo	3
1.2. Hipótesis	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Origen de la nochebuena	4
2.1.1. Descripción botánica	5
2.1.2. Desarrollo de cultivares	6
2.1.3. Requerimientos de la nochebuena	9
2.1.3.1. Luz	9
2.1.3.2. Temperatura	10
2.1.3.3. Riego	11
2.1.3.4. Nutrición	12
2.1.4. Manejo durante el transporte	13
2.2. Tipos de estrés abiótico	14
2.2.1. Daño por frío	17
2.2.1.1. Síntomas de daño por frío en nochebuena	21
2.2.1.2. Daño por frío con relación a la producción de etileno y CO ₂ en plantas	23
2.2.1.2.1. Etileno	23
2.2.1.2.2. CO ₂	29
2.2.1.3. Ruta de los fenilpropanoides y flavonoides	29
2.2.1.3.1. Chalcona isomerasa	31
2.3. Muerte celular programada en plantas	33
2.3.1. Mecanismo molecular de la apoptosis	34
2.3.2. Marcadores moleculares de apoptosis	38
2.3.3. Tipos de muerte celular en estrés abiótico	41
2.3.4. Muerte celular programada en daño por frío	43
2.3.4.1. Evidencia ultraestructural de PCD durante el daño por frío	47
2.3.4.2. Evidencia fisiológica de PCD durante el daño por frío	49
2.3.4.3. Mecanismo propuesto para la iniciación y propagación de PCD durante el daño por frío	50
2.3.4.4. Inducción de PCD durante el daño por frío	52
2.3.4.5. Proteasas	55
2.3.4.5.1. Clasificación de las proteasas	55
2.3.4.5.1.1. Exoproteasas	56
2.3.4.5.1.1.1. Aminopeptidasas	57

2.3.4.5.1.1.2. Carboxipeptidasas	57
2.3.4.5.1.2. Endopeptidasas	57
2.3.4.5.1.2.1. Serina proteasas	57
2.3.4.5.1.2.2. Aspartico proteasas	58
2.3.4.5.1.2.3. Cisteína proteasas	58
2.3.4.5.1.2.4. Metallo proteasas	59
2.3.4.5.2. Proteasas vegetales	59
2.4. Estrés oxidativo	60
2.4.1. Producción de ROS en células	61
2.4.2. Búsqueda de ROS en células	64
2.4.3. Anulación de la producción de ROS	68
2.4.4. Ruta de transducción de señal de las ROS en plantas	70
2.4.5. ROS como interfase entre estrés biótico y abiótico	75
2.4.5.1. ROS y estrés por temperatura	77
2.4.5.1.1. Estrés por frío y ROS	79
2.4.6. Superóxido dismutasas	81
2.4.6.1. Hierro SODs (Fe SODs)	83
2.4.6.2. Manganeseo SODs (Mn SODs)	85
2.4.6.3. Cobre-zinc SODs (Cu-Zn SODs)	87
2.4.7. Oxilipinas	89
2.4.7.1. Peroxidación de lípidos	90
2.4.7.1.1. Malonilaldehído	94
2.4.8. Ascorbato peroxidasa	96
III. MATERIALES Y MÉTODOS	101
3.1. Desarrollo del estudio	101
3.1.1. Material vegetal	101
3.1.2. Ubicación del estudio	102
3.1.3. Manejo agronómico	102
3.2. Estudio de tolerancia a bajas temperaturas	103
3.2.1. Experimento 1.	103
3.2.2. Experimento 2.	104
3.2.2.1. Descripción de tratamientos	104
3.2.3. Análisis estadístico	105
3.3. Daño por frío	105
3.3.1. Color	105
3.3.2.1. Chacona isomerasa	106
3.3.3. Respiración y producción de etileno	107
3.4. Estrés oxidativo	107
3.4.1. Ascorbato peroxidasa (APX)	107
3.4.2. Superóxido dismutasa (SOD)	109
3.4.3. Peroxidación lipídica	110
3.5. Muerte celular programada	110
3.5.1. Fragmentación de ADN	110
3.5.2. Actividad de la proteasa	112
3.6. Expresión de genes de respuesta a frío	113
3.6.1. Aislamiento de ARNm	113

3.6.2. Hibridación sustractiva y supresora (SSH)	117
3.6.3. Transformación y clonación	130
3.6.4. Minipreparación de ADN de plásmido	132
3.6.5. Digestión con enzima de restricción	133
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	135
4.1. Experimento 1	135
4.1.1. Daño por frío	135
4.1.1.1. Color	135
4.1.1.1.1. Luminosidad	135
4.1.1.1.2. Cromaticidad	138
4.1.1.1.3. Ángulo de matíz (°HUE)	141
4.1.1.2. Chalcona isomerasa	147
4.1.1.3. Respiración	150
4.1.1.4. Producción de etileno	153
4.1.2. Estrés oxidativo	156
4.1.2.1. Ascorbato peroxidasa (APX)	156
4.1.2.2. Superóxido dismutasa (SOD)	159
4.1.2.3. Peroxidación lipídica	162
4.1.3. Muerte celular programada	165
4.1.3.1. Fragmentación de ADN	165
4.1.3.2. Actividad de la proteasa	166
4.2. Experimento 2	170
4.2.1. Daño por frío	170
4.2.1.1. Color	170
4.2.1.1.1. Luminosidad	170
4.2.1.1.2. Cromaticidad	173
4.2.1.1.3. Ángulo de matíz (°HUE)	175
4.2.1.2. Chalcona isomerasa	181
4.2.1.3. Respiración	184
4.2.1.4. Producción de etileno	186
4.2.2. Estrés oxidativo	189
4.2.2.1. Ascorbato peroxidasa (APX)	189
4.2.2.2. Superóxido dismutasa (SOD)	192
4.2.2.3. Peroxidación lipídica	195
4.2.3. Muerte celular programada	197
4.2.3.1. Fragmentación de ADN	197
4.2.3.2. Actividad de la proteasa	199
4.3. Expresión de genes de respuesta a frío	203
V. CONCLUSIONES	206
VI. LITERATURA CITADA	208
VII. APÉNDICE	231

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
Cuadro 1	Resumen de tipos de estrés abiótico y ejemplos de respuesta vegetal a ellos	16
Cuadro 2	Respuestas de las plantas al etileno	25
Cuadro 3	PCD en diferentes categorías en células vegetales	39
Cuadro 4	Resumen de cambios ultraestructurales caracterizados como resultado de varios tipos de estrés abiótico	43
Cuadro 5	Sensibilidad relativa al daño por frío de especies seleccionadas y síntomas observados en daño por frío inducido	45
Cuadro 6	Compilación de factores y síntomas de daño por frío en estudios ultraestructurales	46
Cuadro 7	Clasificación de las proteasas	55
Cuadro 8	Producción, búsqueda y anulación de ROS en plantas	62
	Experimento 1	
Cuadro 9	Comportamiento de la luminosidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	137
Cuadro 10	Comportamiento de la cromaticidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	140
Cuadro 11	Comportamiento del ángulo de matiz en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	143
Cuadro 12	Comportamiento de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	149
Cuadro 13	Comportamiento de la respiración en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	152
Cuadro 14	Comportamiento de la producción de etileno en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	155
Cuadro 15	Comportamiento de la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa en tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	158
Cuadro 16	Comportamiento de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	161

Cuadro 17	Comportamiento de la peroxidación de lípidos en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	164
Cuadro 18	Comportamiento de la actividad enzimática de las proteasas en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	169
	Experimento 2	
Cuadro 19	Comportamiento de la luminosidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	172
Cuadro 20	Comportamiento de la cromaticidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	175
Cuadro 21	Comportamiento del ángulo de matiz en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	177
Cuadro 22	Comportamiento de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	183
Cuadro 23	Comportamiento de la respiración en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	186
Cuadro 24	Comportamiento de la producción de etileno en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	189
Cuadro 25	Comportamiento de la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	191
Cuadro 26	Comportamiento de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	194
Cuadro 27	Comportamiento de la peroxidación lipídica en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	197
Cuadro 28	Comportamiento de la actividad enzimática de las proteasas en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	202

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura	
Figura 1	15
Figura 2	20
Figura 3	26
Figura 4	28
Figura 5	32
Figura 6	36
Figura 7	51
Figura 8	54
Figura 9.	66
Figura 10	69
Figura 11	71
Figura 12	74
Figura 13	76
Figura 14	82
Figura 15	92
Figura 16	94
Figura 17	95
Figura 18	99
Figura 19	100
Figura 20	101
Experimento 1	
Figura 21	136

Figura 22	Comportamiento de la cromaticidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	139
Figura 23	Comportamiento del ángulo de matiz en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	142
Figura 24	Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Cinnamon Star expuesta a varias temperaturas	144
Figura 25	Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Da Vinci expuesta a varias temperaturas	145
Figura 26	Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Red Elf expuesta a varias temperaturas	146
Figura 27	Comportamiento de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	148
Figura 28	Comportamiento de la respiración en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	151
Figura 29	Comportamiento de la producción de etileno en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	154
Figura 30	Comportamiento de la actividad de la ascorbato peroxidasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	157
Figura 31	Comportamiento de la actividad de la superóxido dismutasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	160
Figura 32	Comportamiento de la peroxidación lipídica en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	163
Figura 33	Fragmentación de ADN en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	165
Figura 34	Comportamiento de la actividad de las proteasas en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	168
	Experimento 2	
Figura 35	Comportamiento de la luminosidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	171
Figura 36	Comportamiento de la cromaticidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	174
Figura 37	Comportamiento del ángulo de matiz en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	176

Figura 38	Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Cinnamon Star expuesta a varias temperaturas	178
Figura 39	Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Da Vinci expuesta a varias temperaturas	179
Figura 40	Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Red Elf expuesta a varias temperaturas	180
Figura 41	Comportamiento de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	182
Figura 42	Comportamiento de la respiración en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	185
Figura 43	Comportamiento de la producción de etileno en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	188
Figura 44	Comportamiento de la actividad de la ascorbato peroxidasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	190
Figura 45	Comportamiento de la actividad de la superóxido dismutasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	193
Figura 46	Comportamiento de la peroxidación lipídica en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	196
Figura 47	Fragmentación de ADN en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	198
Figura 48	Comportamiento de la actividad de las proteasas en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas	201
Figura 49	Eficiencia de sustracción y análisis de productos secundarios de PCR	203
Figura 50	Transformación de colonias de la librería sustraída	204
Figura 51	Digestión con enzima de restricción <i>EcoR</i> I de ADN de plásmido de los insertos obtenidos	204

I. INTRODUCCIÓN

Los daños por estrés biótico y abiótico causan mermas severas a las especies cultivables, las cuales se ven reflejadas en la producción y calidad. Uno de los principales factores de estrés abiótico que existe es la baja temperatura que genera daño por frío. Muchas especies vegetales en especial tropicales y subtropicales sufren este daño, que es un desorden fisiológico causado por la exposición a bajas temperaturas pero por encima de la temperatura de congelación causando clorosis o necrosis, marchitamiento y puede restringir crecimiento y desarrollo de las especies (Lyons, 1973; Wang, 1982; Sharom *et al.*, 1994). Existe evidencia de que el estrés por bajas temperaturas induce niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS, en inglés), las cuales contribuyen significativamente al daño por frío (Kuk *et al.*, 2003) y pueden reaccionar rápidamente con el ADN, lípidos y proteínas causando un daño severo a nivel celular (Sato *et al.*, 2001), y si no se tiene un adecuado control de este estrés por frío puede activar un mecanismo de defensa llamado muerte celular programada (PCD, siglas en inglés) (Evans, 2004).

La nochebuena o poinsettia es una especie sensible al daño por frío, por lo tanto no se debe exponer a temperaturas por debajo de los 10°C. Las brácteas pueden cambiar a tonalidades púrpuras o blancas y el látex puede exudar de los tallos debido al daño causado a las células (Nell y Barrett, 1986). El mercado de plantas de nochebuena comercializa en su mayoría variedades mejoradas, algunas de las cuales presentan daños como marchitamiento de

hojas, brácteas y ciatios, manchado y necrosamiento de brácteas jóvenes ocasionados por temperaturas de transporte inferiores a 12.8°C (Scott *et al.*, 1983; Tantau y Dorfflin, 1991). Con base en la importancia que tiene la nochebuena en nuestro país y por la poca o nula información que se tiene de este cultivo expuesto bajo condiciones que generan el daño por frío y sus efectos en el presente trabajo se planteó el siguiente **objetivo**:

1.1. OBJETIVO

Evaluar el daño por frío en cultivares de nochebuena, para estudiar sus efectos en cuanto a algunos indicadores de muerte celular programada como la fragmentación de ADN, y actividad enzimática de la proteasa y de estrés oxidativo.

1.2. HIPÓTESIS

Existen cultivares con tolerancia a daño por frío en función de la temperatura de exposición, que influirá en aspectos bioquímicos involucrados con la apoptosis, estrés oxidativo y la sobre-expresión de genes de respuesta a baja temperatura.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

La nochebuena es un miembro de la familia Euphorbiaceae. El género *Euphorbia* contiene aproximadamente de 700 a 1000 especies. Éstas se caracterizan por presentar una sola flor femenina sin pétalos y generalmente sin sépalos, rodeada por flores masculinas individuales. Estas pequeñas flores están encerradas en una estructura en forma de copa denominada ciatio. Las estructuras vistosas de la nochebuena son sus hojas modificadas o brácteas (Shanks, 1980). Éstas pueden ser rojas, rosas, blancas o veteadas, pero como son parecidas a hojas en vez de ser verdaderos pétalos, tienen un promedio de vida muy largo (Shanks, 1980). Las brácteas contienen resinas, pigmentos flavonoides, goma, almidón, glucosa, sacarosa, sales, aceites esenciales, ácido tartárico, ácido gálico y otros componentes (Quintanar, 1961).

2.1. ORIGEN DE LA NOCHEBUENA.

La nochebuena es una planta nativa de México y se ha señalado la región de Taxco, Guerrero, como su lugar de origen. Los aztecas le dieron el nombre de "Cuetlaxochitl" que en náhuatl significa "flor de piel". Desde fines del siglo XIX se ha cultivado extensivamente para su venta en la época navideña. El nombre de poinsettia se debe a que Joel Robert Poinsett fue quien introdujo esta especie a la Unión Americana, poco después de asumir el cargo de primer Embajador de los Estados Unidos en México en 1825 (Shanks, 1980).

Las poinsettias fueron utilizadas por los padres franciscanos que se establecieron en las cercanías de Taxco, durante el siglo XVII en una procesión de navidad conocida como la Fiesta del Santo Pesebre (Ecke *et al.*, 1990).

2.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

La nochebuena en su hábitat natural es un arbusto de 1 a 8 m de altura, con ramas lampiñas y hojas grandes, ovaladas o panduriformes, acuminadas, a veces pubescentes en el envés y largamente pecioladas; hojas florales lampiñas, generalmente de color rojo brillante pero a veces amarillas; involucros amarillos en cima corimbosa y con una sola glándula transversalmente hendida (Conzatti, 1988).

- Raíz. Cuando las plantas son propagadas a partir de esquejes son de tipo adventicio, no tienen una raíz pivotante; ya que al enraizarlos las raíces salen de los costados del esqueje.
- Tallo. Son inicialmente herbáceos para luego cambiar a una consistencia leñosa, a medida en que van creciendo las plantas; en su parte central son huecos con unas membranas que los dividen en cada entrenudo (Rodríguez, 1985).
- Hoja. Presenta hojas alternas, simples y pediceladas (Rodríguez, 1985).
- Bráctea. Son hojas modificadas, normalmente de color rojo, amarillo y otras tonalidades dependiendo de la variedad (Romero, 1996).

- Flor. Se condensa en una inflorescencia (ciatio), aparentando una sola flor; presenta flores de dos tipos: a) Flores masculinas que se reducen a un estambre inserto en el ápice de un pequeño pedúnculo; carecen de corola y cáliz; b) Flores femeninas que constan de una ovario tricarpetal sostenido por un pedúnculo largo (Romero, 1996).
- Fruto. Es una cápsula tricarpetal (Rodríguez, 1985).
- Semilla. Consta de un endospermo grasoso y carnoso con carúncula sobre el micrópilo (Rodríguez, 1985).

2.1.2. DESARROLLO DE CULTIVARES.

A principios de este siglo los cultivares utilizados para la producción en maceta fueron principalmente hechos por la empresa Ecke a partir de plantas encontradas al aire libre en el sur de California y que eran formas silvestres con tendencia a la abscisión de hojas bajo condiciones de estrés. La era moderna del cultivo de la nochebuena se inició con la introducción del cultivar Oak Leaf que poseía la característica de retener sus hojas hasta su venta en la época de navidad. A partir de 1950 se iniciaron los programas de mejoramiento en varias instituciones, incluyendo la Universidad de Pennsylvania, la Universidad de Maryland, el Centro de Investigación de la USDA en Beltsville. También varias empresas participaron, como la Azalealand en Nebraska, el Rancho Paul Ecke en California, Zieger Brothers en Alemania y Thormod Hegg & Son en Noruega (Ecke *et al.*, 1990).

Los cultivares de nochebuena más comúnmente vendidos en Norteamérica y Europa son de las siguientes series:

- 1) Serie Annette Hegg
- 2) Serie Ball Seed
- 3) Serie Eckspoint Celebrate
- 4) Serie Fisher Pelfi Star
- 5) Serie Mikkelsens Mikkel
- 6) Serie Oglevee Brightpoints
- 7) Serie Gutbier

En México, los cultivares ‘Supjibi’ y ‘Freedom’ son los que se cultivan con mayor frecuencia, por sus características y la demanda de los consumidores. (Martínez, 1995). El cultivar “Supjibi” se ubica dentro de la serie Fisher Pelfi Star de la línea Gross (Alemania). Disponible en colores rojo y rosa. Sus brácteas son las más grandes y tienen un color rojo brillante. El follaje es verde intermedio y no se cae fácilmente. Tolerancia bien temperaturas extremas. Tiene un hábito de crecimiento mediano, con tallos y brotes sumamente vigorosos. Sus brácteas se dañan fácilmente en el transporte. Adecuada para todos los tamaños de macetas. No es susceptible de presentar epinastía. Se deben eliminar todas las hojas inmaduras al momento de la poda (Martínez, 1995).

El cultivar “Freedom” pertenece a la línea Eckespoint (USA). Introducida en 1993. Disponible en colores rojo, rosa y blanco. Sus brácteas tienen un color brillante y su follaje es verde oscuro. Se caracteriza por ser una planta

compacta que da muchos brotes. Sin embargo, su principal característica es que florea muy temprano, y no depende de las noches largas para la inducción a floración. Tolera bien el transporte y enmangado. Le afectan temperaturas demasiado elevadas. En ciertas situaciones puede tirar prematuramente las flores verdaderas (Martínez, 1995).

Los cultivares “Mármol” y V17 “Angelika” son parte de la serie Gutbier. Disponible en colores blanco, rosa, rojo y “veteado”. Se caracterizan por ser plantas de porte alto y con un gran número de hojas. La fecha de iniciación floral de estos cultivares se presenta a partir del 25 de septiembre. Presentan susceptibilidad al ataque de *Botrytis*. Tolera bien el transporte. Le afectan las temperaturas extremas (Ecke *et al.*, 1990).

Otros cultivares como “Red Elf”, “Cinnamon Star” y “Da Vinci” (Fisher) también se cultivan en México. “Red Elf” pertenece al tipo “Hojas Rojos-Oscuro” (Dark-Leaf Reds) con característica de crecimiento vertical, con un vigor compacto, presenta floración temprana y es moderadamente tolerante al calor (21-27°C) (Fisher, 2007a. <http://www.fischerusa.com/default.aspx?tabid=7&pid=50-660>).

Por su parte los cultivares “Cinnamon Star” y “Da Vinci” pertenecen al tipo “Colección Novedosa” (Novelty Collection). “Cinnamon Star” posee un crecimiento vertical, el color de las brácteas son bronce, presenta floración temprana, un vigor medio y es moderadamente tolerante al calor (21-27°C). Mientras que “Da Vinci” es de floración ni tardía ni temprana, el color de sus

brácteas es bicolor, con vigor medio y hábito de crecimiento vertical (Fisher, 2007b. <http://www.fischerusa.com/default.aspx?tabid=7&pid=50-809>).

2.1.3. REQUERIMIENTOS DE LA NOCHEBUENA.

2.1.3.1. LUZ.

En el desarrollo de las plantas de nochebuena la luz (intensidad, calidad y duración) tiene mucha importancia. La intensidad juega un papel muy importante en el color de las hojas y flor, el crecimiento del tallo, pigmentación y la retención del follaje (Galicia, 2000). La calidad de luz afecta la longitud de entrenudos y la síntesis de antocianinas (pigmentos flavonoides) (Pérez y Martínez, 1994). En cuanto a la duración de la luz, las nochebuenas son sensibles al fotoperiodo, induciéndose la floración cuando el periodo de oscuridad es de por lo menos 12.5 horas continuas (Kristoffersen, 1968; Witaszek and Mynett, 1989; Martínez, 1995).

En condiciones naturales, un periodo oscuro de 12 horas o más ocurre desde el 5 de octubre hasta el 10 de marzo en el hemisferio norte, en México esto ocurre a partir de los 20° de latitud norte. En los lugares donde no se dan estas condiciones, se tiene que utilizar el tapado artificial de las plantas con plástico negro desde el atardecer hasta el amanecer. Sin embargo, la fecha real de iniciación floral en el otoño es modificada por la edad del brote que presenta la iniciación. Los extremos de los brotes más viejos aparentemente tienen más estímulos naturales de floración y pueden iniciar flores hasta 10 días antes (25

de septiembre) las plantas de reciente propagación o despuntadas también se pueden retrasar en su iniciación (Shanks, 1980).

2.1.3.2. TEMPERATURA.

En cuanto a la temperatura ideal para el cultivo de la nochebuena, hay variaciones de acuerdo al cultivar y la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta. Para el desarrollo vegetativo las temperaturas óptimas andan alrededor de 15 a 20 °C en la noche y 24 a 35 °C en el día. Mientras que en la etapa de floración se recomiendan de 15 a 18 °C en la noche y de 18 a 25 °C en el día (Carmichael, 1990). Por lo tanto, mediante una manipulación adecuada de la temperatura es posible controlar al mismo tiempo, la altura de la planta y la velocidad de desarrollo de flores (Ball, 1991).

Temperaturas menores a 16 °C durante el proceso de floración, provocan atraso de ésta y las flores son pequeñas, además se corre el riesgo de presentar enfermedades en follaje y brácteas. Sin embargo, los cultivares de floración temprana pueden mantenerse en el invernadero a una temperatura nocturna mínima de 10 °C hasta su venta, sin reducción en calidad, siempre y cuando se mantenga una humedad relativa baja (Ball, 1991).

Temperaturas nocturnas mayores a 20 °C durante la etapa de floración, retardan el proceso, se abren los centros, se alargan las plantas y el color de las brácteas es muy pálido. Esto se puede contrarrestar con un periodo de oscuridad de alrededor de 14 a 15 horas (Martínez, 1995).

Actualmente la altura de las plantas de nochebuena se puede controlar mediante el DIF que es el diferencial entre la temperatura del día y la temperatura nocturna. El cambio de un DIF positivo hacia un DIF cero produce una enorme reducción en la altura de las plantas. Aunque la altura sigue disminuyendo con el cambio de un DIF cero hacia un DIF negativo, el efecto es de menor magnitud (Holcomb *et al.*, 1996). Así, un cultivo sometido a una temperatura máxima de 28 °C y mínima de 14 °C (promedio = 21 y DIF = 14) tendrá el mismo desarrollo y tiempo a floración que un cultivo sometido a una temperatura máxima de 23 °C y mínima de 19 °C (promedio = 21 y DIF = 4), pero la altura será menor (Martínez, 1995).

Algunos autores mencionan que las nochebuenas son sensibles al daño por frío, por lo tanto no se deben exponer a temperaturas por debajo de los 10°C. Temperaturas frescas pueden causar que las brácteas cambien a tonalidades púrpuras o blancas y el látex puede exudar de los tallos debido al daño causado a las células (Nell y Barrett, 1986).

2.1.3.3. RIEGO.

Las plantas de nochebuena requieren altas humedades relativas y riegos moderados durante su crecimiento (Nowak y Rudnicki, 1990). Un exceso de agua puede dañar al sistema radical. Se recomienda que los riegos sean por la mañana para así evitar que la planta esté húmeda en la noche, que es para cuando se desarrollan hongos que atacan al follaje (Rodríguez *et al.*, 2000).

La calidad del agua también es muy importante, y al respecto se señala que el agua debe tener un pH entre 6 y 8, baja salinidad o sea menos de 800×10^4 de conductividad eléctrica (Ecke *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 2000). Martínez (1995) menciona que la conductividad eléctrica debe estar entre 1.5 y 2.5 mmhos cm^{-1} y no ser mayor de 3.5 mmhos cm^{-1} .

La falta de agua ocasiona retraso en la fotosíntesis, lo que afecta el crecimiento. La elongación de las células jóvenes se reduce, dando como resultado hojas pequeñas y entrenudos cortos. El exceso de agua trae como consecuencia alargamiento de los brotes y un crecimiento débil y reducido (Martínez, 1995).

2.1.3.4. NUTRICIÓN.

En la determinación de las dosis óptimas de fertilización y del tipo de fertilizante a utilizar intervienen algunos factores tales como la calidad del agua de riego, las características del sustrato, el estado vegetativo de la planta, el clima, el tipo de fertilizante, la técnica de cultivo y el objetivo de la fertilización (Martínez, 1995).

Con relación a la nutrición se ha mencionado que la nochebuena requiere de 200 a 300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de N y K; 50 a 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de P; de 80-120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Ca; 40 a 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Mg y de 0.1 a 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Mo en cada riego; si se fertiliza de manera intermitente, la dosis requerida es el doble (Martínez, 1995).

Ecke *et al.* (1990) recomiendan alrededor de 250 mg de nitrógeno·L⁻¹ para nochebuenas con riego constante. Shuch *et al.* (1995) evaluaron la respuesta de seis cultivares de nochebuena a tres niveles de fertilización de nitrógeno y dos regímenes de riego, encontrando que se obtenían plantas aceptables con 160 mg de nitrógeno ·L⁻¹ aplicado en forma continua con un volumen de riego de 240 mL cada tercer día.

Con relación a otros nutrimentos, Villegas (1998) reporta que es recomendable aplicar al suelo junto con los nutrimentos antes mencionados, los siguientes; Cu, Zn, B y Mn en concentraciones de 0.5 a 1.0 mg·L⁻¹ y Mo 0.04 mg·L⁻¹, cada cuatro u ocho días. También se pueden hacer aspersiones foliares de estos elementos.

2.1.4. MANEJO DURANTE TRANSPORTE.

El mercado para las plantas de maceta con flores y las plantas de maceta en follaje ha crecido rápidamente. Estas plantas se envían a menudo a largas distancias, para la colocación eventual en almacenes de compras, restaurantes, oficinas y hogares. Durante el transporte, las plantas necesitan la protección contra condiciones extremas de la temperatura, pérdida de humedad, daños mecánicos, insectos, enfermedades y producción de etileno (Anónimo, 2001). Trabajos realizados sobre manejo en postproducción con *Ficus benjamina* mostraron que cuando se incrementa la duración del almacenamiento en oscuridad, se disminuye la calidad poscosecha (Collins y Blessington, 1982).

Para el transporte de nochebuenas hacia los lugares de venta se envuelven y colocan en cajas por periodos de dos a siete días a temperatura de 13 °C (Nell y Barrett, 1986). La fertilización durante el desarrollo de la plantas, juega un papel importante para mantener más tiempo la calidad de las macetas de nochebuena durante el transporte (Scott *et al.*, 1982). La humedad relativa (HR) es otro factor importante que se debe considerar, Rudnicki *et al.* (1991) señalan que las HR usadas son de 90%. Otros investigadores señalan una humedad relativa del 80% a 7 °C y 90% a 17 °C en nochebuenas sometidas a condiciones de simulación de transporte de siete días en oscuridad (Van Dijk *et al.*, 1991).

2.2. TIPOS DE ESTRÉS ABIÓTICO.

Las células y tejidos vegetales pueden ser expuestos a varios tipos de estrés abiótico que finalmente llevan a su muerte. El estrés abiótico puede ser natural o antropogénico, en donde pueden actuar toxinas (salinidad, metales pesados, herbicidas y contaminantes, además de las especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés)), también el déficit hídrico, daños mecánicos, los efectos de la temperatura (alta o baja) y los efectos de extremada iluminación (Figura 1). Además el estrés puede surgir de suelos adversos o condiciones atmosféricas. Las respuestas del estrés abiótico varían y dependen del estrés y su nivel de resistencia (Cuadro 1). Las plantas pueden mostrar adaptaciones al estrés, incluyendo mecanismos de tolerancia a condiciones adversas, que excluyen a las toxinas, para aminorar sus efectos o evitar condiciones donde el estrés sea extremo. En otras instancias, el estrés abiótico da como resultado la

detención del crecimiento seguido por la muerte parcial o total de la planta (Evans, 2004).

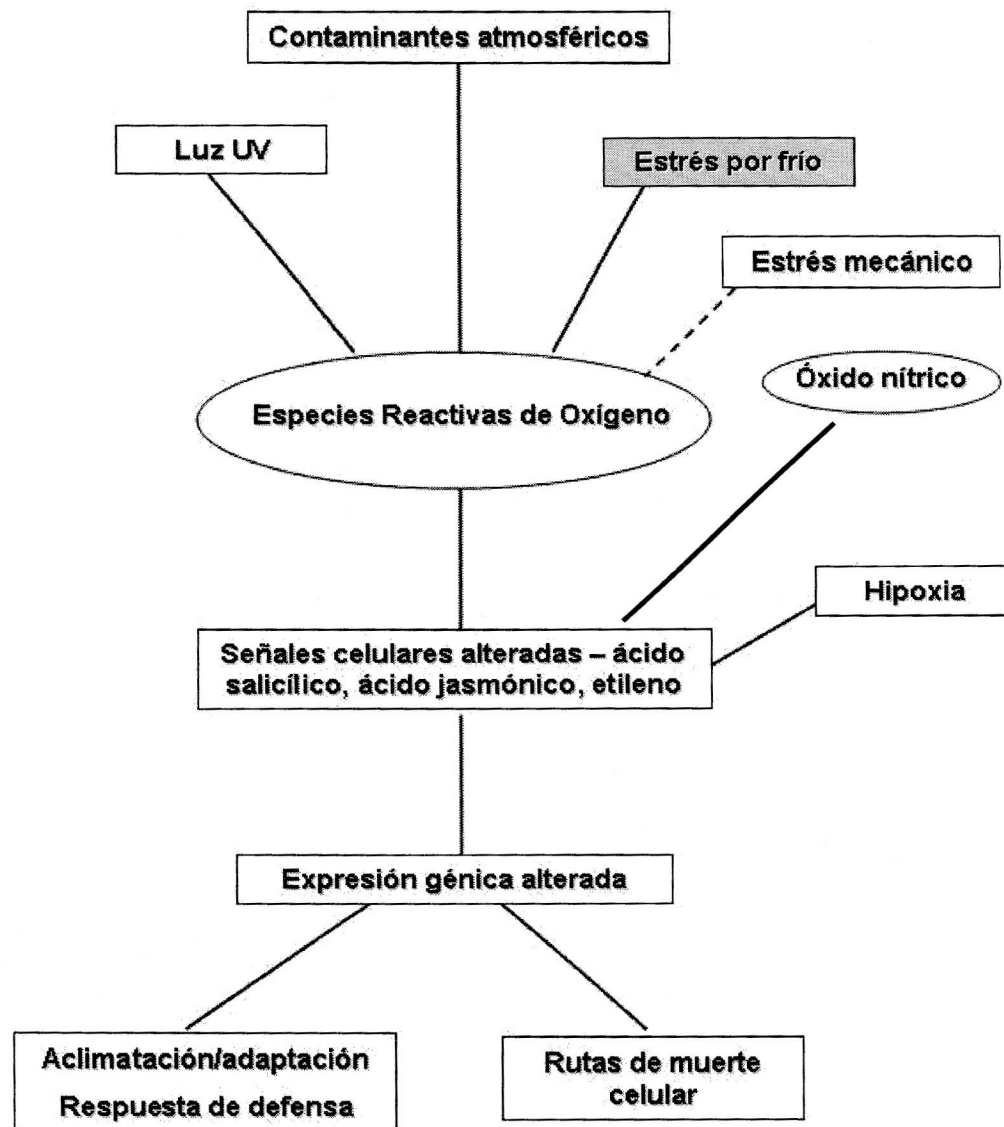


Figura 1. Modelo simplificado que resume la participación de señales de varias moléculas en muerte celular bajo una variedad de tipos de estrés (Evans, 2004).

Cuadro 1. Resumen de tipos de estrés abiótico y ejemplos de respuesta vegetal a ellos (Evans, 2004).

Estrés	Efecto del estrés en plantas	Ejemplos de mecanismos de tolerancia
<i>Iones de metales tóxicos</i>	Depende del ión; clorosis, daño a la membrana, necrosis (puede ser localizada o general), inhibición del crecimiento.	Exclusión a nivel de raíces o endodermis de reducción/quelación, y compartimentalización.
<i>Salinidad</i>	Efectos osmóticos; necrosis, daño a la membrana, inhibición del crecimiento y abscisión.	Producción de solutos compatibles por balance osmótico, exclusión en endodermis; acumulación de sal seguida por abscisión y secreción de la sal por glándulas especializadas.
<i>Toxicidad gaseosa</i>	Clorosis, daño al cloroplasto, daño a la membrana, necrosis, abscisión de hojas u órganos, cese del crecimiento.	Producción de antioxidantes, activación de rutas de enzimas detoxificantes, incremento de niveles de glutatión.
<i>Sequía</i>	Marchitamiento, disminución del área foliar y abscisión foliar.	Abscisión, formas modificadas de fotosíntesis. Anatomía modificada, cutículas delgadas, etc.
<i>Inundación</i>	Muerte de tejido en crecimiento debido a anoxia y cese del crecimiento radicular.	Formación de espacios de aire (Aerenquima). Modificación en el metabolismo (pasa a metabolismo anaeróbico).

<i>Estrés de temperatura</i>	Membrana dañada por frío, formación de hielo, desecación. Membrana dañada por calor, inhibición de la fotosíntesis y daño a las proteínas.	Alteración de síntesis de proteínas modificadas por membranas celulares. Proteínas formadas por shock térmico. Adaptaciones anatómicas.
<i>Estrés de luz</i>	Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), senescencia y necrosis de tejidos.	Producción de pigmentos protectores y antioxidantes. Modificación del aparato fotosintético.

La muerte celular por estrés abiótico puede ser parte de un proceso regulado para asegurar la sobrevivencia. Alternativamente, esto puede ser debido a la muerte incontrolada de células o a tejidos muertos por condiciones adversas. Cuando la muerte celular programada es identificada se podría asumir que es parte de un mecanismo adaptativo de sobrevivencia al estrés. Sin embargo, aún donde ocurre el mecanismo, otras formas de muerte celular ocurrirán si los mecanismos adaptativos son vencidos. Por lo tanto es importante diferenciar claramente entre tipos de muerte celular (Evans, 2004).

2.2.1. DAÑO POR FRÍO.

El daño por frío es el resultado de los cambios físicos y fisiológicos inducidos por la exposición a bajas temperaturas. Los cambios fisiológicos pueden ser considerados como daños primarios o secundarios.

- Daños primarios: son una rápida respuesta inicial que se produce por una disfunción en la planta, pero esta disfunción es fácilmente revertida si la temperatura se incrementa hasta condiciones donde no se produzca daño por bajas temperaturas.
- Daños secundarios: son disfunciones que ocurren como una consecuencia del daño primario y que no pueden ser reversibles. Los síntomas visuales característicos son la consecuencia del daño secundario por frío (Raison y Lyons, 1986).

Cuando se inician los daños por frío primero se presenta cambios a nivel metabólico (incremento del contenido de etileno), seguido de cambios a nivel celular (un incremento en permeabilidad de la membrana y salida de electrolitos) y finalmente aparecen los síntomas visuales (Paull, 1990).

El mecanismo que sigue el desarrollo de daño por frío propone que existe una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos asociados con este desorden. Estos cambios originan una alteración en los procesos metabólicos y fisiológicos de la planta. En plantas sensibles a daños por frío este inicia con la exposición a bajas temperaturas pero que no lleguen a punto de congelamiento (entre 10 y 12 °C para especies de origen tropical). Después de esta exposición a bajas temperaturas se presenta la respuesta primaria inducida por temperaturas críticas de daño por frío, donde a nivel de la membrana celular se presenta una fase física de transición de cristal-líquido flexible a una estructura de gel sólido (Lyons, 1973; Wang, 1982).

Como consecuencia de este primer evento se presenta la respuesta secundaria, donde surgen una serie de cambios en la planta produciéndose una: estimulación en la producción de etileno, incremento en la tasa de respiración, existe una interferencia en la producción de energía, hay una mayor activación de la energía, disminución del fluido protoplasmático, incremento en la permeabilidad, reducción de la fotosíntesis y una alteración en la estructura celular. Después de estos fenómenos a nivel celular se presenta el *Efecto Directo*, por ejemplo se produce la reducción de la actividad de la PEP carboxilasa (Lyons, 1973; Wang, 1982).

Hasta este momento si la exposición a bajas temperaturas es por un corto tiempo, todos los cambios que se dieron a nivel celular pueden ser reversibles. Si el tiempo de exposición a bajas temperaturas continúa los daños son irreversibles y aparecen los síntomas típicos de daño por frío como: decoloración de hojas o brácteas, mancha superficial, rompimiento interno, pérdida de la capacidad de maduración (en frutos), inhibición de crecimiento, deterioro, etc. (Lyons, 1973; Wang, 1982).

Los eventos de respuesta primaria, secundaria, daño directo y síntomas de daño por frío, que suceden a consecuencia de las bajas temperaturas se presentan en el siguiente esquema (Figura 2).

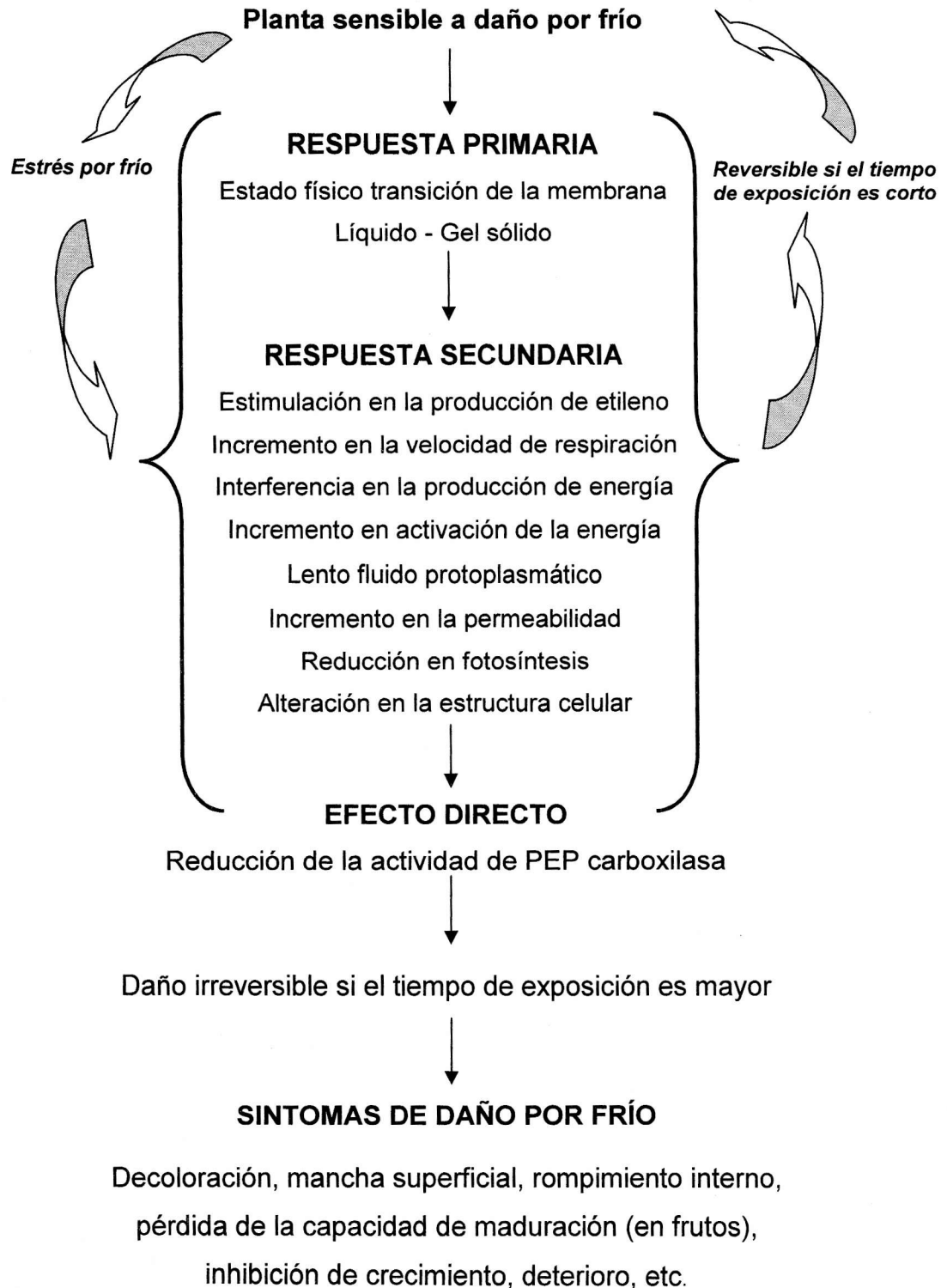


Figura 2. Esquema del mecanismo de daño por frío en plantas sensibles a bajas temperaturas (Wang, 1982).

2.2.1.1. SÍNTOMAS DE DAÑO POR FRÍO EN NOCHEBUENA.

La temperatura óptima para el desarrollo de la nochebuena durante el día es de 21 a 29 °C y la óptima nocturna es de 16 a 21 °C, si la temperatura es superior a 24 °C ó inferior a 15 °C, la floración presenta problemas y no hay reacción al fotoperíodo. Durante la floración la temperatura óptima es de 24 °C y debe mantenerse una temperatura de 16 °C después de la coloración de las brácteas, la temperatura máxima en esta etapa es de 29 °C si se presentan temperaturas mayores la planta sufre un estrés (Vidalie, 1992).

Las nochebuenas son plantas sensibles a bajas temperaturas, los brotes son los más susceptibles a sufrir daños por bajas temperaturas cuando se presentan heladas. La temperatura mínima extrema es de 13 °C produciendo un retraso en el crecimiento y se inicia una clorosis (Ecke, 1990; Vidalie, 1992). La temperatura mínima para la planta es de 16 °C permitiéndole desarrollar sus funciones pero su crecimiento es lento. En general las bajas temperaturas retrasan el crecimiento de las plantas, alteran la programación del cultivo, bajan su calidad. Las brácteas crecen pequeñas, si la temperatura es de 16 °C ó menor produce un efecto adverso en la actividad radical, ocasionando una pobre absorción de nutrientes (Ecke *et al.*, 1990).

Durante el transporte las plantas de nochebuena son susceptibles al manchado ó caída de hojas, epinastia (Van Dijk y De Gelder, 1990), pérdida de vigor, y reducción de la tasa de crecimiento (Mckersie y Leshem, 1994). Muchos de los

daños ocurren cuando las plantas son almacenadas a 5 °C y aumentan al incrementar el tiempo de almacenamiento (Van Dijk y De Gelder, 1990).

Scott *et al.* (1983) mencionan que en plantas del cultivar Gutbier V-14 Glory almacenadas a 7.2 °C durante seis y nueve días, las brácteas presentan marchitamiento como síntomas de daño por frío. El cultivar Gutbier V-10 Amy sometido a condiciones de 4 °C durante siete días de almacenamiento presentó síntomas de daño por frío, apareciendo lesiones en brácteas, con un mayor daño en brácteas pequeñas menores a 2.5 cm de longitud (Nell y Barrett, 1986). El cultivar Diamond presentó una reducción en la absorción de agua, marchitamiento, epinastia en hojas jóvenes, reducción en el contenido de citocininas, mayor concentración de prolina, reducción de la actividad fotosintética y reducción de la transpiración como daño por frío (Tantau y Dörffling, 1991). La mayoría de las plantas sometidas a bajas temperaturas detienen su crecimiento, y si éstas sufrieron algún daño, éstos serán permanentes y cuando son transferidas a condiciones más cálidas el grado de daño se incrementa. Si las plantas no sufrieron algún daño ocasionado por bajas temperaturas, al ser transferidas a condiciones más cálidas presentaron una recuperación (Mackersie y Leshem, 1994).

A medida que se ha desarrollado el cultivo de nochebuena, algunos cultivares presentan daños por frío (Scott *et al.*, 1982). Por otra parte algunos cultivares evaluados en condiciones simuladas de transporte han presentado buenos resultados. Tantau y Dorfflin (1991) reportan que el cultivar Preduza

almacenado a una temperatura de 8 °C durante 24 h mostró menos síntomas de daño por frío que el testigo, estos síntomas se redujeron después de 24 h. En el cultivar Diamond lo daños fueron irreversibles en las mismas condiciones. El cultivar Gutbier V-14 Glory almacenado durante seis días a 12.8 °C en oscuridad conservó una mayor calidad y resistencia a marchitamiento de hojas, brácteas y ciatios.

Van Dijk y Barendse (1991) estudiaron 14 cultivares de nochebuena y encontraron que 'Lilo' y 'Steffi', fueron los que presentaron una mejor calidad al término del almacenamiento a 15 °C; 80% HR durante 7 días en oscuridad en condiciones de simulación de transporte. Como resultados de esta revisión se determina que los cultivares de nochebuena no soportan almacenamientos por 7 días a temperaturas menores de 13 °C, además que no existe información sobre los cultivares (utilizados en el experimento), así como los genotipos semicultivados y silvestres.

2.2.1.2. DAÑO POR FRÍO CON RELACIÓN A LA PRODUCCIÓN DE ETILENO Y CO₂ EN PLANTAS.

2.2.1.2.1. ETILENO.

El etileno es una de las estructuras químicas más simples con actividad en forma de gas (C₂H₄), está presente en actividades de germinación, maduración, senescencia. Puede actuar como una señal ante diferentes tipos de estrés en las plantas, activado por distintas causas: heridas, deficiencias hídricas, altas o bajas temperatura entre otros (Zacarías y Lafuente, 2000). Paull (1990)

menciona que cuando se inician los daños por frío primero se presentan cambios a nivel metabólico por lo que se incrementa el contenido de etileno. El tiempo de exposición a bajas temperaturas para el inicio en la producción de etileno puede variar desde una hora en especies tropicales como *Episcia reptans*, hasta varios días como en el caso de pepino (Yi y Patterson, 1985). Frutos de kiwi sometidos a temperaturas de 0, 5 y 10°C presentaron una mayor síntesis de etileno, comparado con los frutos que se mantuvieron a 20°C. Este incremento en la biosíntesis de etileno se debió al incremento en la actividad de la ACC sintasa (1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa =ACS) y ACC oxidasa (1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidoreductasa= ACO) después de ser colocados a una temperatura mayor a los 20°C (Antunes y Sfakiotakis, 2002). En estudios realizados sobre *Ixora coccinea* sometida a temperaturas de 3 y 9°C durante tres días y posteriormente llevados a temperatura de 20°C, se encontró abscisión en hojas tres días después del tratamiento, incrementándose los niveles de etileno debido a la acumulación de ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) durante el periodo de daño por frío (Michaeli *et al.*, 1999).

El etileno es una hormona vegetal que regula múltiples procesos de desarrollo, incluyendo la germinación de semillas, la abscisión, la maduración y la senescencia de los frutos. Es también una señal importante en la respuesta a factores bióticos y abióticos. (Abeles *et al.*, 1992). Estructuralmente es el alqueno más sencillo, compuesto de dos carbonos ligados por un doble enlace ($H_2C=CH_2$), es un gas incoloro de olor ligeramente dulce. Esta hormona vegetal

se difunde fácilmente en los tejidos y es efectiva a concentraciones de partes por millón y partes por billón (Saltveit, 1999).

Además de la maduración, las plantas muestran numerosas respuestas al etileno ya sea endógeno (producido por la planta) o exógeno (aplicado) (Cuadro 2), dichas respuestas pueden ser benéficas o dañinas. Por ejemplo el etileno promueve la degradación de clorofila, lo cual sería perjudicial en lechuga pero podría ser benéfico en el desverdecimiento de limones (Saltveit, 1999).

Cuadro 2. Respuestas de las plantas al etileno (Saltveit, 1999).

Etileno estimula	Etileno inhibe
Síntesis de etileno	Síntesis de etileno en tejido vegetativo y frutos no climatéricos
Maduración de los frutos	Desarrollo de flores en la mayoría de las plantas
Síntesis de pigmentos	Transporte de auxinas
Degradación de clorofila	Elongación de tallos y raíces (crecimiento)
Germinación de semillas	Orientación normal de las microfibrillas de la pared celular
Formación de raíces adventicias	
Respiración	
Metabolismo de fenilpropanoides	
Floración de bromeliáceas	
Abscisión	
Senescencia	

La ruta de la biosíntesis del etileno es bien conocida (Bleecker y Kende, 2000; Reid, 2002). El etileno se forma a partir del aminoácido metionina (MET) (Figura 3), que es convertido a S-adenosilmetionina (SAM) por la acción de la enzima S-adenosil-metionina-sintetasa, posteriormente es convertido en ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) por la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACC sintasa).

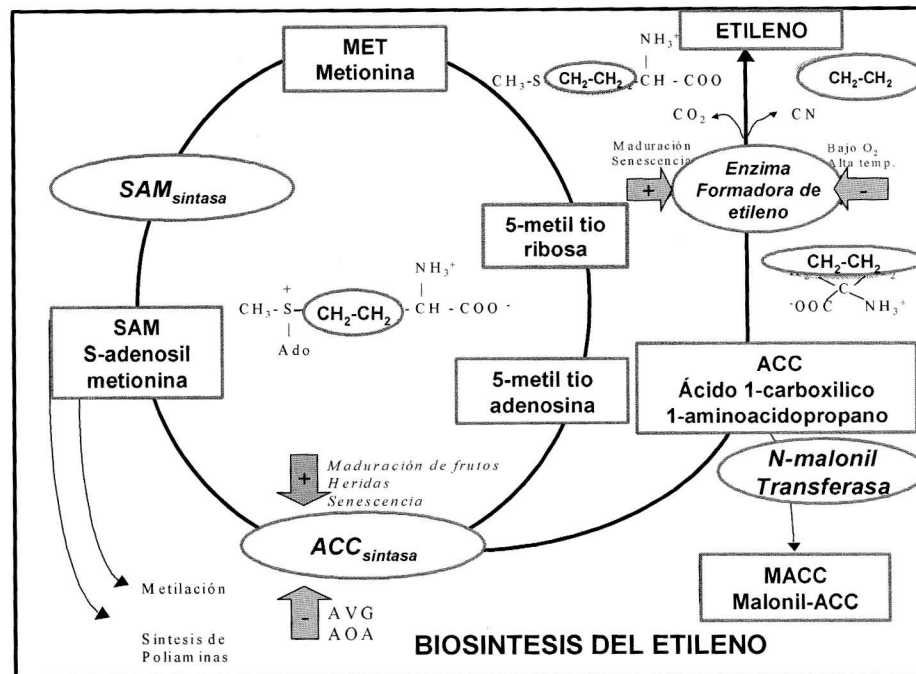


Figura 3. Biosíntesis del etileno (Reid, 2002).

Además de producir ACC, la ACC sintasa también produce 5-metiltioadenosina, la cual es utilizada para la síntesis de nueva metionina a través de un ciclo. En el paso final de la síntesis de etileno, la enzima ACC oxidasa, actúa transformando ACC en etileno, CO_2 y HCN , esta reacción de oxidación requiere la presencia de O_2 y bajos niveles de CO_2 (Salveit, 1999; Alexander y Grierson, 2002; Wang *et al.*, 2002). La síntesis es altamente regulada y es inducida en respuesta a ciertas señales del desarrollo así como a estrés biótico y abiótico (Klee y Tieman, 2002).

Las dos principales enzimas involucradas en la ruta biosintética, la ACC sintasa y la ACC oxidasa han sido caracterizadas a nivel molecular y sus genes

aislados de diversas plantas (Nakajima *et al.*, 1990; Barry *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1999).

Se han realizado un gran número de estudios genéticos y moleculares usando mutantes de *Arabidopsis* para investigar el mecanismo de percepción del etileno y la transducción de señales (Jiang y Fu, 2000). Sin embargo, todavía no se ha elucidado el mecanismo exacto (Gamble *et al.*, 2002; Alexander y Grierson, 2002).

Primeramente se identificó en *Arabidopsis* el mutante etileno-resistente *etr1* y se aisló y caracterizó el gen *ETR1* que codifica a un receptor de etileno (Bleecker *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1993). Actualmente se han identificado cinco receptores de etileno en *Arabidopsis*: *ETR1* (Chang *et al.*, 1993), *ERS1* (Hua y Meyerowitz, 1995, 1998), *ETR2* (Sakai *et al.*, 1998), *EIN4* y *ERS2* (Hua y Meyerowitz, 1998) y al menos seis homólogos en tomate: *LeETR1-6* (Klee, 2002) dos en melón (Sato-Nara, 1999) y uno en mango *METR1* (Gutierrez-Martínez *et al.*, 2001).

La ruta de percepción del etileno en *Arabidopsis* comienza por la unión del etileno con un receptor tipo histidina kinasa (Figura 4), situado en la membrana plasmática, similar a los reguladores de dos componentes de las bacterias y con un ión Cu (I) como cofactor, dicha unión inactiva el gen *CTR1*, una MAPK que actúa como regulador negativo de esta ruta, sugiriendo la implicación de una cascada de MAP kinasas en la respuesta hormonal (Hirayama y Alonso,

2000). En ella participan distintos genes como EIN2, que actúa río abajo en el gen *CTR1* y río arriba en los genes EIN3 y EIL (1, 2 y 3) que son factores de transcripción localizados en el núcleo junto con las proteínas de unión a elementos de respuesta a etileno (EREBPs), que son los encargados de activar los genes que generan la respuesta al etileno (Wang *et al.*, 2002). El tiempo de disociación del etileno con el receptor *ETR1* es aproximadamente de 12 h.

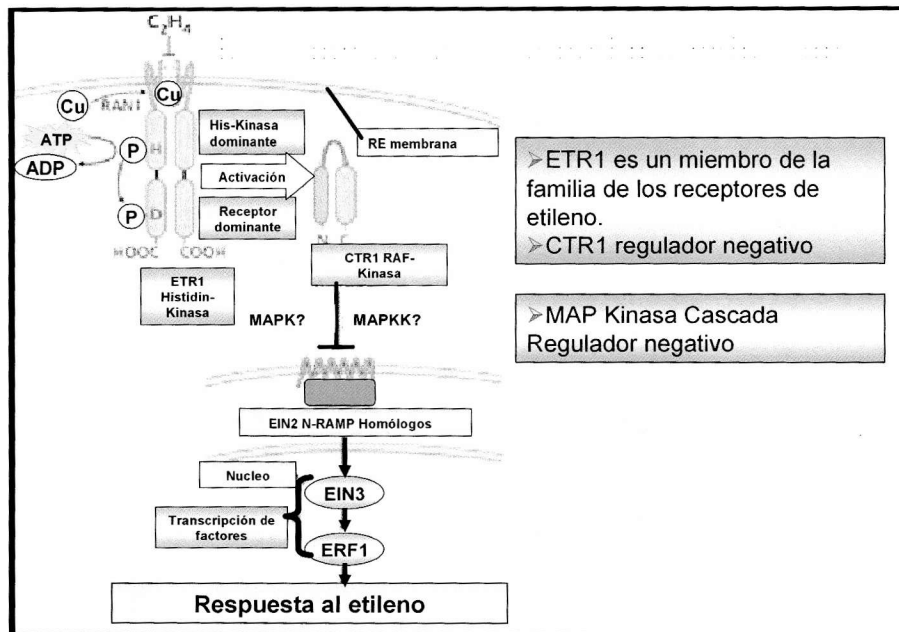


Figura 4. Mecanismo de acción del etileno (Wang *et al.*, 2002).

El análisis de los genes relacionados con la maduración en plantas transgénicas, indican la presencia de dos tipos de regulación genética; la regulación dependiente de etileno y la regulación independiente de etileno (Lelièvre *et al.*, 1997; Alexander y Grierson, 2002).

2.2.1.2.2. CO₂.

La respiración en plantas es el conjunto de reacciones mediante las cuales los azúcares sintetizados durante la fotosíntesis son oxidados a CO₂ y H₂O, liberando energía que es transformada principalmente a ATP; la producción de CO₂ proviene de la oxidación de compuestos de carbono y esta emisión de CO₂ al igual que el consumo de O₂ pueden ser utilizados para medir la tasa de respiración de las plantas (Ribas y Gonzáles, 2000). En plantas sensibles a frío se presentan alteraciones en la respiración (Lyons, 1973; Levitt, 1980; Mackerrsie y Leshem, 1994). Trabajos realizados con inflorescencias de *Grevillea* 'Sylvia' almacenadas a 0, 5, 10 y 20 °C durante 18 días, presentaron menores tasas de respiración al disminuir la temperatura de almacenamiento (Joyce *et al.*, 2000). Lyons (1973) menciona que cuando hojas de pepino se exponen a temperaturas bajas la respiración disminuye, pero cuando éstas son llevadas a temperaturas más cálidas la respiración se incrementa. Este comportamiento también se presenta en frutos (Mackersie y Leshem, 1994). Una respiración elevada durante el almacenamiento a bajas temperaturas es seguido de síntomas externos visibles de daño por frío (Lyons, 1973).

2.2.1.3. RUTA DE LOS FENILPROPANOIDES Y FLAVONOIDES.

Ambas rutas producen metabolitos secundarios con un amplio rango de funciones como componentes estructurales, protectores contra diversos tipos de estrés, y moléculas indicadoras (Dixon y Paiva, 1995; Weisshaar y Jenkins, 1998). Estudios en maíz mostraron que la acumulación de antocianinas en respuesta a tratamiento de frío a corto plazo está asociada con la inducción de

genes clave en las rutas de los fenilpropanoides/flavonoides que incluyen aquellos que codifican la Fenilalanina amonio-liasa (PAL), Chalcona sintasa (CHS), 4-Cumarato:CoA ligasa y Chalcona Isomerasa (CHI), concluyendo que los genes de la ruta biosintética de las antocianinas pueden ser considerados genes *COR* (Christie *et al.*, 1994). Numerosos genes agrupados bajo procesos de biosíntesis de los fenilpropanoides/flavonoides fueron inducidos por tratamiento de frío. Siete genes inducidos por frío codificaron para enzimas clave en los pasos principales en la ruta biosintética de los flavonoides (Mehrtens *et al.*, 2005).

La inducción por frío en la ruta de los flavonoides es interesante dado a su posible papel en la protección contra el estrés por frío. Una baja temperatura puede incrementar el nivel de las ROS (Prasad *et al.*, 1994) generado como sub-productos de la fotosíntesis y el proceso de respiración (Vranová *et al.*, 2002; Apel y Hirt, 2004). Los niveles de ROS resultantes de la baja temperatura o de otros tipos de estrés abiótico son tóxicos y permiten la muerte celular. Se ha propuesto que los flavonoides inducidos por una baja temperatura sirven como antioxidantes contra las ROS (Prasad, 1996). Además el contenido de flavonoides ha sido correlacionado con la resistencia al escarchamiento en hojas de *Rhododendron* (Swiderski *et al.*, 2004). Genes de inducción por frío que codifican para enzimas de los flavonoides están correlacionados con la tolerancia al congelamiento en *Arabidopsis* (Hannah *et al.*, 2006). En resumen, muchos estudios realizados demuestran que la inducción por frío a nivel de ARNm de las rutas fenilpropanoide/flavonoides es parte importante del proceso

de adaptación al frío para el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* a baja temperatura (no a temperatura de congelación).

2.2.1.3.1. CHALCONA ISOMERASA.

La ruta de los fenilpropanoides provee de metabolitos secundarios usados en la pigmentación, además sirve de protección contra los rayos UV, en la formación de fitoalexinas, etc. La enzima Chalcona Sintasa (CHS; EC 2.3.1.74) juega un papel esencial en la biosíntesis de esta ruta (Ferrer *et al.*, 1999).

La CHS supe el 4,2',4',6' tetrahidroxi chalcona de algunas enzimas que sintetizan una diversidad de fitoalexinas y antocianinas. La síntesis del chalcón por la acción de la CHS envuelve la condensación secuencial de una molécula de *p*-coumaril y tres de malonil-coenzima-A (CoA). Después de la captura inicial de la mitad del *p*-coumaril, cada paso subsiguiente de la condensación empieza con la descarboxilación del malonil-CoA en el sitio activo de la CHS; dando como resultado acetil-CoA, que posteriormente sirve como el nucleófilo para la elongación de la cadena. Estas reacciones generan un tetraquétido intermediario que cicla mediante condensación a un sistema con una anillo aromático hidroxilado (Ferrer *et al.*, 1999).

Por otra parte la enzima Chalcona Isomerasa (CHI, EC 5.5.1.6) cataliza la ciclización intramolecular de 4,2',4',6'-tetrahidroxi chalcona (chalcona) y de 6'-deoxichalcona (4,2',4'-trihidroxi chalcona), ambas derivadas de la enzima Chalcona Sintasa (CHS, EC 2.3.1.74), en (2S)-naringenina (5,7,4'-trihidroxi

flavanona) y (2S)-5-deoxi flavanona (7,4'-dihidroxi flavanona), respectivamente (Jez *et al.*, 2000; Jez y Noel, 2002) (Figura 5).

La ciclización espontánea de los chalcones en una solución produce una mezcla en-antiomérica de flavanonas, la CHI garantiza la formación del activo biológico (2S)- flavanonas. Ejemplo: (2S)-naringenina es el precursor metabólico de las antocianinas, y mutaciones en el gen CHI está ligado a los cambios en la pigmentación floral y recientemente la introducción del gen CHI de petunia en tomate, dio como resultados frutos enriquecidos en su contenido de flavanol (Jez y Noel, 2002).

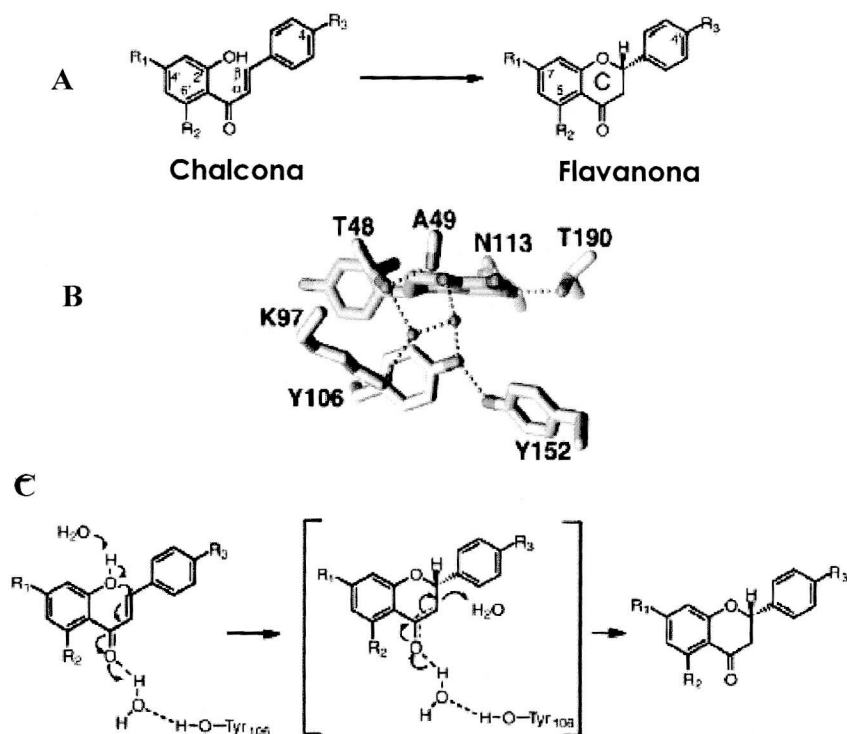


Figura 5. Reacción catalizada por CHI y arquitectura del sitio activo. **A**, Reacción catalizada por CHI. La CHI cicla 4,2',4',6'-tetrahidroxi chalcona (R_1 ,

$R_2, R_3 = OH$), 4,2',4'-trihidroxi chalcona ($R_1, R_3 = OH, R_2 = H$), 2',4'-dihidroxi chalcona ($R_1 = OH, R_2, R_3 = H$), y 4,2'-dihidroxi chalcona ($R_1, R_2 = H, R_3 = OH$) a 5,7,4'-trihidroxi flavanona ($R_1, R_2, R_3 = OH$), 7,4'-dihidroxi flavanona ($R_1, R_3 = OH, R_2 = H$), 7-hidroxi flavanona ($R_1 = OH, R_2, R_3 = H$) y 4'-hidroxi flavanona ($R_1, R_2 = H, R_3 = OH$). **B**, vista del sitio activo y red de enlaces hidrógeno en el complejo CHI-naringenina (líneas punteadas). **C**, reacción de ciclización propuesta catalizada por la CHI (Jez y Noel, 2002).

2.3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN PLANTAS.

Las células de los organismos multicelulares son miembros de una comunidad altamente organizada. Controlando la tasa de división celular y de la muerte celular se regula estrictamente el número de células en esta comunidad. Si las células ya no son necesarias, mueren por la activación intracelular de la muerte programada, por esta razón a tal proceso se le llama Muerte Celular Programada (PCD, siglas en inglés) y más comúnmente Apoptosis. El término apoptosis es referido al griego que significa *pérdida de pétalos u hojas*. Sorprendentemente, a pesar del rol obvio de la muerte celular en plantas, el concepto de PCD se desarrolló e inició en animales y ciencias médicas (Palavan-Unsal *et al.*, 2005).

Un mecanismo para la eliminación de células indeseables es esencialmente importante para el desarrollo y crecimiento de organismos multicelulares. Por lo tanto, en resumen, para regular la tasa de división celular, los organismos multicelulares tales como los animales y las plantas tienen rutas bioquímicas para el control de la muerte celular. Para llevar a cabo la coordinación de la

activación de la división celular y muerte celular, los animales y las plantas pueden variar directamente de los procesos de desarrollo tales como la generación de patrones de desarrollo y la formación de células, tejidos y órganos. Sin embargo, la muerte celular puede no estar limitada al desarrollo y puede ser utilizada por numerosos procesos tales como el control de poblaciones de células y defensa contra microbios invasores (Jones y Dangl, 1996; Mittler y Lam, 1996).

2.3.1. MECANISMO MOLECULAR DE LA APOPTOSIS.

Las células que mueren como resultado de un daño, normalmente se hinchan y revientan y rocían su contenido a otras células vecinas. Este proceso es conocido como *necrosis celular* y es la causante de una respuesta inflamatoria en animales. Por el contrario, una célula que experimente apoptosis muere sin causar daño a sus células vecinas. La célula se encoje y condensa. El citoesqueleto se colapsa, la cubierta nuclear se oculta y el ADN nuclear se rompe en fragmentos. Los cuerpos apoptóticos que son formados durante la apoptosis son sumergidos y reciclados por las células vecinas o por macrófagos específicos; por lo tanto completan la eliminación en la célula en la que ocurre (Figura 6) (Gray, 2004; Palavan-Unsal *et al.*, 2005).

La maquinaria intracelular responsable de la apoptosis observada es similar en todas las células animales y vegetales. Esta maquinaria depende de la familia de proteasas que tienen cisteína en su sitio receptor y una de sus proteínas blanco en específicos ácidos aspárticos, por lo tanto son llamadas *Caspasas*. Las

caspasas son sintetizadas en las células como precursores inactivos o procaspasas, dando como resultado una amplificación de la cascada proteolítica. Algunas otras caspasas activadas después se unen a otras proteínas clave en la célula. Por ejemplo, algunas caspasas se unen a láminas nucleares y causan daño irreversible, otras se unen a proteínas que normalmente degradan enzimas de ADN en una forma activa, liberando la ADNasa que corta el ADN, por lo tanto, se auto destruye la célula rápidamente (Palavan-Unsal *et al.*, 2005).

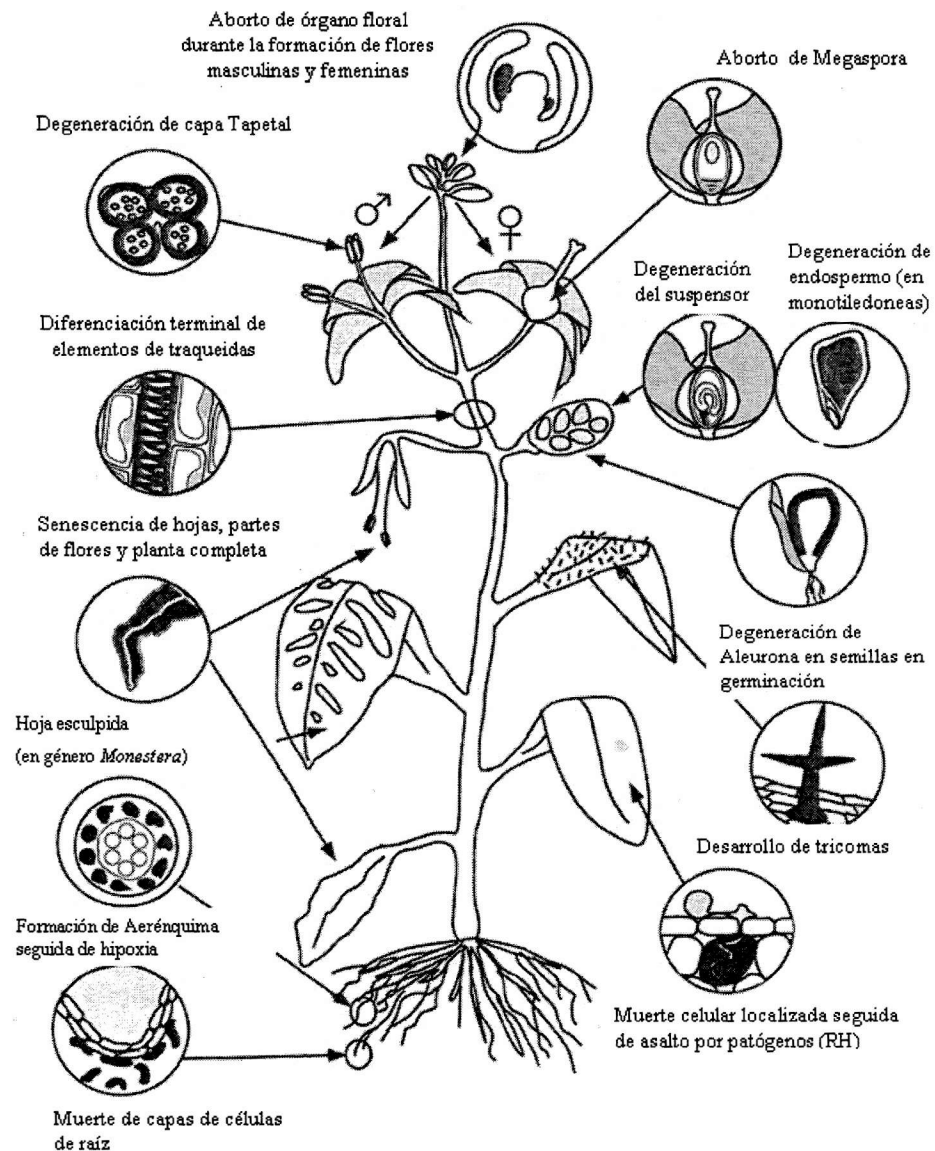


Figura 6. Eventos Supuestos de Muerte Celular Programada (PCD) en Plantas Superiores: Esquema idealizado en donde se observan células, órganos y tejidos en una planta que experimentan muerte celular durante eventos del ciclo normal de desarrollo. Las áreas oscuras indican donde se cree que ocurren los eventos de la PCD (Adaptado de Gray y Johal, 1998; Tomado de Gray, 2004).

Uren *et al.* (2000) han identificado los genes ancestrales que codifican las proteínas parecidas a las caspasas, las *Metacaspasas*, las cuales están presentes en plantas, hongos, y protozoarios. La homología de las metacaspasas a las caspasas no está restringida a la secuencia primaria, incluyendo el arreglo catalítico de la histidina y la cisteína, pero se extiende a la estructura secundaria. Recientemente, Bozhokov *et al.* (2004) se hicieron la pregunta si la actividad proteolítica de caspasa está relacionada en la regulación del desarrollo de la muerte celular vegetal usando embriogénesis somática en *Picea abies* como sistema modelo. Encontrando que para el inicio la VEIDase es la principal caspasa implicada en la embriogénesis vegetal. Esta actividad se incrementa en etapas tempranas de desarrollo embrionario y está directamente relacionada con la diferenciación terminal y muerte del suspensor embrionario.

A diferencia de las células animales, las células vegetales tienen paredes que pueden actuar como barreras físicas previniendo el reciclaje de material contenido en células muertas por vía de cuerpos apoptóticos. Por lo tanto, el reciclaje del contenido de células muertas puede ocurrir por degradación de debris celular a compuestos de bajo peso molecular tomados por células vecinas. Este tipo de proceso en donde se libera el debris celular dentro del espacio intercelular causaría una inflamación en animales, pero no en células vegetales porque no tienen respuesta inmune. La morfogénesis en plantas es determinada principalmente por división celular y muerte celular pero no migración celular como ocurre en la morfogénesis animal. Otro aspecto de la

vida de las plantas que se relaciona con la PCD es la interacción con el ambiente. La defensa de las plantas contra daños bióticos o abióticos en ocasiones se relaciona con la activación de la apoptosis. Por lo tanto, la función de la muerte celular es similar pero los mecanismos que ocurren son diferentes y específicos para cada organismo (Palavan-Unsal *et al.*, 2005).

2.3.2. MARCADORES MOLECULARES DE APOPTOSIS.

La PCD se puede dividir en tres etapas: Fase de señales, Fase de Ejecución y Fase de Desmantelamiento (Depreatere y Golstein, 1998). La regulación de la apoptosis es principalmente conocida en tejidos neoplásticos (Korsmeyer, 1995). En los últimos 10 años se ha encontrado 30 nuevas moléculas que inician y regulan la apoptosis. Otras 20 moléculas están asociadas con las señales o replicación del ADN, transcripción o reparadores que han sido descubiertos como reguladores de la apoptosis (Willie, 1998).

Una de las señales para la apoptosis es una disminución en el potencial mitocondrial transmembrana, independientemente de cualquier estímulo para inducir apoptosis (Kroemer *et al.*, 1998). Otro marcador inicial es la exposición aberrante de fosfatidil-serina en el plasma de la membrana (Kroemer *et al.*, 1998). Estos eventos son seguidos por la activación de proteasas, fosfolipasas y fosfatasas. La activación de nucleasas permite la unión del ADN nuclear (Bayly *et al.*, 1997). La unión de ADN internucleosomal da como resultado en la formación de pequeños fragmentos (Oberhammer *et al.*, 1993).

Existen ocho categorías de células que experimentan muerte celular, seis de ellas están representadas en las plantas. Fuera de eso, el mecanismo de muerte celular ha sido estudiado, al menos se han estudiado cuatro categorías (Cuadro 3): células que mueren después de actuar en funciones específicas, células que son indeseables desde el comienzo, células que mueren durante diferenciación terminal en tipos de células especializadas y células que están sujetas a estrés abiótico y biótico (Krishnamurthy *et al.*, 2000).

Cuadro 3. PCD en diferentes categorías en células vegetales (Krishnamurthy *et al.*, 2000).

Eventos en muerte celular	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	Categoría 4
<i>Tipos de células estudiadas</i>	Endospermo y células de aleurona, células de pared de antera, incluyendo el tapetum, células senescentes, células de la capa de raíz y suspensor del embrión	Célula hermana de iniciación embrionaria	Elementos de la traqueida	Células sujetas a varios tipos de estrés abiótico y biótico (Reacción de Hipersensibilidad), pequeñas lesiones, células sujetas a hipoxia
<i>Condensación citoplásmica y disminución</i>	+	+	+	+ en la mayoría de los casos
<i>Fragmentación citoplásmica</i>	-	-	-	-
<i>Disminución celular</i>	+	+	-	+ en la mayoría de los casos
<i>Cistein-proteinasas (CyP)</i>	+ en algunas, NE en otras, en general envueltas en PCD no comprobada	NE	A 30kDa CyP, a 145 kDa serine-proteinasas y a 60 kDa proteasas conocidas. De todos modos, los sustratos, la localización celular, el modo de inducción, etc.	CyP + en reacción de hipersensibilidad

<i>Participación PARP</i>	NE	NE	no son conocidos NE	+ en algunas pero si su rol es reparar el ADN, no se sabe si causa PCD o activación de PAL
<i>Unión PARP</i>	NE	NE	NE	-
<i>Adaptador de moléculas</i>	-	-	-	-
<i>Regulador de moléculas</i>	-	-	-	-
<i>Señales de eventos:</i>				
<i>a) Ráfaga oxidativa y producción de ROS (O₂ y H₂O₂)</i>	NE en algunas y + en otras	NE	+(¿?)	+(¿?) en algunas, NE en otras
<i>b) Incremento de Ca⁺⁺ citosólico</i>	+ en algunas y NE algunas otras	NE	+	+ en algunas, pero probadas solamente a través de canales de bloqueo; NE en otras
<i>c) Participación mitocondrial y colapso del potencial de membrana</i>	NE	NE	NE	NE
<i>d) Exposición de Fosfotidil-serina en plasma de membrana</i>	NE	NE	NE	+ en un sistema estudiado, NE en otros
<i>e) Fosforilación/ Defosforilación</i>	+ en un sistema, NE en otros	NE	NE	+ en algunos sistemas, NE en otros
<i>f) GFD (Factor de privación del crecimiento)</i>	+ en células senescentes, NE en otras	NE	NE	+ en reacción de hipersensibilidad, NE en otras
<i>g) Etileno</i>	+ en células de endospermo y células senescentes, NE en otras	NE	+(¿?)	+ en la mayoría de los casos
<i>Condensación de la cromatina</i>	+	NE	¿?	+ en algunas, - en algunas otras, NE en hipoxia
<i>Endonucleasas</i>	NE en la mayoría, + (¿?) en células senescentes y células del endospermo. Zn ⁺⁺ activado	NE	A 43 kDa una enzima es reportada; enzima de Zn ⁺⁺ activada; relación de la PCD no bien establecida	A 36 kDa una enzima se conoce en tabaco por que activa células de reacción de hipersensibilidad por el calcio, pero inhibida por el

<i>Fragmentación del ADN</i>	+, formación de escalera observada, TUNEL +	Formación de escalera ¿?, TUNEL +	¿?, probablemente ausente, TUNEL +	zinc NE en hipoxia, escalera en algunas pero no en todas, TUNEL + en algunas y – en otras
<i>Tamaños de los fragmentos de ADN</i>	180 bp en células de endospermo. 200 bp en células de antera; NE en otras	140 bp	-	180 bp en células con daño por rayos UV. 50,000 bp en algunas células de reacción de hipersensibilidad

+, detectado; NE, no estudiado; -, no detectado; ¿?, dudoso.

2.3.3. TIPOS DE MUERTE CELULAR EN ESTRÉS ABIÓTICO.

A) *Necrosis*. Es una forma incontrolada de muerte celular que ocurre cuando las células son expuestas a variaciones desde condiciones fisiológicas suficientes hasta vencer sus mecanismos de tolerancia. Esto puede ser inducido bajo condiciones fisiológicas por agentes que causan daño a las membranas. El proceso es pasivo y no requiere de uso de energía. La muerte celular necrótica es frecuentemente iniciada por anoxia a través de la deficiencia de oxígeno y acidificación del citoplasma (Vartapetian y Jackson, 1997). Las características clave de la necrosis incluye la pérdida de la integridad de la membrana, pérdida de homeostasis iónica, hinchamiento y desintegración de organelos y degradación aleatoria de contenido celular, incluyendo el ADN. La necrosis puede ser localizada con pequeñas lesiones en puntos de crecimiento y en hojas, tallos, etc. El término necrosis comúnmente se aplica a fisiología vegetal pero no siempre se refiere a muerte celular necrótica. El término “muerte celular accidental” ha sido sugerido para

evitar confusión (Gray y Johal, 1998). La necrosis podría ser iniciada por altas concentraciones de disparadores que, a bajas concentraciones, iniciarían la PCD (Evans, 2004).

B) *Apoptosis y otras formas de PCD*. En sentido estricto la apoptosis es descrita por el desarrollo de características morfológicas celulares durante la muerte celular, estudios ultraestructurales proveen de la mayor base para su identificación (Cuadro 4) (Kitanaka y Kuchino, 1999; Kratsch y Wise, 2000). La apoptosis fue originalmente caracterizada por cambios distintivos en el núcleo (como la cromatina condensada que podía ser observada en la periferia del núcleo), y por la formación de estructuras de membrana rodeando a los organelos celulares. Estas últimas estructuras fueron llamadas “cuerpos apoptóticos” y se encontró que contienen cromatina y organelos intactos incluyendo mitocondria y aparato de Golgi. Las membranas celulares y organelos no pierden su integridad hasta etapas finales en el proceso. Finalmente, los fragmentos celulares pequeños y fragmentos de membrana sueltos son digeridos rápidamente por macrófagos. Este proceso es bastante distinto al de la necrosis (Evans, 2004).

Cuadro 4. Resumen de cambios ultraestructurales caracterizados como resultado de varios tipos de estrés abiótico (Evans, 2004).

Estrés abiótico	Cambios ultraestructurales
<i>Hipoxia (formación de aerenquima)</i>	Condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. Organelos rodeados por membrana. Invaginación del plasma de membrana y degradación del tonoplasto. Degradación de la pared celular.
<i>Radiación luminosa</i>	Fragmentación oligonucleosomal del ADN. Migración del contenido nuclear hacia la periferia de la célula.
<i>Estrés mecánico</i>	Fragmentación oligonucleosomal del ADN en cloroplastos y núcleo. TUNEL positivo en el material periférico del núcleo.
<i>Estrés por frío</i>	Cloroplasto hinchado, tilacoides distorsionados e hinchados, grana dispersa y cloroplastos muertos. Núcleo hinchado, fragmentos de cromatina, retículo endoplásmico y aparato de Golgi hinchados, condensación citoplásmica.

2.3.4. MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN DAÑO POR FRÍO.

Existen dos formas en las que puede morir una célula. Una es el resultado de un daño traumático severo, como una exposición a altos niveles de una toxina o por congelamiento. Se refiere a la muerte necrótica celular, que es caracterizada típicamente por hinchazón de la célula y lisis subsiguiente, dando como resultado la pérdida de su contenido celular (Kratsch y Wise, 2000).

La otra forma en que una célula puede morir es por la activación de una ruta genéticamente codificada que inicia con la expresión de proteínas únicas relacionadas en el desmantelamiento sistemático de la célula. Se refiere a la

muerte celular programada (PCD, siglas en inglés), este tipo de muerte celular puede ocurrir de ambas formas, ya sea por respuesta al estrés ambiental o por regulación del crecimiento y desarrollo de un organismo. Esto es caracterizado por un desmontaje controlado de la célula y, en células animales, resulta en la compartimentalización de los contenidos celulares y transporte de algunos contenidos fuera de la célula (Kratsch y Wise, 2000).

La PCD puede ocurrir como un proceso normal de desarrollo, tal como en la diferenciación final de elementos de las traqueidas o por senescencia inducida por el ambiente en hojas viejas. Esto puede ocurrir como respuesta al estrés ambiental tales como ataques de patógenos, heridas físicas o exposición a bajos niveles de toxinas. Aunque un alto número de marcadores ultraestructurales y bioquímicos de la PCD parecen estar compartidos entre células de animales y plantas (Dickman y Reed, 2004). Algunos trabajos han propuesto la posibilidad de que el daño por frío en plantas puede estar asociado a la PCD (Ishikawa, 1996; Yung *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997). La sensibilidad al daño por frío de una planta puede deberse a la habilidad de algunas especies a aclimatarse al daño (Cuadro 5), influenciado por el tiempo y aparición del daño ultraestructural (Cuadro 6) dando como resultado en bajo, moderado o severo (Kratsch y Wise, 2000).

Cuadro 5. Sensibilidad relativa al daño por frío de especies seleccionadas y síntomas observados en daño por frío inducido (Kratsch y Wise, 2000).

Tipo de Especies	Observación
Extremadamente sensible al daño por frío <i>Ephedra vulgaris</i> <i>Episcia reptans</i> <i>Gossypium hirsutum</i> <i>Saintpaulia ionantha</i> <i>Vigna radiata</i>	Único grupo en el cual el daño por frío inducido a la mitocondria ha sido observado. Resultados rápidos de daño por frío en plasmólisis celular. Imposible el re-enverdecimiento.
Menos Sensible al daño por frío <i>Cucumis sativus</i> <i>Fragaria virginiana</i> <i>Glicine max</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> Maíz <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Paspalum dilatatum</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Sorghum</i> spp. <i>Euphorbia pulcherrima</i>	Exhibe respuesta tardía al daño por frío. Cloroplasto hinchado, dilatación del tilacoide, montones de grana inclinadas, formación de retículo periférico, tilacoides con forma de serpentina, y acumulación de gotitas de lípido en el estroma. Cloroplastos desintegrados a daño por frío prolongado.
Resistente al daño por frío <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Brassica oleracea</i> <i>Cephaloziella exilifolia</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Secale cereale</i> <i>Selaginella</i> spp. <i>Spinacia oleracea</i> <i>Triticum aestivum</i>	Daño por frío no observado a menos que otro factor de estrés actúe simultáneamente. Los plastidios permanecen intactos. El re-verdecimiento sólo es imposible en etapas avanzadas de daño por frío.

Cuadro 6. Compilación de factores y síntomas de daño por frío en estudios ultraestructurales (Kratsch y Wise, 2000).

Aspectos de daño por frío	Síntoma u observación
<i>Frío en la oscuridad</i>	Almidón agotado. Extensión de cloroplasto hinchado y dilatación del tilacoide dependiendo de la sensibilidad al frío.
<i>Frío en la luz</i>	Almidón agotado, cloroplasto hinchado, tilacoide dilatado, formación de retículo periférico y gradiente de intensidad luminosa intra-hoja.
<i>Estrés asociado al agua</i>	Cloroplasto hinchado, acumulación de gotitas de lípidos, desintegración de cloroplastos observados. Alta humedad relativa protege.
<i>Duración del Frío</i>	Primera Etapa: Distorsiona las membranas del tilacoide, disminuye el almidón, formación de retículo periférico. Segunda Etapa: Desintegración sobre el cloroplasto, acumulación de gotitas de lípidos. Tercera Etapa: Separación del grana, dilatación de intra-espacios del tilacoide.
<i>Aclimatación del Frío</i>	Arquitectura de la membrana del tilacoide (granos pequeños y amontonados), citoplasma mesófilo en hojas y fosfolípidos: relación de esteroides libres en membranas celulares.
<i>Recuperación del Frío</i>	La habilidad de recuperación depende de cada especie; el re-enverdecimiento puede ser imposible en plantas extremadamente sensibles al frío.
<i>Sensibilidad por Frío inherente</i>	Hinchamiento mitocondrial observado solamente en plantas extremadamente sensibles. Plasmólisis ocurre solamente en especies sensibles al daño por frío; el estrés por frío sólo no es suficiente para dañar a las especies altamente resistentes al daño por frío.

2.3.4.1. EVIDENCIA UTRAESTRUCTURAL DE PCD DURANTE EL DAÑO POR FRÍO.

Se ha reportado que hay cambios estructurales rápidos solamente en células de parénquima en empalizada de la especie sensible al daño por frío *Saintpaulia* bajo condiciones de baja temperatura y alta humedad relativa (Yung *et al.*, 1996). Estas células exhiben un arreglo desordenado de la lamela intergranal del tilacoide, reducción del citoplasma lejos de la pared celular y condensación de la cromatina en el núcleo. Fisiológicamente las células permanecen activas, aunque se ha observado una reducción en la fluorescencia de la clorofila y disminución de la actividad fotosintética. El síntoma físico prominente de daño en *Saintpaulia* bajo estas condiciones fue la muerte celular en áreas limitadas de la hoja, llamada *mancha foliar*.

Ishikawa (1996) también observó condensación y fragmentación de la cromatina en células dañadas de frijol sensible al daño por frío. El daño por frío en estas células avanzó de manera ordenada y predecible: las primeras observaciones (a las 6 horas) incluían vesiculación de membranas celulares, incluyendo al retículo endoplásmico y el tonoplasto, y vacuolación de plastidios y mitocondrias. Vesículas alargadas del aparato de Golgi y arreglo dilatado del retículo endoplásmico en paralelo alrededor de áreas libres del citoplasma

preceden al hinchamiento de organelos. Después de 72-96 horas, el citoplasma se condensó y las vesículas se fusionaron con membranas de la vacuola realzando su contenido. Las células en etapas finales de exposición al daño por frío exhiben un encogimiento del citoplasma lejos de la pared celular y digestión de organelos y por último de la célula misma. Síntomas físicos, en este caso fueron irrelevantes porque las células fueron por medio de cultivo de tejidos.

Arabidopsis thaliana es una planta resistente al daño por frío. No obstante, Wu *et al.* (1997) demostraron secuencia de eventos similares en mutantes de *Arabidopsis* sensibles bajo daño por frío a 2°C por 28 días. Aunque es más sensible al daño por frío que su contraparte no mutante, esas plantas no fueron dañadas permanentemente por el tratamiento de frío. Sin embargo, por 14 días, los cloroplastos llegaron a desorganizarse con sus cubiertas dañadas, los granos de almidón desaparecieron, y las membranas del tilacoide eran con forma de serpentina en apariencia, recordando lo reportado por Wise *et al.* (1983) en *P. vulgaris* con estrés por frío en presencia de luz. Los cloroplastos en el mutante de *Arabidopsis* fueron asociados con pequeñas membranas en los límites de la periferia de las vacuolas. Después de 21 días a 2°C, los cloroplastos han desaparecido completamente del mutante y las hojas se vuelven cloróticas. Los autores adjudican esos cambios como una forma de autofagia, en la cual hay un rompimiento en el metabolismo regulado por los cloroplastos, dando acceso a reservas guardadas que puedan sostener a la planta hasta que prevalezcan condiciones más favorables.

En ambos ejemplos de daño ultraestructural por frío las células vegetales muestran similitudes en cuanto a cambios ultraestructurales que ocurren durante la muerte celular programada en plantas en crecimiento a temperaturas permisivas, como la desintegración de cloroplastos y vesiculación de membranas celulares (Buchanan-Wollaston, 1997), vacuolación y reducción del citoplasma (Mittler *et al.*, 1997) y condensación nuclear y fragmentación de ADN (Mittler *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Yen y Yang, 1998).

2.3.4.2. EVIDENCIA FISIOLÓGICA DE PCD DURANTE EL DAÑO POR FRÍO.

Un signo temprano de inminente muerte celular en algunas formas de muerte celular programada en plantas es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) (Levine *et al.*, 1994) y súper óxido (Jabs *et al.*, 1996), en algunos casos dando como resultado un incremento en el Ca^{++} citoplásmico libre (Levine *et al.*, 1996; Xu y Heath, 1998). El calcio es un mensajero secundario comúnmente usado por las plantas en la transducción de señales (Snedden y Fromm, 1998). Las ROS son conocidas por ser generadas a partir de daño por frío en presencia de luz en las plantas (Wise, 1995). Aunque ha sido ya bien establecido un sensor primario de baja temperatura en plantas, una redistribución del Ca^{2+} intracelular en respuesta al daño por frío se reportó en eventos iniciales (Woods *et al.*, 1984). Subsecuentemente, una teoría propuesta por Minorsky (1985), surgió en apoyo al papel del Ca^{++} en la transducción de los eventos dirigidos a inducir daño por frío.

Una consecuencia del elevado Ca^{2+} libre en las células vegetales que se presenta en PCD a temperaturas permisivas es la activación en cascada de enzimas proteolíticas envueltas en el desdoblamiento final de proteínas clave, las cuales inducen la muerte sistemática de la célula. Un ejemplo es la endonucleasa que depende del Ca^{2+} responsable de la fragmentación nuclear o del ADN del cloroplasto (Mittler y Lamb, 1995; D'Silva *et al.*, 1998). Otras sustancias de esas proteasas incluyen actina, tubulina y otras proteínas estructurales (citoesqueléticas) (Mittler *et al.*, 1997). El efecto del frío en las proteínas estructurales ha sido investigado por Woods *et al.* (1984), quienes encontraron que a largos periodos de exposición en células vegetales por arriba de temperaturas de congelación, la estructura citoesquelética se interrumpe. Aún tienen que describirse los disparadores moleculares para estos eventos en daño por frío.

2.3.4.3. MECANISMO PROPUESTO PARA LA INICIACIÓN Y PROPAGACIÓN DE PCD DURANTE EL DAÑO POR FRÍO.

Aunque existe evidencia del rol de la PCD en células vegetales con daño por frío inducido esto es algo preliminar, pero es posible proponer un mecanismo mediante el cual la PCD puede ser inducida por estrés frío en plantas (Figura 7). En donde la meta es encontrar los eventos moleculares y celulares de este fenómeno.

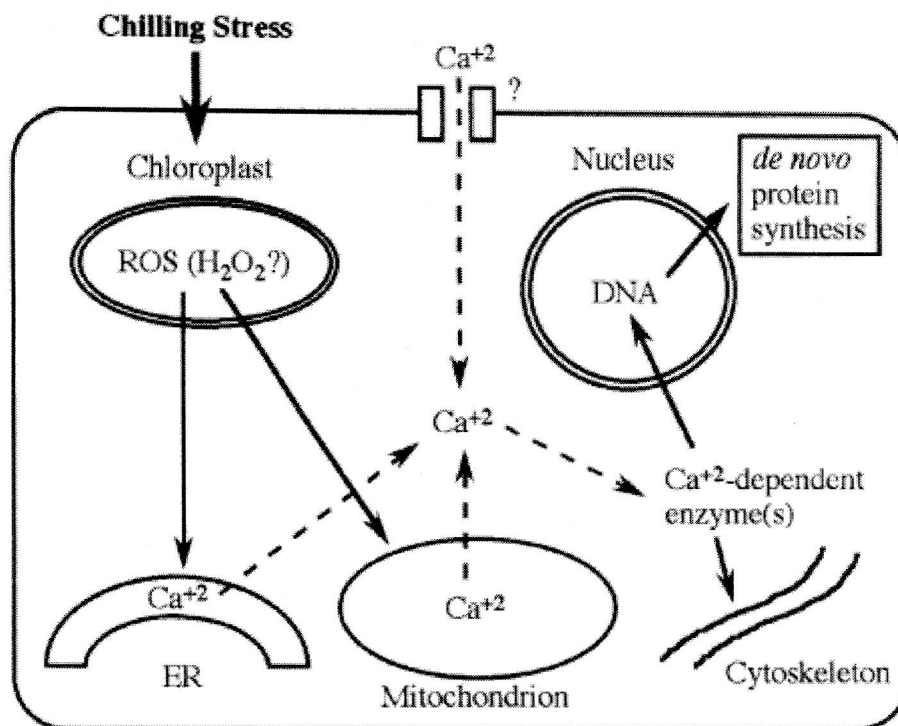


Figura 7. Pasos iniciales en el mecanismo propuesto de la PCD en daño por frío. De acuerdo con el modelo, el retraso de la respuesta de las plantas al daño frío y la condición propuesta para el comienzo de la PCD en células vegetales dañadas por frío es iniciado por la entrada de ROS que induce incremento en el Ca^{2+} proveniente de compartimentos intracelulares y posiblemente extracelulares. (Flecha discontinua). Los iones de calcio libres se enlazan con las proteínas que dependen del calcio, los cuales interactúan con otros procesos celulares y estructuras, incluyendo el citoesqueleto. Esas proteínas entrelazadas de calcio pueden dar cambios en la fosforilación de proteínas y estimular una cascada de enzimas proteolíticas que desdoblan proteínas clave y regulan el proceso. El calcio podría además regular la expresión génica actuando como mensajero secundario en procesos de transducción de señales, dirigiendo el traslado de nueva proteínas que regulan la respuesta tardía. Efectos tardíos incluyen al calcio mediante la fragmentación de moléculas de ADN (indicador clave de muerte celular programada) (Kratsch and Wise, 2000).

El daño por frío inducido es observado primeramente en el cloroplasto, por lo tanto se cree que la generación de ROS en el cloroplasto, inducida por condiciones que dan como resultado el retraso de la respuesta de las plantas al frío, iniciadores moleculares e incremento en los iones libres de calcio. Los iones libres de Ca^{2+} inducen cambios en la fosforilación de proteínas y actúan como mensajeros secundarios para estimular una variedad de procesos (Snedden y Fromm, 1998), incluyendo una cascada de enzimas proteolíticas (como las Caspasas) que separan selectivamente proteínas celulares clave. El calcio libre puede estar envuelto en la fragmentación del ADN del cloroplasto y del núcleo, por acción de las endonucleasas que separan moléculas de ADN en fragmentos más cortos para ser más eficientes. También los iones libres de calcio afectan la permeabilidad de la membrana y por lo tanto el transporte de metabolitos dentro y fuera del cloroplasto por acción del retículo periférico.

2.3.4.4. INDUCCIÓN DE PCD DURANTE EL DAÑO POR FRÍO.

La secuencia de eventos y cambios ultraestructurales que caracteriza la demora en la respuesta al frío son notablemente parecidos a otros mecanismos de muerte celular. Condiciones extremas o especies que son particularmente sensibles a sufrir cambios en la temperatura, resultan en una muerte rápida de toda la planta. Por otro lado, las plantas resistentes al frío o menos resistentes afectadas por daño por frío habrían de soportar más este tipo de daño. Se han propuesto tres rutas hipotéticas que pueden ser tomadas como referencia en plantas expuestas a daño por frío (Kratsch y Wise, 2000):

- A) Una ruta es característica de especies extremadamente resistentes al frío, como la espinaca (Cuadro 5). En esta ruta, aún a prolongado frío además de otros tipos de estrés, como alta luminosidad y/o alto déficit de presión de vapor, producción de daños mínimos; los efectos son generalmente reversibles. Las plantas responden con procesos de endurecimiento inicial en vez de PCD.
- B) Una segunda ruta caracteriza a las plantas extremadamente sensibles al daño por frío, como *Episcia reptans*. Estas plantas generalmente son de origen tropical que no han tenido presión de selección para adaptarse a tales procesos porque raramente son expuestas a temperaturas por debajo de los 15 °C. Cuando son expuestas artificialmente a dichas condiciones de daño por frío, el daño es rápido e irreversible.
- C) La tercera ruta se caracteriza por una secuencia predecible de eventos que son codificados en el genoma de las plantas que viven en ambientes altamente impredecibles. En estas plantas se observa que su metabolismo celular actúa en la síntesis de nuevas proteínas. Las condiciones bajo las cuales esta respuesta se manifiesta son significativas pero no suficientemente severas para causar muerte inmediata. Las especies que exhiben esta respuesta son variadas, depende principalmente de la sensibilidad al frío, de la oscuridad o bajo déficit de presión de vapor, o exposición a múltiples factores ambientales (alta luminosidad y/o alto déficit de presión de vapor) (Figura 8).

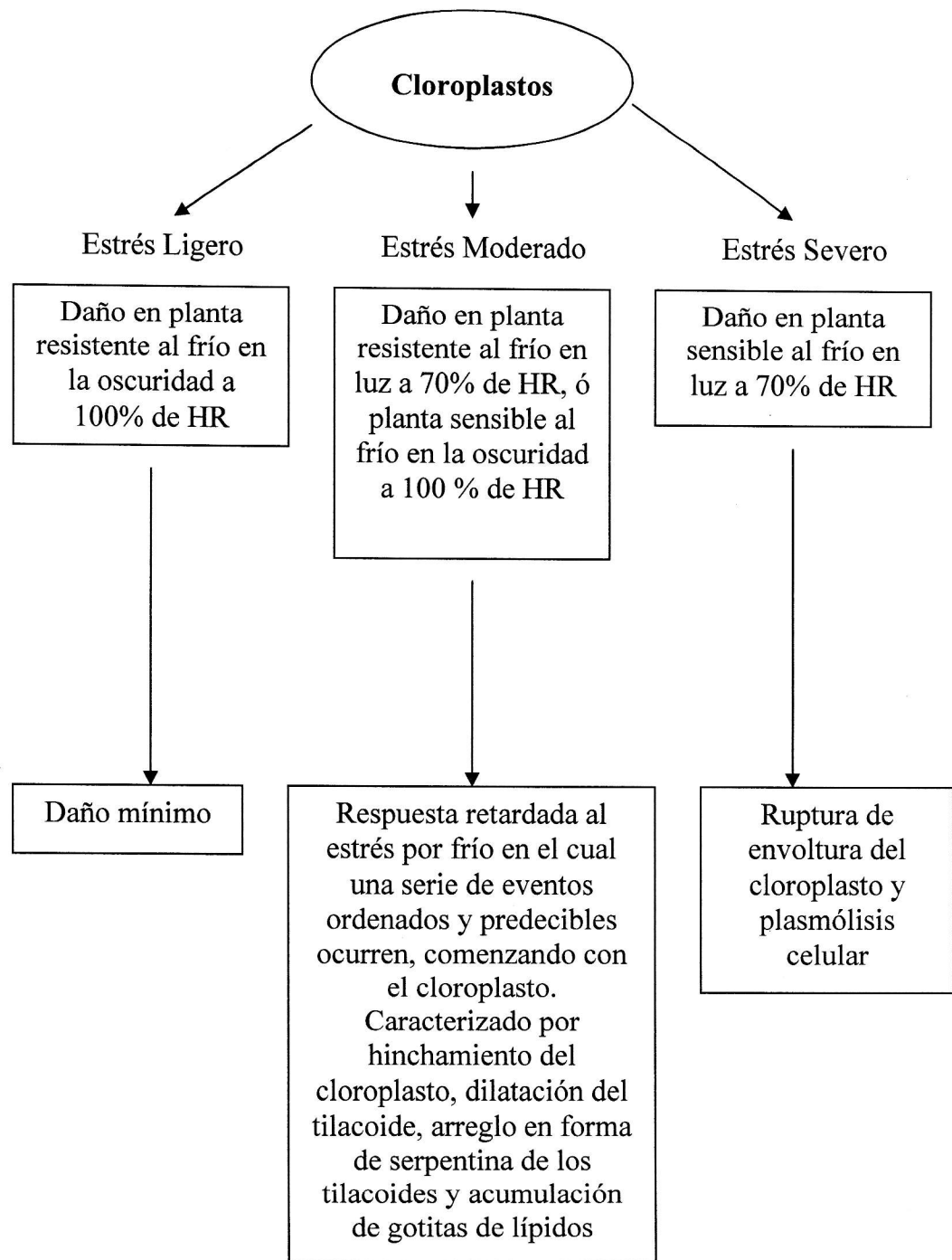


Figura 8. Interrelaciones entre condiciones ambientales y sensibilidad al frío en el proceso de daño por frío en el cloroplasto (Kratsch y Wise, 2000).

2.3.4.5. PROTEASAS.

Las proteasas (E.C. 3.4.21-24 y 99; peptidil-peptido hidrolasas) son enzimas que hidrolizan proteínas por medio de la adición de agua entre los enlaces peptídicos y catalizan la síntesis de péptidos en solventes orgánicos y en solventes con bajo contenido hídrico (Beg *et al.*, 2003). La hidrólisis de los enlaces peptídicos por las proteasas se conoce como *Proteólisis*; los productos de este proceso son fragmentos de proteína y aminoácidos libres.

Las enzimas proteolíticas se encuentran en todos los organismos vivos y son esenciales para la diferenciación y crecimiento celular. Las proteasas representan uno de los tres más grandes grupos de enzimas industriales ya que tienen diversos usos como aditivo de detergentes, en la industria de pieles, en la industria láctea, etc. (Gupta *et al.*, 2002).

2.3.4.5.1. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS.

De acuerdo a Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas están clasificadas de acuerdo a tres criterios (Rao *et al.*, 1998):

- A) La reacción catalizada,
- B) La naturaleza química del sitio catalítico,
- C) La relación evolutiva, revelada por su estructura.

Las proteasas están ampliamente clasificadas como endo- ó exoenzimas basado en su sitio de acción sobre su sustrato (Cuadro 7) (Rao *et al.*, 1998).

Cuadro 7. Clasificación de las proteasas (Rao *et al.*, 1998).

Proteasa	Número E.C.
<i>Exopeptidasas</i>	3.4.11
Aminopeptidasas	3.4.14
Dipeptidil peptidasa	3.4.14
Tripeptidil peptidasa	3.4.16-3.4.18
Carboxipeptidasas	3.4.16
Proteasa tipo serina	3.4.17
Metaloproteasa	3.4.18
Proteasa tipo cisteína	3.4.15
Peptidil dipeptidasa	3.4.13
Dipeptidasas	3.4.19
Omega peptidasas	3.4.19
<i>Endopeptidasa</i>	3.4.21-3.4.34
Serina proteasa	3.4.21
Cisteina proteasa	3.4.22
Aspartico proteasa	3.4.23
Metalo proteasa	3.4.24
Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido	3.4.99

2.3.4.5.1.1. EXOPROTEASAS.

Las exopeptidasas actúan solamente cerca de los extremos de las cadenas polipeptídicas. Basado en sus sitios de acción en los extremos N ó C, están clasificadas como amino- y carboxipeptidasas, respectivamente (Rao *et al.*, 1998).

2.3.4.5.1.1.1. AMINOPEPTIDASAS.

Las aminopeptidasas actúan en el extremo N libre de la cadena polipeptídica y libera un aminoácido simple como residuo, un dipéptido, o un tripéptido. Se sabe que remueven una metionina en el extremo N y puede ser encontrada en proteínas expresadas heterologamente pero no ocurre de manera natural en proteínas maduras (Rao *et al.*, 1998).

2.3.4.5.1.1.2. CARBOXIPEPTIDASAS.

Las carboxipeptidasas actúan en los extremos C de la cadena polipeptídica y libera un aminoácido simple o un dipéptido. Se dividen en tres grupos basados en la naturaleza del aminoácido residual en el sitio activo de la enzima (Rao *et al.*, 1998).

2.3.4.5.1.2. ENDOPEPTIDASAS.

Están caracterizadas por su acción preferencial en las regiones internas de la cadena polipeptídica lejos de los extremos N y C. La presencia de un grupo amino libre o carboxilo tiene una influencia en la actividad enzimática. Las endopeptidasas están divididas en cuatro subgrupos basado en su mecanismo catalítico, serina proteasas, aspartico proteasas, cisteína proteasa y metalo proteasa (Rao *et al.*, 1998).

2.3.4.5.1.2.1. SERINA PROTEASAS.

Están caracterizadas por la presencia de un grupo serina en su sitio activo. Son reconocidas por su inhibición irreversible de 3,4- dicloroisocoumarina (3,4-DCI),

L-3 carboxitrans 2,3-epoxipropil-leucilamida (4-guanidina) butano (E-64), diisopropilfluorofosfato (DFP), fenil metil sulfonil fluoride (PMSF) y tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK). Las serinas proteasas con activas generalmente a pH neutral y alcalino, con un óptimo de pH de entre 7 y 11. Tienen un amplia especificidad de sustrato que incluyen actividad esterolítica y amidasa. Su rango de masas molecular esta entre 18 y 35 kDa. Los puntos isoelectricos de las serinas proteasas son generalmente entre pH 4 y 6 (Rao *et al.*, 1998).

2.3.4.5.1.2.2. ASPARTICO PROTEASAS

Comunmente se conocen como proteasas acidas, son las endopeptidasas que dependen de acido aspartico para su actividad catalítica. Han sido agrupadas en tres familias: pepsina, retropepsina y enzimas para pararetrovirus. La mayoría de estas proteasas muestran la actividad máxima a bajo pH y tienen puntos isoelectricos en el rango de pH 3 a 4.5. Sus pesos moleculares están en el rango de 30 a 45 kDa. Son inhibidas por la pepstatina (Rao *et al.*, 1998).

2.3.4.5.1.2.3. CISTEÍNA PROTEASAS.

Se encuentra tanto en células procariotas como eucariotas. Generalmente están activas solamente en presencia de agentes reductores como HCN o cisteína. En el mecanismo catalítico de estas enzimas el grupo thiol de una cisteína juega un papel esencial. Este grupo es susceptible a la oxidación y puede reaccionar con una variedad de agentes; metales pesados, iodoacetato, N-etil-maleimida, etc. (Kenny, 1999). Basado en la especificidad del lado de su

cadena se dividen en 4 grupos: i) papaína, ii) tripsina, iii) específico al ácido glutámico y iv) otras. La papaína es la cisteína proteasa más conocida.

2.3.4.5.1.2.4. METALO PROTEASAS.

Están caracterizadas por los requerimientos de un ión metal divalente para su actividad. Basado en su especificidad de su acción, estas enzimas pueden dividirse en 4 grupos: neutral, alcalino, myxobacter I y myxobacter II. Son inhibidas por agentes quelatantes como el EDTA pero no por agentes sulfidrilo ó DFP.

2.3.4.5.2. PROTEASAS VEGETALES.

El uso de plantas como fuente de proteasas está regido por múltiples factores tales como la disponibilidad de tierra de cultivo y la adaptación a condiciones climáticas para su crecimiento. La papaína, bromelaína, keratinasas y ficina representan algunas de las proteasas de origen vegetal que se conocen (Rao *et al.*, 1998).

La papaína y la ficina son preparadas por extracción con agua de las especies *Carica papaya* y *Ficus carica* respectivamente. La bromelaína se obtiene generalmente de tallos de piña por extracción y precipitación fraccionada con solventes (Ward, 1985).

2.4. ESTRÉS OXIDATIVO.

Desde la introducción del oxígeno molecular (O_2) en nuestra atmósfera y su relación con organismos fotosintéticos aproximadamente hace 2.7 billones de años, las *Especies Reactivas de Oxígeno* (ROS, siglas en inglés) han sido compañeras inoportunas de la vida aeróbica (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las ROS son formas de oxígeno atmosférico (Halliwell y Gutteridge, 1999; Mittler, 2002). Usualmente resultan de la excitación del O_2 a una forma sencilla de oxígeno (O_2^1) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones del O_2 para formar, radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o un radical hidroxilo (HO^-). En contraste con el oxígeno atmosférico, las ROS son capaces de oxidar sin restricción varios componentes celulares y pueden inducir la destrucción oxidativa de la célula (Asada, 1999; Dat *et al.*, 2000).

En años recientes, se ha identificado un nuevo rol de las ROS: el control y regulación de procesos biológicos, tales como el crecimiento, ciclo celular, muerte celular programada, señales hormonales, respuestas al estrés biótico o abiótico y desarrollo (Mittler *et al.*, 2004). Estos estudios extienden nuestra comprensión de las ROS y sugieren un rol dual en biología vegetal como subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico y como reguladores clave del crecimiento, desarrollo y rutas de defensa.

El uso de las ROS como moléculas de señales por las células vegetales sugiere que, durante el curso de la evolución, las plantas fueron capaces de lograr un alto grado de control sobre la toxicidad y utilizan a las ROS como moléculas de

señales. El control de la toxicidad de las ROS tales como H_2O_2 u O_2^- para actuar como moléculas de señales parece requerir una larga red de genes compuestos por al menos 152 genes en *Arabidopsis* (Mittler *et al.*, 2004).

2.4.1. PRODUCCIÓN DE ROS EN CÉLULAS.

Existen varias fuentes potenciales de ROS en plantas (Cuadro 8). Algunas son reacciones envueltas en el metabolismo normal, tal como la fotosíntesis y la respiración, que están en línea con el concepto tradicional, considerando a las ROS como subproductos inevitables del metabolismo anaeróbico (Asada y Takahashi, 1987). Otras fuentes de ROS que pertenece a otras rutas aumentan durante el estrés abiótico, como la glicolato oxidasa en peroxisomas durante fotorespiración. Sin embargo, recientemente, se han identificado nuevas fuentes de ROS en plantas, incluyendo a la NADPH oxidasa, amino oxidasas y peroxidasas de la pared celular. Éstas están estrechamente reguladas y participan en la producción de ROS durante procesos como la muerte celular programada y en defensa de patógenos (Dat *et al.*, 2000; Grant y Loake, 2000).

Bajo condiciones normales de crecimiento la producción de ROS en células es baja ($240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ y en un nivel de estabilización es de $0.5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 en cloroplastos), muchos tipos de estrés rompen la homeostasis celular, por lo tanto aumentan la producción de ROS ($240\text{-}720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$ y en un nivel de estabilización es de $5\text{-}15 \mu\text{M}$ de H_2O_2) (Polle, 2001). Esto incluye a estrés por sequía, desecación, salinidad, daño por frío, daño térmico, metales pesados, radiación UV, contaminantes tales como el ozono y SO_2 , estrés mecánico, falta

de nutrientes, ataque de patógenos y estrés por alta luminosidad (Bowler, 1992; Allen, 1995; Suzuki y Mittler, 2006). La producción de ROS durante estos tipos de estrés proviene de rutas como la fotorrespiración, del aparato fotosintético y de la respiración mitocondrial. En suma, los patógenos y heridas o tipos de estrés ambiental (sequía o estrés osmótico) han sido los disparadores que activan la producción de ROS por las NADPH oxidasas (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999). El aumento en producción de ROS durante el estrés puede amenazar a las células, pero esto también es por medio de ROS que actúan como señales para la activación de respuesta al estrés y rutas de defensa (Knight y Knight, 2001). Así, las ROS pueden ser vistas como indicadores celulares del estrés y como mensajeros secundarios relacionados con la ruta de transducción de señales que responden al estrés.

Cuadro 8. Producción, búsqueda y anulación de ROS en plantas (Mittler, 2002).

Mecanismo	Localización	ROS primaria
Producción		
<i>Fotosíntesis, transporte de electrones y fotosistema I u II</i>	Cloroplasto	O_2^-
<i>Respiración, transporte de electrones</i>	Mitocondria	O_2^-
<i>Glicolato oxidasa</i>	Peroxisoma	H_2O_2
<i>Clorofila excitada</i>	Cloroplasto	O_2^1
<i>NADPH oxidasa</i>	Membrana plasmática	O_2^-
<i>β-oxidación de ácidos grasos</i>	Peroxisoma	H_2O_2
<i>Oxalacetato oxidasa</i>	Apoplasto	H_2O_2
<i>Xantina oxidasa</i>	Peroxisoma	O_2^-
<i>Peroxidasas, Mn^{2+} y NADH</i>	Pared Celular	H_2O_2 , O_2^-
<i>Amina oxidase</i>	Apoplasto	H_2O_2

Búsqueda		
<i>Superóxido dismutasa</i>	Cloroplasto, citosol, mitocondria, peroxisoma, apoplasto	O_2^-
<i>Ascorbato peroxidasa</i>	Cloroplasto, citosol, mitocondria, peroxisoma, apoplasto	H_2O_2
<i>Catalasa</i>	Peroxisoma	H_2O_2
<i>Glutation peroxidasa</i>	Citosol	H_2O_2 , $ROOH$
<i>Peroxidasas</i>	Pared celular, citosol, vacuola	H_2O_2
<i>Tioredoxina peroxidasa</i>	Cloroplasto, citosol, mitocondria	H_2O_2
<i>Ácido ascórbico</i>	Cloroplasto, citosol, mitocondria, peroxisoma, apoplasto	H_2O_2 , O_2^-
<i>Glutación</i>	Cloroplasto, citosol, mitocondria, peroxisoma, apoplasto	H_2O_2
<i>α-tocoferol</i>	Membranas	$ROOH$, O_2^1
<i>Carotenoides</i>	Cloroplasto	O_2^1
Anulación		
<i>Adaptaciones anatómicas</i>	Estructura foliar y epidermis	O_2^- , H_2O_2 , O_2^1
<i>Metabolismo C_4 o CAM</i>	Cloroplasto, citosol, vacuola	O_2^- , H_2O_2
<i>Movimiento del cloroplasto</i>	Citosol	O_2^- , H_2O_2 , O_2^1
<i>Supresión de fotosíntesis</i>	Cloroplasto	O_2^- , H_2O_2
<i>Fotosistema y modulaciones pigmentos antena</i>	Cloroplasto	O_2^- , O_2^1
<i>Oxidasa alternativa</i>	Cloroplasto, mitocondria	O_2^-

Aunque el nivel estable de las ROS puede ser usado por plantas para monitorear sus niveles intracelulares de estrés, éste nivel tiene que ser mantenido bajo estricto control porque la sobre-acumulación de ROS puede producir muerte celular (Mittler, 2002). Las ROS que inducen muerte celular pueden resultar del proceso oxidativo como la peroxidación de la membrana

lípida, oxidación de proteínas, inhibición enzimática y daño al ADN y ARN. Alternativamente, el aumento de los niveles de las ROS pueden activar una ruta de PCD, como fue demostrado por la inhibición del estrés oxidativo (paraquat) inducido a muerte celular en tabaco por genes anti-apoptóticos (Mitsuhara *et al.*, 1999).

Las ROS son tóxicas pero también participan en eventos de señales, las células vegetales requieren al menos dos mecanismos diferentes para regular sus concentraciones intracelulares por búsqueda de ROS: uno que permita la modulación de bajos niveles de ROS con el propósito de señales y el otro que permita la detoxificación de excesos de ROS, especialmente durante estrés. En suma, los tipos de ROS producidas y el balance entre los niveles del estado estabilizado de diferentes ROS también pueden ser importantes, ya que son determinadas por la interacción entre diferentes mecanismos de producción y búsqueda de ROS y pueden cambiar drásticamente dependiendo de la condición fisiológica de la planta y la integración de diferentes estímulos ambientales, de desarrollo y bioquímicos.

2.4.2. BÚSQUEDA DE ROS EN CÉLULAS.

Los principales mecanismos de búsqueda de ROS en plantas incluyen a la Superóxido Dismutasa (SOD), Ascorbato Peroxidasa (APX), Catalasa (CAT), Glutación Peroxidasa (GPX) y Peroxiredoxin (PrxR) (Asada y Takahashi, 1987; Bowler, 1992; Mittler *et al.*, 2004) (Cuadro 8). Junto con los antioxidantes ácido ascórbico y glutación (Noctor y Foyer, 1998), estas enzimas proporcionan a las

células una maquinaria de alta eficiencia para detoxificar O_2^- y H_2O_2 . El balance entre SODs y las diferentes enzimas buscadoras de H_2O_2 en células es considerado crucial en determinar el nivel de estado constante de O_2^- y H_2O_2 . Este balance, junto con el secuestro de iones metal por la ferritina y otras proteínas, previenen la formación del radical $HO\cdot$ altamente tóxico por vía de la reacción de Haber-Weiss o por la reacción de Fenton (Asada y Takahashi, 1987; Bowler, 1992). Las fuentes celulares de los antioxidantes ácido ascórbico y glutatión son mantenidas en su estado reducido por un grupo de enzimas capaces de usar el NADPH para regenerar glutatión oxidado o ácido ascórbico (ejemplo: monodehidroascorbato reductasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa). Aunque las dehidroascorbato reductasas y glutaredoxinas son capaces de reducir ácido dehidroascórbico, muchas otras enzimas en plantas pueden catalizar esta reacción con diferentes eficiencias (Mittler *et al.*, 2004). En suma, los radicales monohidroascorbato pueden ser reducidos de regreso a ácido ascórbico por vía de la ferredoxina usando electrones desviados del aparato fotosintético en el ciclo agua-agua en cloroplastos (Asada, 1999) (Figura 9). La búsqueda de H_2O_2 también puede ser mediada en plantas por la “clásica” peroxidasa vegetal (clase III) usando un rango de reductores. Estas enzimas son codificadas por una larga familia de genes de al menos 73 genes en *Arabidopsis* y fueron encontradas en el citosol, vacuola, apoplasto o pared celular (Hiraga *et al.*, 2001; Tognolli *et al.*, 2002). Aunque los análisis de transcripción de plantas “knockout” y antisentido deficientes en APX1 ó CAT2 indicaron que el nivel de estado estable de transcriptores que codifican ciertas peroxidasas clásicas vegetales es elevado, la significancia de

estos descubrimientos es desconocida hasta la fecha. Se necesita investigación adicional para determinar si las peroxidasas específicas de la clase III contribuyen en la capacidad de búsqueda de ROS en las células y pueden ser incluidas en la red de genes de ROS en plantas.

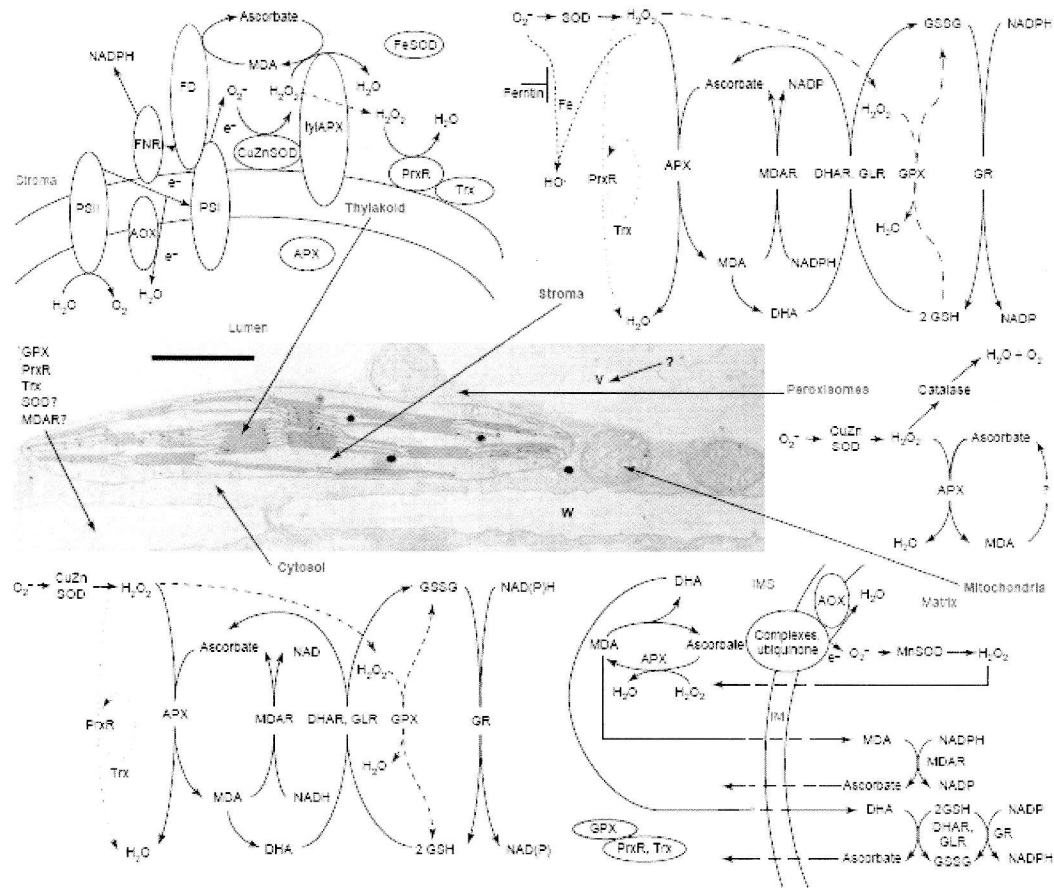


Figura 9. Localización de las rutas de búsqueda de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en células vegetales. Se muestran las rutas enzimáticas responsables de la detoxificación de las ROS. El ciclo agua-agua detoxifica O_2 y H_2O_2 , y la oxidasa alternativa (AOX) reduce la tasa de producción de O_2 en tilacoides [parte superior a la izquierda; en algunas plantas la hierro-superóxido dismutasa (FeSOD) puede reemplazar a la CuZnSOD en el cloroplasto]. Las ROS que escapan a este ciclo y/o que son producidas en el estroma experimentan la detoxificación por la SOD y por el ciclo ascorbato-glutatión. La Peroxiredoxina (PrxR) y la glutatión peroxidasa (GPX) también están

involucradas en la remoción de H_2O_2 en el estroma [parte superior derecha]. Las ROS producidas en peroxisomas durante fotorespiración, oxidación de ácidos grasos u otras reacciones son eliminadas por SOD, catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) [parte media derecha]. La SOD y otros componentes del ciclo ascorbato-glutación también están presentes en la mitocondria. En suma, la AOX previene el daño oxidativo en la mitocondria [parte inferior derecha]. En principio, el citosol contiene el mismo grupo de enzimas encontradas en el estroma [parte inferior izquierda]. Sin embargo, éstas son codificadas por un grupo diferente de genes y la mayor actividad de hierro-quelado en el citosol responsable de prevenir la formación de radicales $HO\cdot$ se desconoce. Los componentes enzimáticos responsables de la detoxificación de las ROS en el apoplasto y en la pared celular [W] se conocen parcialmente, y las rutas de búsqueda de las ROS en la vacuola [V] no se conocen. Las rutas de la GPX están indicadas por líneas (---) y las rutas de la PrxR están indicadas por líneas (···) en el estroma y citosol. Aunque las rutas en diferentes compartimentos están generalmente separadas unas de otras, el H_2O_2 puede difundirse fácilmente a través de membranas y antioxidantes tales como el glutatión y ácido ascórbico (reducido u oxidado) puede ser transportado entre diferentes compartimentos. Abreviaciones: DHA, dehidroascorbato; DHAR, DHA reductasa; FD, ferredoxina; FNR, ferredoxina NADPH reductasa; GLR, glutaredoxina; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; IM, membrana interna; IMS, espacio inter-membrana; MDA, monodehidroascorbato; MDAR, MDA reductasa; PSI, fotosistema I; PSII, fotosistema II; Trx, tioredoxina; tyl, tilacoide (Mittler *et al.*, 2004).

La afinidad del sustrato, la tasa de reacción y la concentración de la enzima son parámetros importantes cuando se valora la contribución relativa de las diferentes enzimas para la detoxificación de las ROS (Mittler, 2002). Bajo condiciones óptimas, una combinación de estos parámetros permite a las enzimas como la CuZnSOD tener la tasa de reacción a la difusión-limitada ($2 \times$

$10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Asada y Takahashi, 1987). Las membranas son altamente susceptibles al estrés oxidativo. En células vegetales, éstas son protegidas por la actividad específica de glutatión peroxidasas y el α -tocoferol (vitamina E), cuya función es mantener su estado reducido por la fuente de ácido ascórbico reducido (Rodríguez-Milla *et al.*, 2003). La protección celular contra $\text{O}_2^{\cdot -}$ generalmente se cree mediada por los carotenoides. Aunque sería interesante explorar como esas rutas están relacionadas con la biosíntesis de ascorbato y glutatión, y éstos a su vez ser responsables de reparar el daño oxidativo en las células.

2.4.3. ANULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS.

La anulación de producción de ROS puede ser tan importante como la búsqueda activa, porque muchas condiciones de estrés abiótico son acompañadas por un aumento de la tasa de producción de ROS, pero evitando o aliviando los efectos de tipos de estrés tales como la sequía o la alta luminosidad en el metabolismo de las plantas se reducirá el riesgo de producción de ROS. Los mecanismos que pueden reducir la producción de ROS durante el estrés (Cuadro 8) incluyen: (1) adaptaciones anatómicas tales como el rizado de hojas, desarrollo de epidermis que refractan la luz y cierre de estomas en estructuras especializadas; (2) adaptaciones fisiológicas tales como el metabolismo C_4 y CAM y (3) mecanismos moleculares que reparan nuevamente el aparato fotosintético y sus antenas en concordancia a la calidad de la luz e intensidad o suprimiendo completamente la fotosíntesis (Mittler, 2002).

La producción de ROS también puede disminuirse por medio del transporte alternativo de electrones por medio de las cadenas de transportadores de electrones del cloroplasto y la mitocondria por un grupo de enzimas llamadas oxidasas alternativas (AOXs). Las AOXs pueden desviar el flujo de electrones a través de cadenas de transportadores de electrones y usarlos para reducir el O_2 a agua (Figura 10). La disminución de la AOX mitocondrial incrementa la sensibilidad de las plantas al estrés oxidativo (Maxwell *et al.*, 1999). En suma, la AOX de cloroplastos es inducida en plantas transgénicas que les falta APX y/o CAT y en plantas normales para que respondan a altas luminosidades (Mittler, 2002).

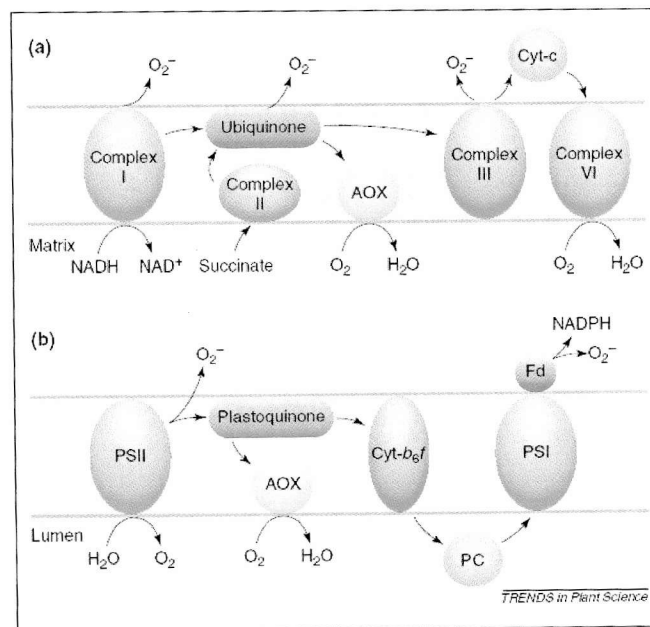
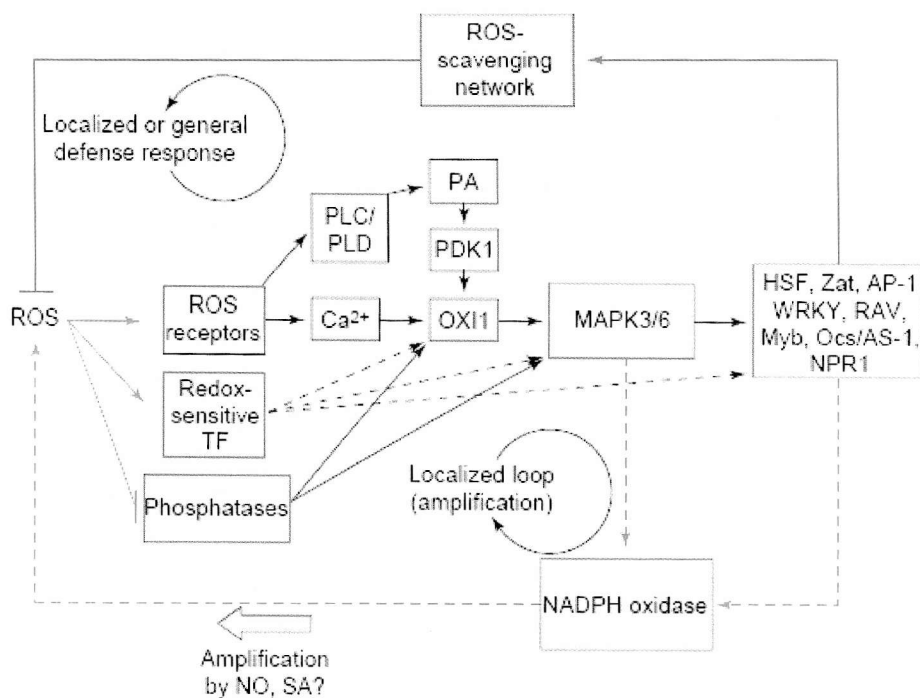


Figura 10. Participación de la oxidasa alternativa (AOX) en la anulación de las ROS. Para ambos casos la cadena transportadora de electrones de la mitocondria (a) y del cloroplasto (b) la AOX desvía electrones que pueden ser usados para reducir el O_2 a O_2^- y usar esos electrones para reducir O_2 a H_2O .

En suma, la AOX reduce el nivel conjunto del O₂ y el sustrato para la producción de ROS en el organelo. La AOX se indica en amarillo y los diferentes componentes de la cadena del transporte de electrones están indicados en rojo, verde o gris. Abreviaciones: Cyt-b₆f, citocromo b₆f, Cyt-c, citocromo c; Fd, ferredoxina; PC, plastocianina; PSI, PSII, fotosistemas I y II (Mittler, 2002).

2.4.4. RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL DE LAS ROS EN PLANTAS.

Recientes estudios en *Arabidopsis* han descubierto algunos componentes clave relacionados en la ruta de transducción de señal de las ROS en plantas. Aunque los receptores de las ROS son desconocidos hasta la fecha, esto ha sugerido que las células vegetales sienten las ROS mediante al menos tres mecanismos diferentes (Figura 11): (i) receptores de proteínas no identificados; (ii) factores de transcripción sensibles a la reducción, tales como NPR1 o HSFs; y (iii) inhibición directa de fosfatasa por las ROS (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004).



TRENDS in Plant Science

Figura 11. Modelo generalizado de la ruta de transducción de señal de las ROS. Las ROS pueden ser detectadas por al menos tres mecanismos (Receptores de las ROS, factores de transcripción sensibles a la reducción y fosfatasa). La detección de las ROS por los receptores resulta en la generación de señales de Ca^{2+} y la activación de una actividad de fosfolipasa C/D (PLC/PLD) que genera ácido fosfatídico (PA). PA y Ca^{2+} se piensa que activan la proteína kinasa OXI1. La activación de OXI1 resulta en la activación de una cascada de una proteína kinasa activada mitogenicamente (MAPK) (MAPK3/6) y la inducción o activación de diferentes factores de transcripción que regulan las rutas de búsqueda y producción de ROS. La activación o inhibición de factores de transcripción sensibles a la reducción por las ROS pueden también afectar la expresión de OXI1 u otras kinasas y/o la inducción de factores de transcripción específicos de ROS. La inhibición de fosfatasa por las ROS puede resultar en la activación de kinasas tales como OXI1 o MAPK3/6. Se muestran diferentes relaciones que participan en la ruta de transducción de señales de ROS. Una respuesta de defensa localizada o general (línea verde sólida) puede ser activada para suprimir ROS, mientras

que una relación localizada amplificada (línea roja discontinua) puede ser activada para aumentar las señales de ROS por medio de la actividad de las NADPH oxidasas. El ácido salicílico (SA) y el óxido nítrico (NO) pueden estar relacionados favoreciendo esta ampliación. Abreviaciones: HSF, factor de shock de calor; PDK, kinasa que depende de fosfoinositida; TF, factor de transcripción (Mittler *et al.*, 2004).

Los eventos de señales asociados con las ROS envuelven al Ca^{2+} y sus proteínas, tal como la calmodulina (Bowler y Fluhr, 2000; Knight y Knight, 2001), la activación de proteínas G (Baxter-Burrell *et al.*, 2002) y la activación de señal de fosfolípido, el cual resulta en la acumulación de ácido fosfatídico (Anthony *et al.*, 2004; Rentel *et al.*, 2004). Es posible que la localización de señales de ROS en lugares celulares específicos sea similar a las señales del Ca^{2+} en respuesta a estímulos (Mittler *et al.*, 2004). El desarrollo de sensores intercelulares análogos de ROS a la fluorescencia basado en proteínas sensoras para el Ca^{2+} podría ayudar considerablemente en estudiar el espacio y naturaleza de señales de ROS en plantas.

Recientemente una serina/treonina kinasa (OXI1) ha jugado un rol central en la percepción de las ROS y la activación de las proteínas kinasas mitogénicas activadas (MAPKs) 3 y 6 por medio del Ca^{2+} (Rentel *et al.*, 2004). Esta kinasa también es activada por la PDK1 a través de la ruta fosfolipasa-C/D-ácido fosfatídico (Anthony *et al.*, 2004). La expresión de diferentes factores de transcripción es aumentada por las ROS e incluye miembros de las WRKY, Zat, RAV, GRAS y familias de la Myb (Rizhsky *et al.*, 2004). En recientes estudios

usando plantas “knockout” se ha revelado que la proteína Zat12 es requerida para la expresión de la *Apx1* y protección vegetal durante el estrés oxidativo (Rizhsky *et al.*, 2004), y que las fracciones LOL1 y LSD1 tienen efecto antagonista sobre la SOD y la acumulación de O_2^- (Epple *et al.*, 2003).

La posible existencia de amplificaciones fuentes relacionadas con las NADPH oxidasas en señales de ROS ha sido recientemente sugerido en estudios farmacológicos y genéticos (Dat *et al.*, 2003; Rizhsky *et al.*, 2004). Estas fuentes podrían ser activadas por bajos niveles de ROS y da como resultado el aumento en la producción y amplificación de señales de las ROS en lugares específicos de la célula (Figura 11, fuente amplificada localizada, líneas rojas discontinuas). La acumulación de las ROS en células puede ser activada por medio de las rutas de búsqueda de las ROS y da como resultado la supresión de ROS en lugares específicos o en toda la célula (Figura 11, respuesta localizada o general, líneas verdes continuas). Como ya se ha indicado, la interacción entre las rutas de producción y búsqueda las ROS determinará la intensidad, duración y localización de las señales de ROS (Figura 11 y 12). Aunque se ha considerado que el O_2^- y el H_2O_2 juegan un papel clave como moléculas de transducción de señales de las ROS, estudios recientes han señalado una ruta de señales específicas de $O_2^{\cdot 1}$ (Apel y Hirt, 2004).

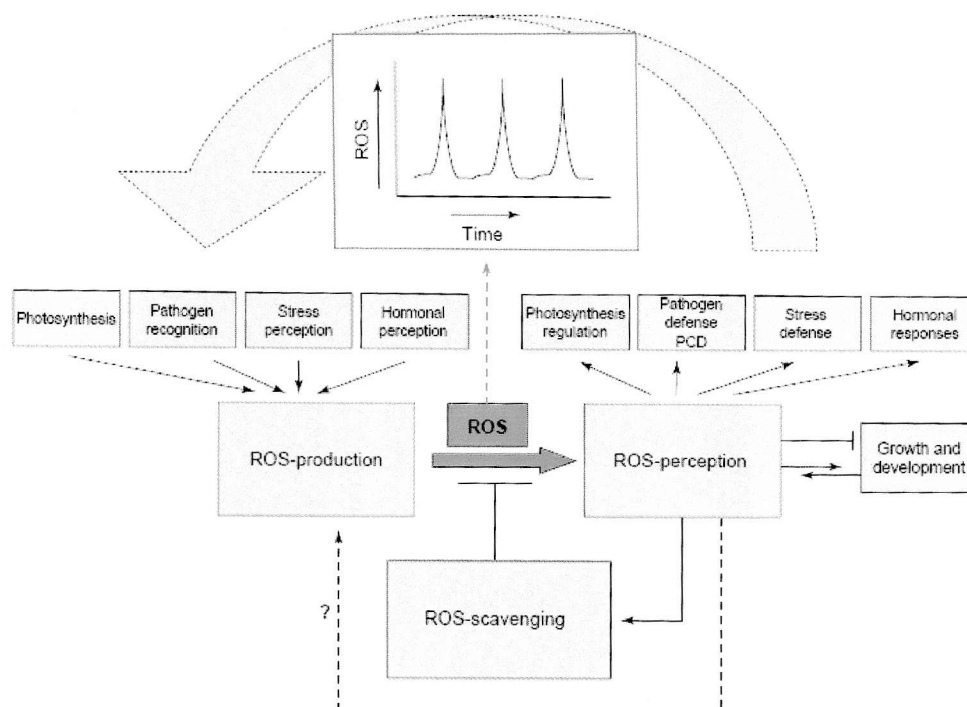


Figura 12. Modulación de señales de ROS por la red de genes reactivos de oxígeno en plantas. Diferentes señales celulares (ejemplo, reconocimiento de patógenos o percepción del estrés) dan como resultado el aumento en la producción de ROS en las células por las rutas de producción de las ROS. Las ROS son percibidas por diferentes sensores de ROS y respuestas celulares activas (ejemplo, patógenos o defensa al estrés). La intensidad, duración y localización de las señales de ROS están determinadas por la interacción entre las rutas de producción y búsqueda de las ROS. Las rutas de búsqueda de las ROS también son responsables de mantener un nivel bajo estable de las ROS en el cual se pueden registrar diferentes señales. La modulación de los niveles de ROS podría estar relacionada con una fuente positiva de retroalimentación entre la percepción y la producción de las ROS (línea discontinua). En general, para activar o suprimir las diferentes respuestas celulares, la percepción de las ROS puede afectar el crecimiento y desarrollo (inhibición durante estrés o regulación durante el crecimiento normal). Abreviación: PCD, muerte celular programada (Mittler *et al.*, 2004).

2.4.5. ROS COMO INTERFASE ENTRE ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO.

Las ROS juegan un papel central en la defensa de plantas contra el ataque de patógenos. Durante esta respuesta, las ROS son producidas por las células vegetales por medio de las NADPH oxidasas, peroxidasas y amino oxidasas en el apoplasto (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Grant y Loake, 2000). El H_2O_2 producido durante esta respuesta (arriba de $15 \mu M$; directamente o como resultado de la dismutación del superóxido) es difundido en las células y junto con el ácido salicílico (SA) y el NO (óxido nítrico) activan muchas defensas vegetales, incluyendo la PCD (Dangl *et al.*, 1996; Klessing *et al.*, 2000). La actividad de la APX y CAT es suprimida durante esta respuesta por las hormonas vegetales SA y NO (Klessing *et al.*, 2000), la producción de APX es suprimida post-transcripcionalmente (Mittler, 2002) y la producción de CAT es sub-regulada al nivel de estabilización del ARNm (Dorey *et al.*, 1998). Así, la planta produce simultáneamente más ROS y al mismo tiempo disminuye su propia capacidad a buscar H_2O_2 , dando como resultado la sobre-acumulación de ROS y la activación de la PCD (Mittler *et al.*, 1999; Delledonne *et al.*, 2001).

El papel que juegan las ROS durante la PCD parece ser contrario al papel que juegan durante el estrés abiótico, durante el cual las ROS inducen mecanismos de búsqueda de las ROS tales como la APX y CAT que disminuyen el nivel de estado estabilizado de las ROS en las células (Figura 13). Las diferencias en la función de las ROS entre tipos de estrés biótico y abiótico podrían resultar de la acción de hormonas tales como la SA y NO, de la interferencia entre diferentes rutas de señales o de diferencias en el nivel de estado estabilizado que las ROS

producen durante diferentes tipos de estrés. El aparente conflicto en el metabolismo de las ROS entre estrés biótico y abiótico amplía la pregunta de cómo la planta manipula sus tasas de producción y búsqueda de ROS cuando está bajo un ataque biótico durante un estrés abiótico. En apoyo a la posible existencia de tal conflicto, en plantas de tabaco que fueron previamente sujeto a estrés oxidativo (y por consecuencia tuvieron un alto nivel de enzimas antioxidantes) tuvieron una tasa de reducción de PCD comparado con plantas testigo sin ningún tipo de estrés (Mittler *et al.*, 1999). Además, en plantas que sobre-producen CAT tienen una disminución en la resistencia a la infección por patógenos (Dorey *et al.*, 1998).

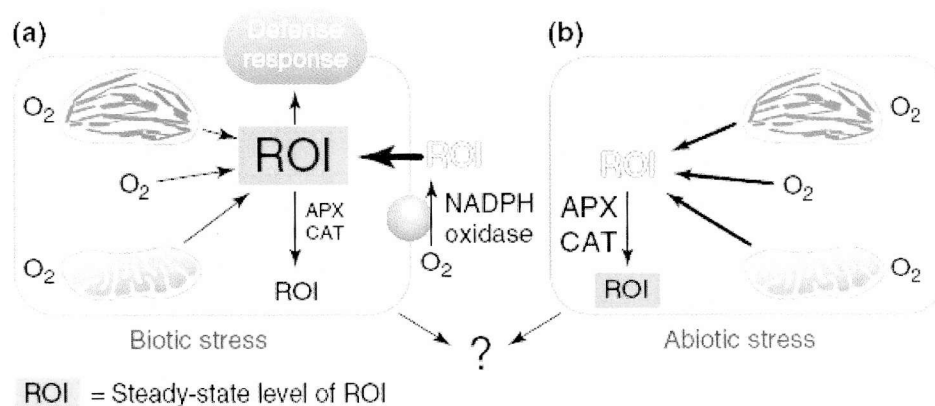


Figura 13. Diferencia entre niveles de estado estabilizado de ROS durante estrés biótico y abiótico. El estrés biótico (a) resulta de la activación de la NADPH oxidasa y de la supresión de la ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT). Esto permite la sobre-acumulación de ROS y la activación de mecanismos de defensa. El estrés abiótico (b) aumenta la producción de ROS en cloroplastos y mitocondria. Sin embargo, para inducir enzimas buscadoras de ROS como la APX y la CAT, se reducen los niveles de ROS. El signo de interrogación indica lo que no se conoce acerca de la regulación del

metabolismo de las ROS durante una combinación de tipos de estrés biótico y abiótico. Los cloroplastos se indican en verde, la mitocondria en gris y los niveles de estado estabilizado de las ROS en amarillo (Mittler, 2002).

2.4.5.1. ROS Y ESTRÉS POR TEMPERATURA.

La homeostasis celular se logra por un balance delicado entre múltiples rutas que residen en diferentes organelos. Esta coordinación puede, sin embargo, ser interrumpida durante estrés por temperatura, porque diferentes rutas dentro de las células tienen diferente temperatura óptima. Por ejemplo, debido a las propiedades físicas de las membranas, procesos asociados a las membranas como la fotosíntesis y respiración son más sensibles a estrés por temperatura comparado con rutas que son principalmente llevadas a cabo por enzimas solubles. Cuando diferentes rutas son desacopladas, los electrones que tienen un estado de alta energía son transferidos de oxígeno molecular (O_2) a una especie reactiva de oxígeno (Asada y Takahashi, 1987; Mittler 2002; Mittler *et al.*, 2004). Las ROS como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ y $HO^{\cdot}$ son moléculas tóxicas capaces de causar daño oxidativo a las proteínas, ADN y lípidos (Apel y Hirt, 2004). Bajo condiciones óptimas de crecimiento, son principalmente producidas a bajos niveles en organelos como cloroplastos, mitocondria y peroxisomas. Sin embargo, durante estrés, su tasa de producción se eleva dramáticamente. En cloroplastos, la limitación de CO_2 fijado acoplado con la sobre-reducción de la cadena transportadora de electrones es la mayor causa de producción de ROS. La sobre-reducción de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria también es un mecanismo mayor de producción de ROS durante estrés

(Davidson y Schiestl, 2001). En contraste, en peroxisomas, el H_2O_2 es producido cuando el glicolato es oxidado a ácido glioxílico durante fotorespiración (Mittler *et al.*, 2004). Una parte esencial para la detoxificación de las ROS durante el metabolismo normal y particularmente durante estrés, son los antioxidantes como el ácido ascórbico y el glutatión, y las enzimas buscadoras de ROS como la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y la peroxiredoxina (PrxR) (Asada y Takahashi, 1987; Iba, 2002; Mittler *et al.*, 2004). Estas han sido encontradas en casi todos los compartimentos celulares, demostrando la importancia de la detoxificación de ROS para la supervivencia celular (Suzuki y Mittler, 2006).

El estrés por temperatura como calor, frío o congelamiento es una causa principal de bajo rendimiento en cultivos (Boyer, 1982) y las ROS generadas por esos tipos de estrés han sido vistos dañando membranas celulares y proteínas (Larkindale y Knight, 2002). Un contribuidor adicional al daño celular durante estrés por temperatura es la alta luminosidad. El estrés por alta luminosidad tiene el potencial de incrementar la producción de ROS en la células y causar daño oxidativo a los cloroplastos (Niyogi, 1999). Esto fue visto para aumentar la producción de ROS y daños asociados a las ROS durante estrés por temperatura (Larkindale y Knight, 2002). Estudios previos demostraron que los mecanismos de búsqueda de las ROS tienen un rol importante en la protección de plantas contra estrés por temperatura y una combinación de alta luminosidad

y estrés por temperatura (Iba, 2002; Larkindale y Knight, 2002; Yoshimura *et al.*, 2004).

Las ROS tienen el potencial de causar daño oxidativo celular durante el estrés ambiental, en estudios recientes se ha visto que las ROS juegan un papel clave en plantas como moléculas de transducción de señales relacionadas en respuesta a infección por patógenos, estrés ambiental, PCD y estímulo de desarrollo (Mittler *et al.*, 2004; Torres y Dangl, 2005). El rápido incremento en la producción de ROS, llamada “el flujo oxidativo”, fue observado siendo esencial para muchos de esos procesos, y en estudios genéticos se ha visto que los genes homólogos respiratorios de flujo oxidativo (Rboh), codifican a las NADPH oxidasas, que son las principales productores de transducción de señales asociadas a las ROS en células durante esos procesos (Mittler *et al.*, 2004; Torres y Dangl, 2005).

2.4.5.1.1. ESTRÉS POR FRÍO Y ROS.

El estrés por frío fue observado aumentando la transcripción, concentración de proteína y actividad de diferentes enzimas buscadoras de ROS (Sato *et al.*, 2001). El estrés por bajas temperaturas fue también observado para inducir la acumulación de H₂O₂ en células (O’Kane *et al.*, 1996).

En *Arabidopsis*, un número de genes sensibles al frío como los RD29A, KIN1, KIN2, COR15A, COR47, DREB1A, DREB2A y ERD10 han sido identificados (Thomashow, 1999; Seki *et al.*, 2002). La contribución de algunos genes

sensibles al frío para controlar ROS bajo estrés por frío fue sugerido por Lee *et al.* (2002). Un mutante de *Arabidopsis* “congelado 1” (*fro1*) mostró reducción en la expresión de genes sensibles al frío como los RD29A, KIN1, COR15A y COR47, y la acumulación de ROS. El gen *FRO1* mostró que codificaba una proteína mitocondrial del complejo I, sugiriendo que la expresión de genes sensibles al frío y la acumulación de ROS pueden ser moduladas por la disrupción de una función mitocondrial.

Hsieh *et al.* (2002) observaron que la expresión transgénica del activador transcripcional CRT/DRE-factor obligatorio 1 (CBF1), aumenta la tolerancia al frío en plantas de tomate. El aumento de la expresión y la actividad enzimática de la CAT fueron también detectadas en plantas transgénicas, y el nivel de H₂O₂ en plantas transgénicas fue menor que en plantas silvestres. En *Arabidopsis*, la sobre-expresión de la NDP kinasa 2 (NDPK2) aumenta la tolerancia al frío (Moon *et al.*, 2003). La NDP kinasa 2 mostró interacción con las MAPKs, AtMPK3 y AtMPK6 (Moon *et al.*, 2003). Plantas transgénicas con sobre-expresión de la NDPK2 mostraron niveles bajos de H₂O₂ comparado con plantas silvestres, y un mutante carente de AtNDPK2 mostró un aumento en la acumulación de H₂O₂. La proteína zinc finger Zat12 y otras proteínas zinc en respuesta a las ROS mostraron regular genes inducidos por frío (Rizhsky *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005). Un análisis de microarreglos demostró que los genes sensibles al frío fueron sobre-regulados por la sobre-expresión de Zat12 (Vogel *et al.*, 2005), sugiriendo un posible papel suprimiendo la ruta de factor

responsable al frío. Estos estudios demostraron una relación cercana entre las ROS, las señales de las ROS y la respuesta al estrés por frío.

2.4.6. SUPERÓXIDO DISMUTASAS.

Las ROS son producidas en células no estresadas y también bajo condiciones de estrés. Las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa contra las ROS, en la que está relacionada su formación y su eliminación. Bajo condiciones de no estrés, la formación y remoción del O_2 está en balance. Sin embargo, el sistema de defensa, cuando presenta un incremento en la formación de ROS bajo condiciones de estrés, puede ser agobiado. Las plantas responden a un incremento en las ROS que el mecanismo de defensa es incapaz de remover con el incremento de procesos antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos (Alscher *et al.*, 2002), pero los mecanismos fundamentales de estos procesos no están muy claros aún.

Dentro de una célula, las *Superóxido Dismutasas* (SODs, en inglés) (E.C. 1.15.1.1) constituyen la primera línea de defensa contra las ROS. El O_2^- es producido en cualquier lugar donde una cadena transportadora de electrones esté presente, y de ahí puede ocurrir la activación del O_2 en diferentes compartimentos celulares (Elstner, 1991), incluyendo a mitocondria, cloroplastos, microsomas, glioxisomas, peroxisomas, apoplastos y el citosol (Figura 14). Mientras todos los compartimentos celulares son sitios posibles para la formación de O_2^- , los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas

probablemente sean los generadores más importantes de ROS (Fridovich, 1986).

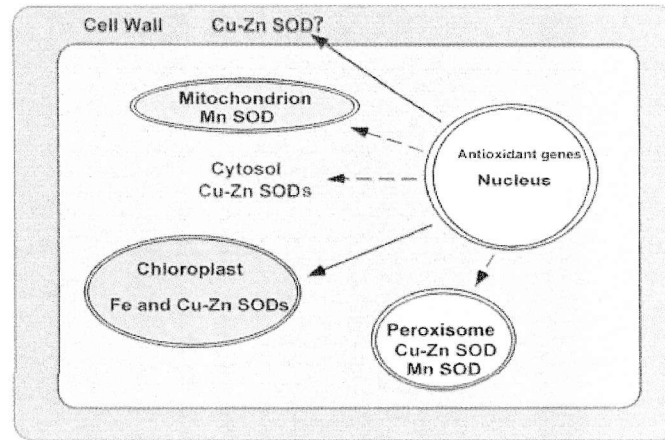


Figura 14. Localización de las SODs en la célula vegetal (Alscher *et al.*, 2002).

Se ha visto que las membranas de fosfolípidos son impermeables a las moléculas cargadas de O_2^- (Takahashi y Asada, 1983). Por lo tanto, es crucial que las SODs estén presentes para la remoción del O_2^- en los compartimentos donde se formen los radicales O_2^- (Takahashi y Asada, 1983). Basado en el metal co-factor usado por la enzima, las SODs son clasificadas en tres grupos: hierro SOD (Fe SOD), manganeso SOD (Mn SOD) y cobre-zinc SOD (Cu-Zn SOD), y esas SODs están localizadas en diferentes compartimentos celulares. Las Fe SODs están localizadas en el cloroplasto, las Mn SODs en la mitocondria y el peroxisoma, y las Cu-Zn SODs en el cloroplasto, el citosol y posiblemente en el espacio extracelular (Figura 14). La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidos de estos tres tipos de SODs sugieren que las Mn y Fe SODs son las SODs más antiguas, y esas enzimas muy

probablemente han surgido de la misma enzima ancestral, mientras que las Cu-Zn SODs no tienen secuencia similar a las Mn y Fe SODs y probablemente ha evolucionado de manera separada en eucariontes (Kanematsu y Asada, 1990; Smith y Doolittle, 1992). La razón evolutiva de la separación de las SODs con diferentes requerimientos de metal es probablemente relacionada a la diferente disponibilidad de compuestos metales solubles en la biosfera en relación al contenido de O₂ en la atmósfera en diferentes eras geológicas (Bannister *et al.*, 1991).

2.4.6.1. HIERRO SODs (Fe SODs).

El grupo de las Fe SODs probablemente constituye el grupo más antiguo del grupo de las SODs. Esto ha sido sugerido ya que el hierro fue probablemente el primer metal usado como co-factor en el sitio activo de la primera SOD (Bannister *et al.*, 1991). Como los niveles de O₂ en el ambiente se incrementaron, los componentes minerales del ambiente fueron oxidados. La disminución del hierro disponible (II) en el ambiente causó un daño por el uso de más metal disponible, Mn (III).

La Fe SOD se encuentra tanto en procariontes como en eucariontes. En eucariontes ha sido aislada de *Euglena gracilis* (Kanematsu y Asada, 1979) y en plantas superiores. La Fe SOD es inactivada por el H₂O₂ y es resistente a la inhibición por el KCN. En todas las especies de plantas estudiadas se infiere que la Fe SOD está localizada en el cloroplasto. Anticuerpos policlonales fueron elevados en comparación con la Fe SOD de lily acuática (*Nuphar luteum*) (Salin

y Bridges, 1981). Cuando estos anticuerpos fueron incubados con protoplastos de lily acuática, se observó que los anticuerpos predominantes estaban asociados con los cloroplastos (Salin, 1988). Tres Fe SODs fueron reportadas en *Arabidopsis thaliana* (Kliebenstein *et al.*, 1998). La ausencia de Fe SOD en animales ha dado aumento al supuesto que el gen Fe SOD se originó en el plastidio y se movió al genoma nuclear durante la evolución. En apoyo a esta teoría viene de la existencia de varias regiones conservadas que están presentes en secuencias Fe SOD de plantas y cianobacterias, pero ausentes en bacterias no-fotosintéticas (Bowler *et al.*, 1994). Las tres secuencias de Fe SOD en plantas codifican a un único triplete (SRL para *N. plumbaginifolia* y *G. max* y ARL para *A. thaliana*) cerca del extremo carboxilo terminal de la enzima. La secuencia conservada SRL/ARL no está presente en proteínas Fe SOD de procariontes mostrando que no es obligatorio para la función enzimática (Van Camp *et al.*, 1994).

Existen dos grupos diferentes de Fe SOD. El primer grupo es un homodímero formado por dos subunidades idénticas de proteína de 20 kDa, con 1 ó 2 átomos gramo de hierro en el sitio activo. Este tipo de Fe SOD ha sido aislada de *Escherichia coli* (Yost y Fridovich, 1973); *Photobacterium sepoa* y *P. leiognathi* (Puget y Michelson, 1974); anaeróbicos facultativos, *Thiobacillus denitrificans* (Baldensperger, 1978); la bacteria purpuro-sulfurosa, *Chromatium vinosum* (Kanematsu y Asada, 1978); y las especies vegetales, *Ginkgo biloba*, *Brassica calpestris* y *Nuphar luteum* (Salin y Bridges, 1980). El segundo grupo, encontrado en la mayoría de las plantas superiores, es un tetrámero de cuatro

subunidades idénticas con un peso molecular de 80-90 kDa. Miembros de este grupo contienen de 2 a 4 átomos de hierro en el sitio activo. Las proteínas en este grupo se han aislado de tres procariontes, *Mycobacterium tuberculosis* (Kusunone *et al.*, 1976), *Thermoplasma acidophilum* (Searcy y Searcy, 1981) y *Methanobacterium bryantii* (Kirby *et al.*, 1981); y en un eucarionte, *Tetrahymena pyriformis* (Barro *et al.*, 1990).

2.4.6.2. MANGANESO SODs (Mn SODs).

Como los niveles de O_2 en el ambiente se incrementaron, la cantidad de hierro (II) disponible en el ambiente fue disminuyendo, causando un cambio a más manganeso (III) disponible. Como consecuencia, las Mn SODs son las segundas en antigüedad y posiblemente la Fe SOD fue su ancestro. Las Mn SODs portan solamente un átomo del metal por subunidad. Estas enzimas no funcionan sin el átomo de Mn presente en el sitio activo y tiene alta similitud en cuanto a su estructura primaria, secundaria y terciaria con respecto a la Fe SOD (Fridovich, 1986). La catálisis por las Mn SODs es por la atracción de moléculas de O_2^- cargadas negativamente a un sitio formado por aminoácidos cargados positivamente presentes en el sitio activo de la enzima. El metal presente en el sitio activo posteriormente dona un electrón directamente al O_2^- , reduciendo una molécula de O_2^- , la cual forma H_2O_2 por reacción con un protón (Asada, 1994; Bowler *et al.*, 1994).

La Mn SOD es también una enzima homodimérica u homotetrámera con un átomo de Mn (III) por subunidad. La enzima no es inhibida por el KCN o

inactivada por el H_2O_2 y está presente tanto en eucariontes como en procariontes. Las Mn SODs en plantas son similares aproximadamente 65% en cuanto a su secuencia unas con otras y esas enzimas también tienen alta similitud a las Mn SODs bacteriales (Bowler *et al.*, 1994).

Aunque la Mn SOD es conocida como enzima mitocondrial en eucariontes, una Mn SOD ha sido localizada en los peroxisomas. La presencia de una Mn SOD peroxisomal y otra mitocondrial fue observada usando ensayos de inmunolocalización en melón (del Río *et al.*, 1992). Cuatro genes que codifican para la Mn SOD fueron reportados en maíz (Zhu y Scandalios, 1993). Secuencias deducidas de aminoácidos de esas cuatro isoenzimas tienen una secuencia concentrada en la mitocondria, indicando que todas se localizan en la mitocondria. En *Nicotiana plumbaginifolia*, dos genes nucleares que codifican para la Mn SOD fueron aislados y la expresión específica de la Mn SOD fue observada por medio de un análisis de fusión promotora con la β -Glucoronidasa (GUS) en plantas transgénicas (Van Camp *et al.*, 1996). La Mn SOD ha sido encontrada en la mitocondria del tabaco, frijol, sandía, claveles, chícharos, espinacas y algunas otras plantas (Alscher *et al.*, 2002). Una Mn SOD peroxisomal fue reportado en chícharo para la remoción de O_2 formado como resultado de la acción de la xantina oxidasa, pero ninguna de las secuencias conocidas de Mn SOD parece tener una secuencia de péptido de tránsito para concentración peroxisomal (Bowler *et al.*, 1994). En algas verdes y cianobacterias, la Mn SOD es encontrada en la membrana del tilacoide (Kanematsu y Asada, 1979; Okada *et al.*, 1979).

2.4.6.3. COBRE-ZINC SODs (Cu-Zn SODs).

Cuando la atmósfera fue reabastecida completamente con oxígeno, el hierro (II) fue casi completamente indisponible y el cobre (I) insoluble fue convertido en cobre (II) soluble. En esta etapa, el Cu (II) comenzó a ser usado como el metal co-factor en los sitios activos de las SODs. Desde que las Fe SODs y las Mn SODs tienen propiedades eléctricas similares, la transición del uso de hierro al uso del manganeso requirió un pequeño cambio en la estructura de la proteína SOD. Así, las Mn y Fe SODs son estructuralmente muy similares. Sin embargo, las propiedades eléctricas de las Cu-Zn SODs difieren bastante de las Mn y Fe SODs. Por lo tanto, un mayor cambio en la estructura de la proteína ocurrió después de que el Cu llegara a ser el metal co-factor (Bannister *et al.*, 1991). Las Fe y Mn SODs están presentes tanto en eucariontes como en procariontes mientras que las Cu-Zn SODs se encuentran en algunas bacterias, incluyendo *Photobacterium leiognathi*, *Caulobacter crescentus* y las *Pseudomonas*. Las tres hipótesis que podrían explicar la presencia de la Cu-Zn SOD en procariontes son las siguientes:

- a) Las Cu-Zn SODs evolucionaron independientemente en procariontes y eucariontes.
- b) La Cu-Zn SOD originada en eucariontes y el gen eucariótico fue transferido a los procariontes. Esta hipótesis fue propuesta por Martin y Fridovich (Martin y Fridovich, 1981) y después fue apoyada por Bannister y Parker (Bannister y Parker, 1985) del por que el 30% de similitud entre las secuencias de aminoácidos de las Cu-Zn SODs en ponyfish y en su simbiote *Photobacterium leiognathi*. Después de tomar punto de

mutaciones en consideración esta similitud se incrementó a 44% dando más apoyo a esta hipótesis (Leunissen y de Jong, 1986). Sin embargo, la presencia de Mn SOD en *Caulobacter crescentus* y en *Pseudomonas* que no son simbioses se cree que esta hipótesis requiere un refinamiento adicional (Steinman, 1985).

- c) La Cu-Zn SOD primero se originó en procariontes y después fue transferida a eucariontes. Sin embargo, esta hipótesis trae consigo el requisito improbable que las enzimas procarióticas y eucarióticas tienen un ancestro común que tuvo Cu-Zn SODs antes de que los procariontes y los eucariontes se separaran, los cuales, en turno, fue antes que la disponibilidad del Cu (II) en la atmósfera.

Las Cu-Zn SODs son encontradas a través de la célula vegetal. Hay dos grupos diferentes de Cu-Zn SODs. El primer grupo consiste de formas citoplásmicas y periplásmicas, las cuales son homodiméricas. El segundo grupo comprende Cu-Zn SODs cloroplásticas y extracelulares, las cuales son homotetraméricas (Bordo *et al.*, 1994). Los sitios activos de cada subunidad funcionan independientemente. Cuando estas subunidades están separadas y después se acoplan con una subunidad inactiva, nuevas enzimas son formadas mostrando actividad completa, dando como evidencia que las interacciones funcionales entre las subunidades no son esenciales para la actividad catalítica completa (Fridovich, 1986).

La Cu-Zn SOD existe tanto en formas cloroplásticas como citosólicas. Secuencias deducidas de aminoácidos de esas dos isoformas muestran aproximadamente un 68% de similitud, mientras que hay un 90% de similitud entre las Cu-Zn SODs cloroplásticas y de 80-90% de similitud entre las Cu-Zn SODs citosólicas (Alscher *et al.*, 2002). Algunos investigadores propusieron que la Cu-Zn SOD en el apoplasto funciona en la lignificación y que en el núcleo protege a la célula contra mutaciones fatales causadas por moléculas de O₂- (Ogawa *et al.*, 1997). La ocurrencia de una Cu-Zn SOD peroxisomal de melón, la cual representó cerca del 18% del total de la actividad de la SOD en la célula, fue también reportada por Sandalio y del Río (1987). La presencia de una Cu-Zn SOD peroxisomal también se observó en células de hígado de rata (Dhaunsi *et al.*, 1992).

2.4.7. OXILIPINAS.

Muchos de los factores de estrés biótico y abiótico conocidos inician la peroxidación de la membrana y sintetizan la producción de jasmonatos y otras oxilipinas biológicamente activas (Reymond y Farmer, 1998). Históricamente, el ácido jasmónico (JA) es la mayor oxilipina que ha recibido una amplia atención de los ecologistas y fisiólogos. Sin embargo, estudios recientes sugieren un rol importante de otras oxilipinas en la regulación de la respuesta en la defensa vegetal. Cuatro enzimas degradadoras de lípidos, fosfolipasa D, ácido fosfatídico fosfatasa, lipolítica acil hidrolasa y lipoxigenasas (LOX) se les atribuye el aumento de la biosíntesis de varias señales moleculares lipídicas que se cree que participan en respuesta al estrés vegetal (Bate y Rothstein,

1998; Thompson *et al.*, 1998; Hamberg *et al.*, 1999; Wang, 1999; Schaller, 2001; Howe y Schilmiller, 2002).

Entre las cuatro enzimas degradadoras de lípidos, las LOX mediante peroxidación de lípidos permite a los productos tales como los ácidos grasos polinsaturados (PUFA's, siglas en inglés), alquenos y aldehídos a participar en respuestas al estrés vegetal (Bate y Rothstein, 1998; Schaller, 2001). En vegetales, basado en sus afinidades para introducir oxígeno molecular en el ácido linoleico ó ácido linolénico, dos formas de LOX's, 9 ó 13, fueron identificadas. Se requiere de más investigación para entender completamente el papel de los hidroperóxidos lipídicos incluyendo a los volátiles C6 en la regulación en la defensa vegetal y su interacción con otras rutas de señales.

2.4.7.1. PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS.

La peroxidación de lípidos es un proceso en el que los ácidos grasos son las moléculas blanco más sensibles a los radicales libres (D'Erme *et al.*, 1998), esta reacción se lleva a cabo en los grupos funcionales dienos que conforman los ácidos grasos de la membrana celular que al oxidarse producen H_2O_2 y aldehídos, provocando a su vez, reacciones con otras moléculas biológicas y ocasionar daño celular (Chen y Qu, 1997), que puede ser evaluado en forma de estrés oxidativo. Tras la descomposición de los PUFA's de las membranas biológicas se generan, entre otros, malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi alqueno (4-HNE), como productos finales de reacción.

Los ácidos grasos polinsaturados (PUFA's) son fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos, constituyentes principales de las membranas y son responsables, en buena medida de la fluidez de ésta. La función de estos lípidos localizados en las membranas biológicas es mantener la integridad de la célula (Anónimo, 2007). Entre los lugares en los que se pueden encontrar los PUFA's destacan la membrana plasmática, la membrana celular del retículo endoplasmático y la membrana de la mitocondria.

Los PUFA's son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo y su degradación se denomina peroxidación lipídica. Esta peroxidación es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, ya que la destrucción de los PUFA's de la membrana junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas y la ruptura de éstas, provoca un desmoronamiento de la estructura de la membrana que conduce a una pérdida de la permeabilidad y posteriormente, a la muerte celular (Figura 15). La susceptibilidad de las membranas a la peroxidación depende, en gran medida, del grado de insaturación y de la posición de los dobles enlaces en la membrana, así como de la existencia de iones hierro, ya que son estos los que catalizan en su mayoría las reacciones de oxidación, además de activar el oxígeno en la formación de ROS (Anónimo, 2007).

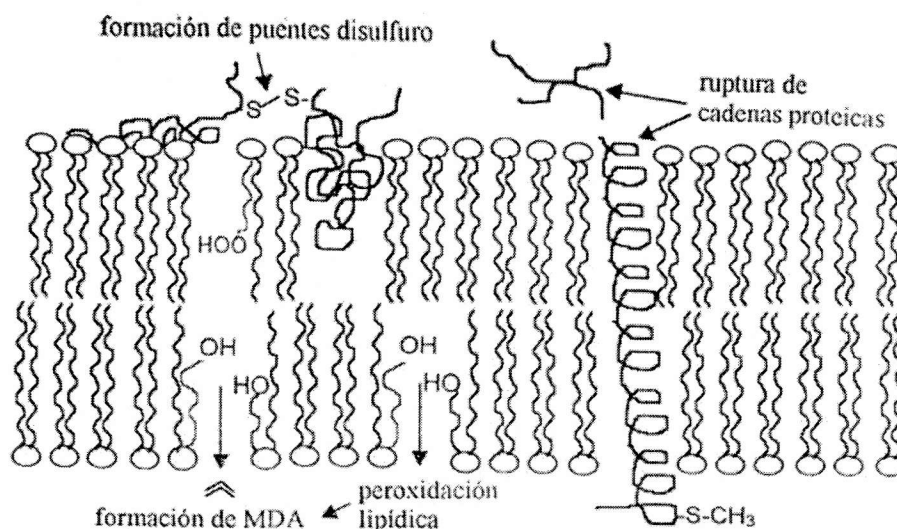


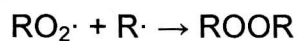
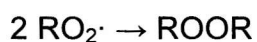
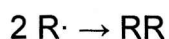
Figura 15. Resultados del Daño Oxidativo provocado por las ROS sobre las membranas (Anónimo, 2007).

La peroxidación de lípidos ocurre en tres fases: iniciación, propagación y terminación. El proceso puede comenzar por el radical hidroxilo, el radical hidroperoxilo o por el oxígeno singulete (Buija, 2007).

- Iniciación. El radical libre produce la remoción de un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena hidrocarbonada, dejando un electrón desapareado y dar formación a un radical alquil ($R\cdot$). Este radical $R\cdot$ sufre un reordenamiento molecular para originar un dieno conjugado.
- Propagación. El dieno conjugado reacciona con el oxígeno molecular para dar formación a un radical peroxil ($ROO\cdot$) que reacciona con otro ácido graso polinsaturado y le extrae un hidrógeno de un carbono contiguo a un doble enlace formando un radical alquil y un

hidroperóxido. El radical $R\cdot$ reacciona con otra molécula de O_2 y la reacción en cadena continua.

- Terminación. El hidroperóxido lipídico puede reaccionar con metales de transición e iniciar otra cadena de propagación formando aldehídos, alcanos, etc. La reacción de propagación culmina por la reacción de radicales.



Peróxidos dentro de membranas puede ser removidos (convertidos en alcoholes) por medio de enzimas fosfolípido hidroperoxido glutatión peroxidasas. Alternativamente, pueden ser unidas de membranas por la acción de fosfolipasas, después del cual la liberación de los peróxidos de los ácidos grasos libres pueden actuar sobre la glutatión peroxidasa ordinaria (Figura 16). Incrementos en Ca^{2+} causado por estrés oxidativo pueden activar la fosfolipasa A_2 , la cual puede hidrolizar fosfolípidos.

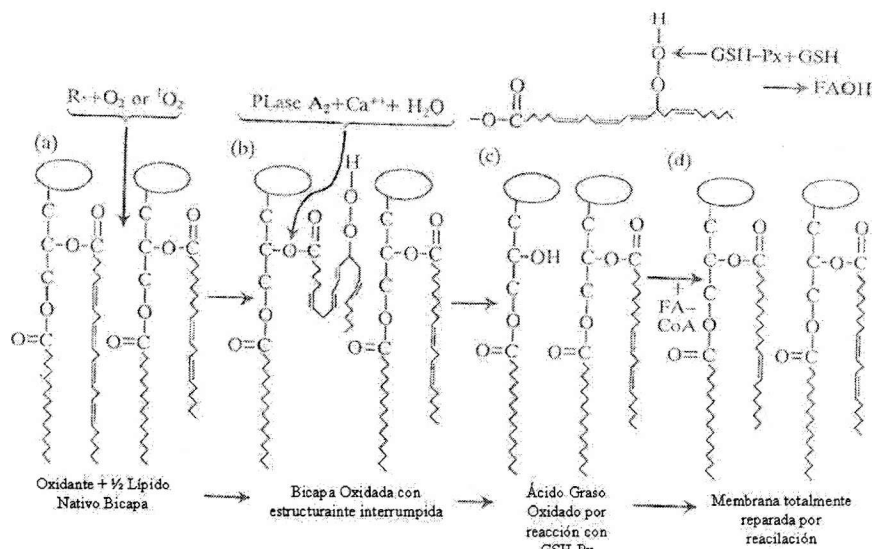


Figura 16. Modelo para reparación de peróxidos lipídicos. Formación de peróxidos en la membrana causa re-acomodo como los hidroperóxidos más polares que se mueven hacia la superficie de la membrana. Ahí ellos son unidos por la fosfolipasa A₂ (PLase A₂) en presencia de iones Ca²⁺. La glutatión peroxidasa (GSH-Px) en el líquido circundante reduce los peróxidos liberados de ácidos grasos a alcoholes (FAOH). La reparación está completa por la reaclación con una coenzima grasa-acil A (Halliwell y Gutteridge, 1999).

2.4.7.1.1. MALONILALDEHÍDO.

El Malonilaldehído, llamado en algunas veces malonaldehído, fue el centro de atención en la peroxidación lipídica por algunos años porque con la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA) era la forma *in vivo* de medir el MDA producido. De hecho, el MDA es formado solamente en pequeñas cantidades durante la peroxidación de la mayoría de los lípidos, aunque grandes cantidades son producidas durante la peroxidación de microsomas de hígado en presencia de sales de hierro (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El MDA surge de la peroxidación de los PUFA's con más de dos dobles enlaces, como el ácido linoleico, araquidónico y docosahexaenoico. El MDA también puede ser formado enzimáticamente durante el metabolismo eicosanoide. El MDA existe en varias formas, dependiendo del pH (Figura 17). A pH fisiológico cualquier MDA libre existirá como anión enolato el cual tiene baja reactividad hacia más grupos amino. Cuando el pH baja, sin embargo, la reactividad se incrementa. Bajo condiciones fisiológicas, las proteínas son más factibles a ser atacadas por el MDA que los aminoácidos libres, dando como resultado una modificación de algunos residuos, especialmente lisina (Halliwell y Gutteridge, 1999).

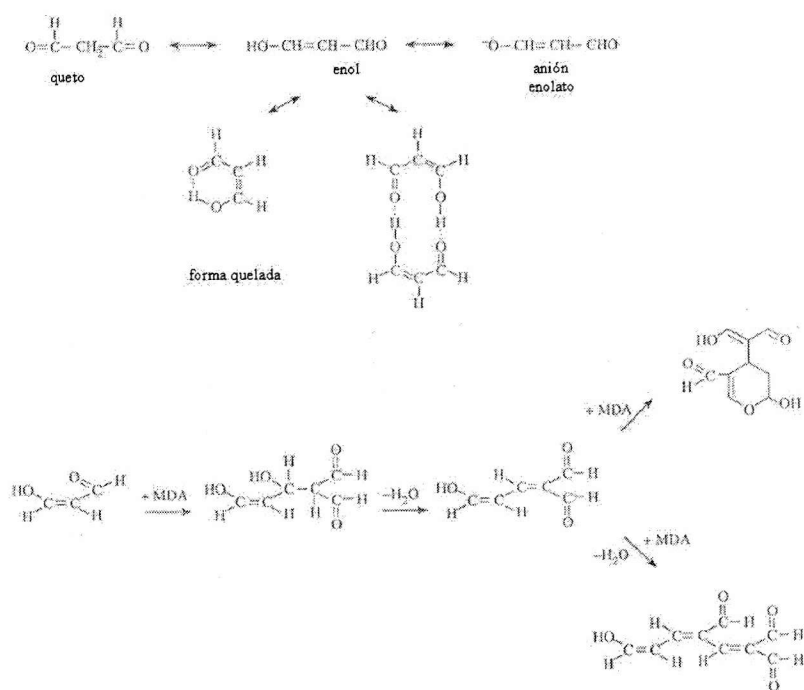


Figura 17. Estructuras del malondialdehído (MDA) en solución acuosa. Parte superior: a pH neutro ó alcalino, el mayor porcentaje (99%) del MDA es como anión enolato mientras que en pH ácido, éste existe como una forma no

disociada de enol, β -hidroxiacroleína, en equilibrio con la forma queto. Enlaces de hidrógeno intramolecular favorecen la formación de una forma cíclica quelada, la cual puede formar un complejo dimérico. Parte inferior: como la mayoría de los aldehídos, el MDA en solución acuosa es propenso a condensaciones aldol la cual produce dimeros, trimeros y polímeros largos, muchos de los cuales son fluorescentes (excitación a 365-395 nm, emisión a 490 nm) (Halliwell y Gutteridge, 1999; tomado de Esterbauer, 1991).

2.4.8. ASCORBATO PEROXIDASA.

La ascorbato peroxidasa (APX, siglas en inglés, E.C. 1.11.1.11) pertenece a una familia multigénica en *Arabidopsis*. La APX 1 y 2 son enzimas citosólicas. Una APX asociada a membrana se describió en el peroxisoma y también en el cloroplasto (Mullen y Trelease, 2000). El cloroplasto posee dos enzimas APX diferentes conocidas, una está libre en el estroma y la otra está asociada con los tilacoides. La expresión de todos los miembros conocidos de la familia de genes APX son afectados por eventos originados en el cloroplasto (Karpinski *et al.* 1997). Cuando el tejido fotosintético es cambiado de baja a alta luminosidad, se producen ROS, en especial peróxido de hidrógeno. El glutatión reducido es reducido a GSSG, y el ARNm de la APX 2 citosólico se puede detectar. El ARNm de la APX 2 es inducido en siete minutos por exposición al EEE. La inducción de la APX 1 y 2 está relacionada con el estado redox de la plastoquinona (Pfannschmidt *et al.*, 1999).

Sen Gupta *et al.* (1993) reportaron que los triples dobles incrementan en la actividad citosólica de la APX y el ARNm de la APX ocurren en plantas

transgénicas de tabaco que sobre-expresan la Cu-Zn SOD en cloroplastos. Esta inducción podría ser imitada en discos foliares de tabaco no transformados con la adición de H_2O_2 . Van Camp *et al.* (1996) demostraron la existencia de tres APX izoenzimas en *Arabidopsis*, dos plastídicas y una citosólica. Los datos mostrados por Van Camp *et al.* (1996) que la actividad cloroplástica de la APX 1 fue más alta en plantas transgénicas sobre-expresando Fe SOD. Estos resultados sugieren que el nivel de incremento del producto del gen en una parte de la ruta puede afectar otras enzimas en la misma ruta. Este tipo de co-regulación puede ser crítica en la interpretación de los datos usando plantas antisentido donde la Fe SOD citosólica es suprimida. Estos datos también sugieren que el H_2O_2 juega un papel en la ruta de señales de transducción en respuesta al estrés, desde la presencia activa de la enzima Fe SOD en los sobre-expresores permitiría incrementar los niveles celulares de H_2O_2 . Prasad *et al.* (1994) presentan evidencia que es compatible con el papel de señales por el peróxido de hidrógeno en la aclimatación de plántulas de maíz al estrés por frío. Recientemente un gen el cual actúa regulando la expresión génica de la APX ha sido encontrado, en el cual niveles de glutatión son más bajos, pero la ruta biosintética del glutatión por si misma no es afectada (Mullineaux *et al.*, 2000).

Cambios mediados por el estrés en la abundancia de una transcrita en particular no siempre se correlaciona con los cambios correspondientes en el nivel de proteína antioxidante y/o actividades enzimáticas (Williamson y Scandalios, 1992; Mittler y Zilinskas, 1994). Incrementos mediados por el

Paraquat en los niveles de ARNm de la APX en hojas de chícharo no fueron reflejados en su correspondiente incremento en las actividades enzimáticas de las APX's (Donahue *et al.*, 1997). Los datos de Mittler y Zilinskas (1994) para la APX en respuesta a la sequía también sugieren la existencia de procesos post-transcripcionales mediados por el estrés.

En resumen, el ascorbato actúa como reductor en la regeneración de α -tocoferol y en el ciclo de la zeaxantina (Foyer, 1993) (Figura 18). Un tercer papel que desempeña el ascorbato es en la superficie del tilacoide dentro del cloroplasto donde actúa como reductor en la búsqueda de H_2O_2 mediada por la APX. El ascorbato es reducido al radical monohidroascorbato como resultado de este proceso asociado al tilacoide (Grace *et al.*, 1995). El ácido ascórbico es regenerado por un proceso dependiente de luz en el tilacoide que puede utilizar ferredoxina como la fuente de reducción. En casos donde la oxidación completa del ácido dehidroascórbico es producida, el glutatión reducido es la fuente reductora para la regeneración del ácido ascórbico. Desde que la APX aparece para llevar a cabo un papel esencial en el proceso de búsqueda, los procesos dentro del cloroplasto asociados con la recepción del oxígeno, la función de la APX y la reducción del oxígeno molecular han sido nombrados "*Fotorespiración Ascorbato-peroxidasa Mehler*" (Mullineaux *et al.*, 2000) (Figura 19).

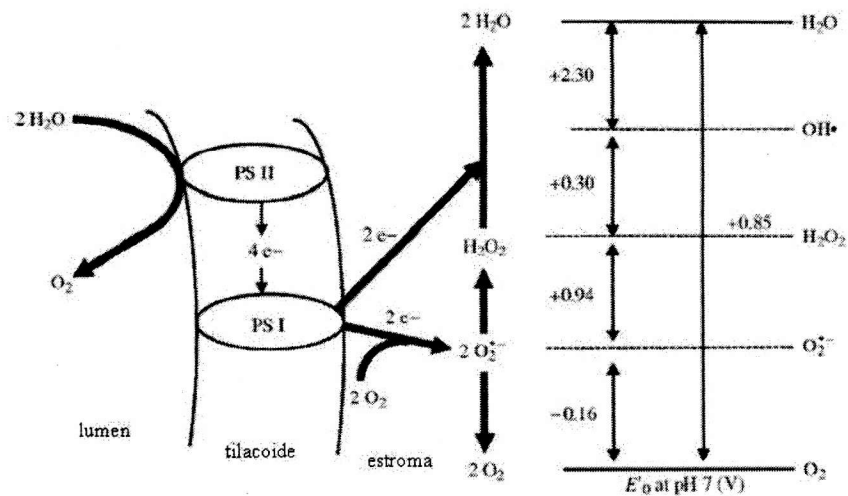


Figura 19. Reacción peroxidasa de Mehler. La reacción catalizada por la APX es la reducción de H_2O_2 en agua usando el ascorbato como electrón donador. El ascorbato oxidado, el radical libre monodehidroascorbato o su producto dehidroascorbato desproporcionado, son reducidos nuevamente a ascorbato usando dos electrones derivados finalmente del fotosistema II (PS II) (Mullineaux *et al.*, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DESARROLLO DEL ESTUDIO.

3.1.1. MATERIAL VEGETAL.

Se adquirieron esquejes de las variedades Red Elf (rojo), Cinnamon Star (bronce) y Da Vinci (bicolor) (Figura 20) en la empresa Viveros Plantec, ubicada en la localidad de Amacuzac, Morelos localizada a 18 ° 35' LN y 99 ° 22' LW y a una altitud de 900 msnm. Se encuentra en la zona de influencia de Puente de Ixtla, donde existe clima tipo Aw''₀(w)(e)g y con temperatura promedio anual de 24.5 °C y precipitación de 1187 mm. La temperatura promedio del mes más frío es de 20.8 °C y la más cálida 28.3 °C (García, 1988).

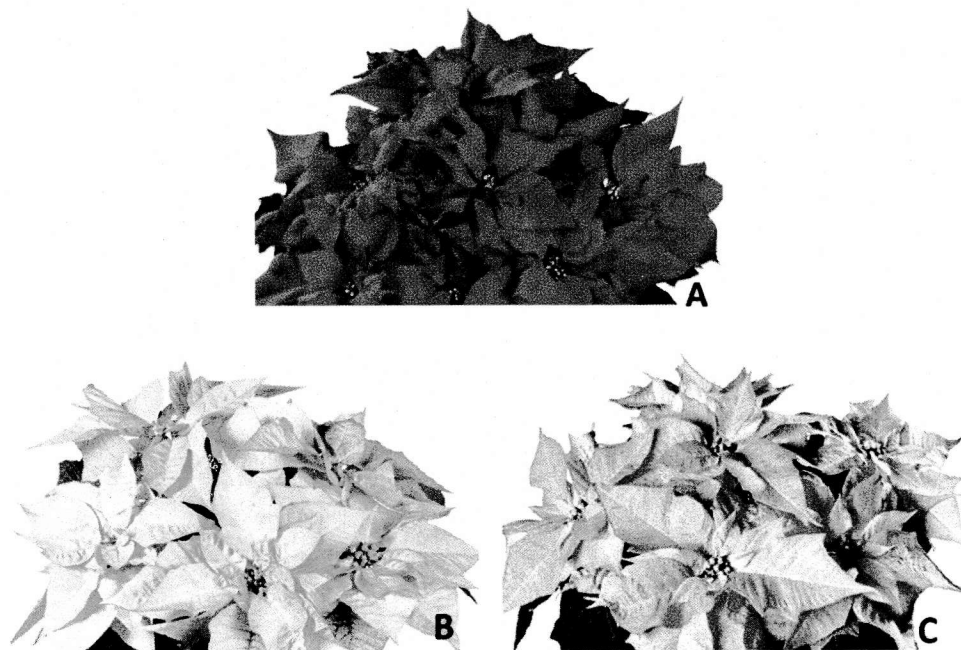


Figura 20. Variedades utilizadas en el presente estudio. A, Red Elf. B, Cinnamon Star. C, Da Vinci.

3.1.2. UBICACIÓN DEL ESTUDIO.

La fase experimental se llevó a cabo de julio a noviembre en los invernaderos de posgrado, el Laboratorio de Fruticultura y el Laboratorio de Usos Múltiples del Departamento Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Localizada a 19 ° 29' 25.0" LN y 98 ° 53' 05.6" LW, con altitud de 2250 msnm, con un clima tipo Cb(w₀)(w)(i')g (García, 1988).

3.1.3. MANEJO AGRONÓMICO.

El transplante se realizó el 24 de julio de 2007, el sustrato estéril utilizado se adquirió en la Empresa PLANTEC, compuesto por 40% de polvo de coco, 40% de tepojal cribado, 20% de composta y 3 kg de osmocote por m³. Se utilizaron macetas de plástico de 6" de color verde. Una vez transplantados los esquejes se aplicó un riego pesado. Entre los 5 y 7 días después del transplante se realizó una poda (pinchado) para romper la dominicana apical y producir brotes, con lo cual se concentraron entre 5 y 7 yemas.

La fertilización durante la etapa de desarrollo (inicio 6 de junio 2007) se aplicó fertilizante soluble marca Peters professional 15-05-25 Poinsettia Peat-Lite Special, a dosis de 2 g·L⁻¹ de agua, dos veces por semana, alternado con 2 g·L⁻¹ de agua de nitrato de calcio (Ca(NO₃)₂). A partir de la inducción floral (19 de septiembre de 2007) se utilizó fertilizante de finalización de nochebuena Peters profesional 15-20-25 Poinsettia Finisher, alternado con fertilización con 2 g·L⁻¹ de agua de nitrato de calcio, hasta el desarrollo de brácteas donde sólo se realizaron riegos con agua.

El tapado de plantas se realizó a partir del 19 de septiembre de 2007 con el fin de iniciar la inducción floral en todos los cultivares. Se colocó un plástico negro para evitar la luz, se taparon desde las 18:00 horas hasta las 9:00 horas por un periodo de siete semanas.

3.2. ESTUDIO DE TOLERANCIA A BAJAS TEMPERATURAS DE VARIEDADES DE NOCHEBUENA.

Se realizaron dos experimentos; el primero con el fin de observar el efecto de las bajas temperaturas antes de realizar el tapado para inducción floral de las variedades y su comportamiento después de dicho estrés.

El segundo se enfocó a observar el efecto de las bajas temperaturas en planta adulta, con pigmentación completa, lista para su venta.

3.2.1. EXPERIMENTO 1.

FACTORES DE ESTUDIO.

Plantas en maceta de las tres variedades antes de inducción floral se almacenaron (18 septiembre de 2007) en 7, 2 y 0 °C (cámaras de frío, 96 % HR), y 20 °C (laboratorio 50 % HR), con tiempos de exposición de 72 horas en las temperaturas de 7, 2 y 0 °C. Los caracteres evaluados se registraron en 3 oportunidades, antes de realizar los tratamientos como punto de referencia, inmediatamente después de la exposición a baja temperatura y finalmente en la fecha comercial.

DISEÑO DE TRATAMIENTOS.

Se utilizó un diseño factorial completo con tres variedades (Red Elf, Cinnamon Star y Da Vinci) por cuatro temperaturas de exposición, que generó 12 tratamientos.

UNIDAD Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

Durante el muestreo inicial, la unidad experimental fue una planta completa con seis repeticiones para cada variedad. Después de los tratamientos a bajas temperaturas y en la fecha comercial se usaron cuatro repeticiones. El diseño experimental empleado fue un completamente al azar.

3.2.2. EXPERIMENTO 2.

FACTORES DE ESTUDIO.

Se utilizaron plantas en maceta pero en este caso ya con presencia de brácteas (12 de noviembre de 2007) fueron almacenadas a 7, 2 y 0 °C (cámaras de frío, 96 % HR), y 20 °C (laboratorio 50 % HR), con tiempo de exposición de 72 horas para las temperaturas de 7, 2 y 0 °C. Los caracteres evaluados se registraron en 2 oportunidades, antes de realizar los tratamientos como punto de referencia e inmediatamente después de la exposición a baja temperatura.

DISEÑO DE TRATAMIENTOS.

Se utilizó un diseño factorial completo con tres variedades (Red Elf, Cinnamon Star y Da Vinci) por cuatro temperaturas de exposición, que generó 12 tratamientos.

UNIDAD Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

Durante el muestreo inicial, la unidad experimental fue una planta completa con seis repeticiones para cada variedad. Después de los tratamientos a bajas temperaturas se usaron cuatro repeticiones. El diseño experimental empleado fue un completamente al azar.

3.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante un análisis de varianza en un diseño para determinar el efecto de los factores (temperatura de almacenamiento y variedad) sobre las variables analizadas. Se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de probabilidad del 5%. Los programas estadísticos que se utilizaron fueron SigmaStat 3.5 (2006) y SAS 9.0 (2002).

Las variables evaluadas en ambos experimentos:

3.3. DAÑO POR FRÍO.

3.3.1. COLOR.

Esta variable se evaluó con un colorímetro espectrofotómetro X-Rite modelo SP-62, se reportaron los valores de los componentes del color: luminosidad (L), cromaticidad (C) y ángulo de matíz o tono (Hue) (Little, 1975). Se tomaron mediciones en tres brácteas por planta en sus respectivas repeticiones por tratamiento.

3.3.2. CHALCONA ISOMERASA (CHI).

Para el análisis de todas las enzimas se realizó polvo de acetona como se describe a continuación: se tomaron 20 g de tejido vegetal de todas las hojas de la planta y se le adicionó 100 mL de acetona fría (-15 °C) grado reactivo para posteriormente ser homogenizado en un licuadora por 1 minuto, el macerado fue filtrado al vacío, este procedimiento se realizó cinco ocasiones más para finalmente dejar secar a temperatura ambiente (18-22 °C) y ser almacenado bajo refrigeración a -40 °C. Se tomó el peso del polvo obtenido para determinar la relación peso fresco/peso polvo de acetona. La enzima CHI se determinó a partir de 0.05 g de polvo de acetona mezclado en un homogenizador de tejidos con 2 mL de Buffer Fosfato de Potasio 0.1 M (pH 7.5) frío y 1.4 mM de 2-Mercaptoetanol (11 µL·100 mL de Buffer). Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 25 000 x g por 20 minutos a 4 °C, utilizando el sobrenadante para el ensayo enzimático.

Para llevar a cabo el ensayo se tomaron primeramente 500 µL de Buffer Fosfato de Potasio 0.1 M (pH 7.5) conteniendo 10 mM de KCN (16.25 mg·25 mL de Buffer) y 10 mM de Etilenglicol Monometil Eter (20 µL·25 mL de Buffer); posteriormente se agregaron 10 µL del sobrenadante y finalmente 200 µL de 18 µM de 4,2',4'-trihidroxi chalcona como sustrato (Nombre comercial: Isoliquiritigenin. Indofine Quemicals, New Jersey) (0.1 mg·25 mL de Buffer, primeramente se disuelve en 10 ó 20 µL de etanol absoluto y después se agrega el Buffer). La reacción se comenzó a medir con la adición del sustrato, donde hubo una disminución en el cambio de absorbancia a 390 nm a los 20

segundos. La actividad fue determinada dividiendo el cambio de la absorbancia (ΔAbs_{390}) a 370 nm entre su coeficiente de extinción ($\epsilon_{390} = 29\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Bednar y Hadcock, 1988). Una Unidad de actividad enzimática ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ de Peso Fresco) es definida como la ciclización intramolecular de $1\text{ }\mu\text{M}$ de 4,2',4'-trihidroxi chalcona en 7,4'-dihidroxi flavanona en un minuto bajo condiciones de ensayo ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$). Todo lo anterior siguiendo la metodología propuesta por Dong *et al.* (1998).

3.3.3. RESPIRACIÓN Y PRODUCCIÓN DE ETILENO.

Las producción de etileno y dióxido de carbono se evaluó (*in vitro*) con 3 hojas separada de la planta después de los tratamientos con baja temperatura en un recipiente de plástico de un volumen de 400 mL, al cual se le adaptó en un costado un tubo de vidrio y una manguera de plástico. El recipiente se cerró herméticamente una vez ya colocadas las hojas de su respectivo tratamiento durante 1 h a temperatura de laboratorio ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$), posteriormente se tomó una muestra de gas de 5 mL con una aguja hipodérmica y se almacenó en un vacutainer (al vacío) con la misma capacidad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su evaluación. De igual forma se siguió tomando una muestra de 5 mL a las 3 y 5 horas. La unidad experimental consistió de 3 hojas separadas con tres repeticiones por tratamiento. La identificación y cuantificación de etileno y CO_2 se realizó en un cromatógrafo de gases Varian Modelo Star 3400 con columna de sílica fundida y fase estacionaria paraplott Q, detectores de ionización de flama y de conductividad térmica. Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron 80 , 150 y $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, utilizando helio como gas de arrastre.

3.4. ESTRÉS OXIDATIVO.

3.4.1. ASCORBATO PEROXIDASA (APX).

La enzima APX se extrajo con el método descrito por Kuk *et al.* (2003), que consistió en que 0.05 g de polvo de acetona se mezcló con 5 mL de Buffer Fosfato de Potasio 100 mM (0.1 M) (pH 7.5) frío conteniendo 2 mM de EDTA (29.22 mg·50 mL de Buffer), 5 mM de ascorbato de sodio (49.52 mg·50 mL de Buffer), 1% (p/v) de Polivinil pirrolidona (0.5 g·50 mL de Buffer) y 1 mM de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoride) (8.70 mg·50 mL de Buffer) y se mezcló en un homogenizador de tejidos durante 50 segundos. Posteriormente se centrifugó a 15 000 x g por 20 min. a 4 °C. El sobrenadante fue utilizado para el ensayo enzimático.

Una vez realizado esto se procedió al ensayo siguiendo la metodología utilizada por Mandelman *et al.*, (1998) con algunas modificaciones; primeramente se calibró el espectrofotómetro con el buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0) (temp. ambiente). La mezcla para el ensayo consistió en una mezcla de reacción de 1.9 mL de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0), 10 µL de sobrenadante, 10 µL de ascorbato de sodio 1 mM (9.9 mg·50 mL de Buffer) y 10 µL de H₂O₂ 9 mM (14 µL·50 mL de Buffer). De igual forma para el control o blanco, con la diferencia que no llevaba ascorbato de sodio ó H₂O₂ ó extracto. La oxidación del ascorbato fue monitoreada al agregarse el H₂O₂ con una disminución en la lectura de absorbancia a 290 nm en luz UV. La actividad fue determinada dividiendo el cambio de la absorbancia (ΔAbs_{290}) a 290 nm entre

su coeficiente de extinción ($\epsilon_{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Una Unidad de actividad enzimática ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ de Peso Fresco) es definida como 1 μM de ascorbato oxidado en un minuto bajo condiciones de ensayo (23°C).

3.4.2. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).

La enzima SOD se extrajo con el método descrito por Bonnet *et al.* (2000), consistió en que a partir de 0.05 g de polvo de acetona se mezcló con 5 mL de Buffer Fosfato de Potasio 0.1 M (pH 7.8) en un homogenizador de tejidos durante 50 segundos. Posteriormente se centrifugó a $17\,000 \times g$ por 20 min. a 4°C . El sobrenadante se utilizó para el ensayo enzimático.

Se siguió la metodología utilizada por Beyer y Fridovich (1987), donde se propuso la siguiente mezcla de reacción; 27 mL de Buffer de Fosfato de Potasio 0.05 M (pH 7.8), conteniendo 0.1 mM de EDTA, 1.5 mL de L-metionina ($30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en agua desionizada), 1 mL de Nitro Blue Tetrazolium ($1.41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en agua desionizada) y 0.75 mL de Triton X-100 al 1% (en agua desionizada). A tres mL de esta mezcla de reacción se le adicionó 0.03 mL de Riboflavina ($4.4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ en agua desionizada) y 0.5 mL del sobrenadante, la mezcla se iluminará por 7 minutos con lámparas de luz fluorescente de 20 watts GroLux, después de transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 560 nm. La formación de Nitro Blue Tetrazolium Formazan debida al incremento en la absorbancia fue la velocidad de reacción; la absorbancia en ausencia de SOD y en presencia de varias cantidades de SOD fue utilizada para determinar el

número de Unidades·mL⁻¹ de SOD en la solución (Stauffer, 1989). Una Unidad (U·g⁻¹ de Peso Fresco) de SOD es igual a la cantidad de sobrenadante que fotoinhibe el 50% de la formación de Nitro Blue Tetrazolium Formazan (Giannopolitis y Ries, 1977). Todo esto se realizó bajo condiciones de temperatura ambiente.

3.4.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

Se estimó por el nivel de producción de malondialdehído (MDA) con una ligera modificación del método del ácido thiobarbitúrico (TBA) descrito por Kuk *et al.* (2003). Se tomó 0.1 g de tejido vegetal y se mezcló con 5 mL de solución de TBA al 0.5% en ácido tricloroacético al 20% en un homogenizador de tejidos. Posteriormente se centrifugó a 20 000 x *g* por 15 minutos y el sobrenadante fue calentado en un “baño maría” (90 °C) por 25 minutos, transcurrido el tiempo rápidamente se enfrió bajo hielo. Después se centrifugó nuevamente la muestra a 20 000 x *g* por 15 minutos y el sobrenadante se utilizó para la determinación espectrofotométrica de MDA. La absorbancia a 532 nm fue registrada y corregida por la absorbancia no específica a 600 nm. La concentración de MDA se calculó usando el coeficiente de extinción de 156 mM⁻¹ cm⁻¹ y el siguiente modelo algebraico:

$$\text{MDA } (\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de Peso Fresco}) = [(A_{532} - A_{600})/156] \times 10^3 / 0.1$$

3.5. MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

3.5.1. FRAGMENTACIÓN DE ADN.

Se maceró 0.3 g de tejido vegetal fresco en nitrógeno líquido sin dejar que se descongele, posteriormente se pasó el tejido pulverizado a un microtubo de 1.5

mL conteniendo 600 μ L de amortiguador de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA- Na_2 50 mM, NaCl 500 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3% pH 8.0) y se mezcló cuidadosamente muy bien por inversión, agitando por unos segundos. Después se incubaron los microtubos a 65 °C por 10 minutos con inversión ocasional de los mismos, ya pasado el tiempo de incubación se le adicionó 200 μ L de acetato de potasio 5 M y se agitaron por inversión para dejarlos reposar 30 minutos en hielo o a -4 °C. Posteriormente se centrifugaron a 18 400 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, para después ser transferido el sobrenadante a otro microtubo con mucho cuidado de no pasar residuos, se le agregó 700 μ L de isopropanol frío y se mezcló por inversión para después dejarlos reposar a -20 °C por 30 minutos. Una vez realizado esto se centrifugaron a 18 400 x g por 5 minutos a temperatura ambiente, después se eliminó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 200 μ L de solución para diluir (Tris-HCl 50 mM, EDTA- Na_2 10 mM pH 8.0). Se añadió 2 μ L de ARNasa A (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en Tris-HCl 10 mM, CaCl_2 5 mM, glicerol al 50% pH 7.0; antes de usar se hirvió en baño de agua por 30 minutos) y se incubó a 37 °C por una hora, posteriormente se le adicionó 20 μ L de acetato de sodio 3 M y 200 μ L de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se dejó reposar a -20 °C por dos horas para después ser centrifugado a 15 870 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Por último se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 200 μ L de etanol al 70%, se dejó secar la pastilla y se disolvió en 100 μ L de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 1 mM pH 8.0) para ser almacenada la muestra a -4 °C. La concentración de ADN genómico de las muestras se cuantificó en un espectrofotómetro ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L} = \text{D.O.}_{260} \times 50 \times \text{factor}$

de dilución / 1000) para posteriormente verificar la integridad mediante electroforesis de las mismas (1 μg de muestra más 2 μL de colorante de carga: 30% ficoll, 1% de SDS, 0.1% de azul de bromofenol y 0.1% de xylen cianol) en un gel de agarosa al 1.4% en amortiguador de corrida TAE 1X con un voltaje de 100 V por 10 minutos permitiendo la entrada de las muestras al gel, luego se ajustó el voltaje a 85 V hasta finalizar la electroforesis. Finalmente el gel fue teñido con bromuro de etidio (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en agua desionizada) y así se observaron los fragmentos de ADN (DNA laddering) con un marcador de peso molecular conocido ($\phi\text{X 174 DNA/Hae III}$, Promega). Todo esto se realizó siguiendo la metodología propuesta por Legaria-Solano (2005).

3.5.2. ACTIVIDAD DE LA PROTEASA.

Se extrajo la enzima según Parida *et al.* (2004), donde se tomó 0.05 g de polvo de acetona y se mezcló con 3 mL de buffer Tris·Cl 100 mM (pH 8.0) conteniendo 10 mM de Cloruro de calcio 2-Hidrato (1.47 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Buffer) en un homogenizador de tejidos. Posteriormente se centrifugarán a 20 000 x g a 4 °C durante 20 minutos y el sobrenadante se utilizó para el ensayo enzimático.

A continuación se procedió al ensayo; primeramente se ajustó a cero el espectrofotómetro a 410 nm con la siguiente mezcla: 950 μL de Buffer Tris·Cl 100 mM (pH 8.0) conteniendo 10 mM de cloruro de calcio 2-hidrato más 40 μL de solución con sustrato (*N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida; sustrato sintético. Sigma) 5 mM (3.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Buffer) (esta solución debe mantenerse en hielo para evitar autólisis) y 10 μL adicionales de Buffer. Posteriormente se

retiró la solución de la celda de cuarzo utilizada y se le agregó 950 μL de Buffer y 40 μL de la solución con sustrato 5 mM dejando 5 minutos dentro del espectrofotómetro, finalmente se agregó 10 μL de la enzima (sobrenadante) y se mezcló por inversión. Inmediatamente se registró el incremento en la absorbancia a 410 nm por un minuto. La actividad fue determinada dividiendo el cambio de la absorbancia (ΔAbs_{410}) a 410 nm entre su coeficiente de extinción ($\epsilon_{410} = 8480 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Una Unidad ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ de Peso Fresco) de actividad enzimática es definida como 1 μM de *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida hidrolizada en un minuto bajo condiciones de ensayo (23 °C). Lo anterior se realizó siguiendo la metodología de Kristjansson (2005).

3.6. EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA A FRÍO.

Se seleccionaron plantas despuntadas (día del despunte 22 de agosto de 2008) de la variedad Da Vinci que fueron expuestas a 0 °C (± 1 °C) por 72 horas en una cámara de almacenamiento ya que previamente se habían observado síntomas de deshidratación y daño por frío en dicha variedad. Para llevar a cabo la expresión de los genes de respuesta a frío primeramente se extrajo ARNm de una población de plantas sin tratamiento alguno de frío (sirvió como *driver*), además de la población de plantas expuestas a daño por frío (sirvió como *tester*). Una vez realizado esto se procedió a hacer Hibridación Sustractiva y Supresora (SSH, *Suppression Subtractive Hybridization*; siglas en inglés).

3.6.1. AISLAMIENTO DE ARNm.

Primeramente se sacó del kit de extracción PolyATtract[®] System 1000 (Promega) el Buffer GTC, el oligo(dT), el agua libre de nucleasas y la solución SSC 0.5X para que se adecuen a temperatura ambiente. Posteriormente se precalentó el Buffer de dilución a 70 °C (No calentar por arriba de 70 °C). En un microtubo de 1.5 mL se agregó 16.4 µL de β-Mercaptoetanol y 400 µL de Buffer GTC utilizando puntas libres de nucleasas y guantes.

Se pesó 0.3 g de tejido vegetal y se agregó nitrógeno líquido para pulverizar el tejido en un mortero con pistilo (estériles) para después ser mezclado con la solución del microtubo (β-Mercaptoetanol y Buffer GTC) por inversión. Después se centrifugó a 12 000 x g por 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf (Modelo 5424) para eliminar impurezas.

Durante la centrifugación, en un microtubo estéril se colocó 800 µL de Buffer de dilución y 16.4 µL de β-Mercaptoetanol y una vez que la muestra fue centrifugada, con una punta estéril se le agregó el sobrenadante al homogenizado, después se mezcló por inversión.

Se agregó 1 µL de oligo (dT) y se mezcló por inversión, para después ser incubada esta mezcla a 70 °C por 5 minutos. Ya realizado lo anterior, nuevamente se centrifugó a 12 000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Mientras duraba la centrifugación se resuspendieron las partículas SA-PMPs meciendo con cuidado la botella. En un microtubo (estéril) lejos del soporte magnético, se agregó 600 µL de las partículas SA-PMPs, posteriormente se colocó el microtubo en el soporte magnético moviendo el soporte hasta la posición horizontal hasta que las partículas fueron colectadas al lado del tubo.

Se decantó el Buffer de almacenamiento inclinando el tubo mientras que la fuerza magnética no dejó que se desplazaran las partículas capturadas.

Se resuspendieron las partículas SA-PMPs en 600 μ L de solución SSC 0.5X, se capturaron las partículas usando el soporte magnético y se tiró la solución inclinando el tubo. Se repitió este paso de lavado dos veces más para finalmente resuspender a el volumen original (600 μ L) con solución SSC 0.5X.

Una vez terminada la centrifugación, se removió con mucho cuidado el sobrenadante con una punta estéril, evitando tocar y/o remover el pellet. Se agregó el sobrenadante al microtubo que tiene las partículas SA-PMPs en la solución SSC 0.5X lejos del soporte magnético y se mezcló por inversión.

Posteriormente se incubó todo lo anterior a temperatura ambiente por dos minutos. Después se capturaron las partículas SA-PMPs con el soporte, moviéndolo hasta la posición horizontal hasta que el homogenizado se clarificó y después con mucho cuidado se decantó el sobrenadante como se realizó anteriormente.

Se resuspendieron las partículas SA-PMPs en 1 mL de SSC 0.5X lejos del soporte magnético después se mezcló chasqueando suavemente el microtubo. Se transfirió la mezcla a un microtubo estéril de 2 mL provisto por el kit en donde se capturaron las partículas SA-PMPs colocando el tubo en el soporte magnético. Se removió cuidadosamente la solución SSC 0.5X con una punta estéril y se descartó. Este paso de lavado fue repetido dos veces más. Después del lavado final, se removió tanto como sea posible la solución SSC 0.5X sin mover las partículas SA-PMPs.

Se agregó 400 μL de agua libre de nucleasas y se resuspendió suavemente chasqueando el tubo.

Se capturaron las partículas SA-PMPs moviendo el soporte hacia la posición horizontal y se transfirió el líquido a un tubo estéril y libre de nucleasas.

Se agregó 0.1 volumen (50 μL) de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 1.0 volumen (500 μL) de isopropanol al eluido y se incubó a -20°C toda la noche.

Se centrifugó a más de 12 000 $\times g$ por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Después se resuspendió el precipitado de ARNm en 200 μL de etanol al 70% sin agitar y se centrifugó nuevamente. Se decantó con mucho cuidado el sobrenadante evitando perder el pellet de ARNm.

Se dejó secar el pellet de ARNm por 15 minutos y se resuspendió en 50 μL de agua desionizada libre de nucleasas.

La concentración y pureza del ARNm eluido se determinó por espectrofotometría. Se tomaron las lecturas a 230, 260 y 280 nm a 5 μL de muestra con ARNm más 595 μL de agua libre de nucleasas (dilución 1/120). Las celdas utilizadas fueron lavadas con NaOH 0.1N después con EDTA 1 mM y finalmente con agua libre de nucleasas.

El ARNm puro tiene una relación de absorbancia A_{260}/A_{280} de 2. Para estimar la concentración de ARNm se asumió que una solución de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tiene una absorbancia de 1 a 260 nm. Si la lectura de absorbancia da 0.1, se estimará la concentración con el siguiente modelo:

$$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = 40 \times 0.1 (\text{Absorbancia a 260 nm}) \times 120 (\text{Factor de dilución}) = 480.$$

$$\mu\text{g totales} = 480 \times 0.045 (\text{mL de ARNm}) = 21 \mu\text{g totales}.$$

Además, se determinó la relación A_{260}/A_{230} , la cual provee información de la pureza de la muestra. Una relación A_{260}/A_{230} menor de 2 indica que el GTC ó el β -Mercaptoetanol del Buffer de extracción están aún presente.

Dado que se encontró una baja relación A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , se realizaron los siguientes pasos de purificación: a) se llevó a 500 μ L con agua libre de nucleasas la solución que contiene el ARNm, b) se agregó 500 μ L de fenol: cloroformo: isoamil (25:24:1) y se agitó por inversión, c) se centrifugó a 13 000 x g por 5 minutos, d) se tomó el sobrenadante y se puso en un microtubo nuevo tomando la precaución de no traerse nada de fenol, e) se agregó 400 μ L de cloroformo (100%) para eliminar el fenol, f) se centrifugó nuevamente a 13 000 x g por 5 minutos, g) se tomó el sobrenadante y se colocó un microtubo nuevo tomando la precaución de no traerse nada de cloroformo, h) se precipitó el ARNm agregando 40 μ L de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 400 μ L de isopropanol y se dejó reposar a -20 °C por toda la noche, i) nuevamente se tomaron las lecturas de concentración y relaciones para determinar la calidad del ARNm obtenido. Lo anterior siguiendo la metodología indicada en el kit (PolyATtract® System 1000, 2006) y por Neill (1993).

3.6.2. HIBRIDACIÓN SUSTRATIVA Y SUPRESORA (SSH).

Síntesis de la primera cadena de ADNc.

Para el ARNm del cultivar Da Vinci con exposición a daño por frío (*Tester*), sin exposición a daño por frío (condiciones normales; *Driver*) y control (de músculo humano), se combinaron los siguientes componentes en un microtubo de 0.5 mL.

Por cada ARNm

ARNm (2 µg)	2-4 µL
Primer de Síntesis de ADNc (10 µM)	1 µL

Para la síntesis del control, se agregó 2 µL de ARN poly A⁺ de músculo.

Se agregó agua estéril, de ser necesario, hasta llevar a un volumen final de 5 µL.

Se mezcló el contenido y se hizo girar brevemente en una microcentrífuga.

Posteriormente se incubó a 70 °C por 2 minutos, ya pasado el tiempo de incubación se enfrió en hielo por dos minutos y se centrifugó brevemente.

Después se agregó lo siguiente a cada reacción:

Por cada tubo

5X Buffer Primera Cadena	2 µL
Mezcla de dNTP(10 mM de cada uno)	1 µL
Agua estéril	1 µL
AMV Transcriptasa Inversa (20 unidades/µL)	1 µL

Se agitó en un vortex y después se centrifugó brevemente.

Posteriormente los tubos fueron incubados a 42 °C por 1.5 horas, después fueron colocados en hielo para terminar la síntesis de la primera cadena e inmediatamente se dio paso con la síntesis de la segunda cadena de ADNc.

Síntesis de la segunda cadena de ADNc.

Se agregaron los siguientes componentes a los tubos de reacción de la primera cadena (conteniendo 10 µL):

	Por cada tubo
Agua estéril	48.5 μ L
5X Buffer Segunda cadena	16.0 μ L
Mezcla de dNTP (10 mM cada uno)	1.5 μ L
20X Coctel Enzimático Segunda Cadena	4.0 μ L

Se mezcló el contenido y se agitó brevemente en la microcentrífuga. El volumen final debe ser de 80 μ L.

Se incubaron los tubos a 16 °C por 2 horas, posteriormente se agregó 2 μ L de T4 ADN Polymerasa (6 U) y se mezcló por agitación el contenido para ser incubados nuevamente a 16 °C por 30 minutos. Se agregó 4 μ L de 20X EDTA/Glycogen y se mezcló para dar por terminado la síntesis de la segunda cadena.

Se agregó 100 μ L de fenol:cloroformo:isoamil (25:24:1 v/v), después se agitó en vortex y se centrifugó a 18 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se colectó cuidadosamente la capa acuosa superior y se colocó en un tubo nuevo de 0.5 mL. Se descartó las fases intermedia e inferior y se dispuso de ellas apropiadamente.

Se agregó 100 μ L de cloroformo:isoamil (24:1 v/v), nuevamente se agitó en vortex y se centrifugó a 18 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se colectó cuidadosamente la capa acuosa superior y se colocó en un tubo nuevo de 0.5 mL. Se descartó las fases intermedia e inferior y se dispuso de ellas apropiadamente.

Se agregó 40 μ L de NH₄OAc 4 M y 300 μ L de etanol al 95%, después se agitó en vortex y se centrifugó a 18 400 x g por 20 minutos a temperatura ambiente.

Ya realizado esto, se colectó cuidadosamente el sobrenadante y se descartó. Posteriormente se cubrió el pellet con 500 μL de etanol al 80% y se centrifugó a 18 400 x g por 10 minutos.

Nuevamente se removió el sobrenadante y se descartó, se dejó secar el pellet por cerca de 10 minutos para evaporar los residuos de etanol. Finalmente se disolvió el precipitado en 50 μL de agua estéril.

Se transfirió 6 μL a un tubo nuevo de microcentrifuga de 0.5 mL y se almacenó a -20 °C hasta después de estimar la digestión con Rsa I para estimar la producción y rango de tamaño de los productos de ADNc de cadena doble sintetizados.

Digestión con Rsa I.

Se realizó el siguiente procedimiento con cada ADNc doble cadena *tester* y *driver*, así como con el ADNc control de músculo. Este paso genera fragmentos de ADNc de doble cadena cortos, con extremos romos los cuales son óptimos para la sustracción y requeridos para la ligación de adaptador.

Se agregaron los siguientes reactivos:

	Por cada tubo
ADNc doble cadena	43.5 μL
10X Buffer de Restricción Rsa I	5.0 μL
Rsa I (10 unidades/ μL)	1.5 μL

Se mezcló el contenido en un vortex y se centrifugó brevemente. Posteriormente se incubó a 37 °C por 1.5 horas.

Se tomó 5 µL de la mezcla de digestión para ser analizada la eficiencia de digestión con Rsa I. Al resto de la mezcla de digestión se le agregó 2.5 µL de 20X EDTA/Glycogen para finalizar la reacción.

Después se agregó 50 µL de fenol:cloroformo:isoamil (25:24:1 v/v) y se agitó en vortex y se centrifugó a 18 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente para separar las fases. Se colectó cuidadosamente la capa acuosa superior y se colocó un un tubo nuevo de 0.5 mL. Se descartó las fases intermedia e inferior y se dispuso de ellas apropiadamente.

Se agregó 50 µL de cloroformo:isoamil (24:1 v/v), nuevamente se agitó en vortex y se centrifugó a 18 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se colectó cuidadosamente la capa acuosa superior y se colocó un un tubo nuevo de 0.5 mL. Se descartó las fases intermedia e inferior y se dispuso de ellas apropiadamente.

Se agregó 40 µL de NH₄OAc 4 M y 187.5 µL de etanol al 95%, después se agitó en vortex y se centrifugó a 18 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Ya realizado esto, se colectó cuidadosamente el sobrenadante y se descartó. Posteriormente se cubrió el pellet con 200 µL de etanol al 80% y se centrifugó a 18 400 x g por 5 minutos.

Nuevamente se removió el sobrenadante y se descartó, se dejó secar el pellet por cerca de 5 a 10 minutos para evaporar los residuos de etanol. Finalmente se disolvió el precipitado en 5.5 µL de agua estéril y se almacenó a -20 °C.

Esos 5.5 μ L de muestras digeridas de ADNc con Rsa I sirvió como mi ADNc *driver* experimental y ADNc *driver* control de músculo.

Se revisó el ADNc digerido mediante electroforesis en gel de agarosa y teñido con bromuro de etidio para proceder con la ligación de adaptadores para finalmente preparar el ADNc *tester* experimental y ADNc *tester* control de músculo.

Ligación de adaptadores.

Se diluyó 1 μ L de ADNc *tester* digerido con Rsa I (con daño por frío, tester experimental) con 5 μ L de agua estéril, también el ADN control de ϕ X174/Hae III con agua estéril a una concentración final de 150 ng/mL. Se mezcló 1 μ L de ADNc de músculo con 5 μ L de ADN control ϕ X174/Hae III diluido. Este será el control tester de ADNc de músculo.

Se preparó la Mezcla Maestra (Master Mix) combinando los siguientes reactivos en un tubo de 0.5 mL, preparando suficiente para todas las reacciones de ligación más una adicional.

	Por corrida
Agua estéril	3 μ L
5X Buffer de Ligación	2 μ L
T4 ADN Ligasa	1 μ L

Para el ADNc tester experimental y para el control tester de ADNc de músculo, se combinaron los siguientes reactivos.

<u>Componente</u>	Tubo número	
	1	2
	Tester 1-1	Tester 1-2
ADNc tester diluído	2 µL	2 µL
Adaptador 1	2 µL	-----
Adaptador 2R	-----	2 µL
Mezcla Maestra de Ligación	6 µL	6 µL
Volumen Final	10 µL	10 µL

*Se usó lo mismo para el control tester de ADNc de músculo.

En un tubo nuevo de 0.5 mL se mezcló 2 µL de Tester 1-1 y 2 µL de Tester 1-2, después de la ligación esta solución funcionará como el control tester 1-c sin sustraer. Se hizo lo mismo para el control tester de ADNc de músculo.

Una vez realizado esto, se centrifugó brevemente y se incubó a 16 °C toda la noche. Al finalizar, se agregó 1 µL de la mezcla 20X EDTA/Glycogen para detener la reacción. Posteriormente se calentaron las muestras a 72 °C por 5 minutos para inactivar la ligasa. Finalmente, los tubos se centrifugaron brevemente.

Los ADNc's con ligación de adaptadores tester experimental, control tester de músculo y tester sin sustracción están listos.

Se removió 1 μ L de cada control tester sin sustracción (1-c y 3-c) y diluyó en 1 mL de agua estéril. Estas muestras sirvieron para la PCR. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

Antes de proceder con la hibridación se realizó el análisis de eficiencia de ligación.

Primera Hibridación.

En el siguiente procedimiento, un exceso de ADNc digerido con Rsa I del *driver* se agregó al ADNc *tester*, las muestras se desnaturalizaron con calor, para permitir el alineamiento. Los ADNc's ss que quedan (disponibles para la segunda hibridización) son enriquecidos dramáticamente por las secuencias expresadas diferencialmente porque los ADNc's que no son blanco presentes en el ADNc del *tester* y del *driver* forman híbridos.

Antes de comenzar con la hibridación, se dejó que el Buffer 4X de Hibridación se calentara a temperatura ambiente por al menos 15-20 minutos. Verificando que no haya un "pellet" visible o precipitado antes de usar el buffer (De ser necesario, calentar el buffer a 37 °C por ~10 minutos para disolver cualquier precipitado).

Para realizar la sustracción experimental y de músculo, se combinó en tubos de 0.5-mL los siguientes reactivos en el orden que se muestra.

Establecimiento de la primera hibridación

(Se repitió para el ADNc *tester* experimental & el ADNc control de músculo)

<u>Componente</u>	Muestra de Hibridación	
	1	2
	Tester 1-1	Tester 1-2
ADNc Driver digerido con Rsa I	1.5 µl	1.5 µl
Tester 1-1 ligado a Adaptador 1	1.5 µl	—
Tester 1-2 ligado a Adaptador 2R	—	1.5 µl
4X Buffer de Hibridación	1.0 µl	1.0 µl
Volumen Final	4.0 µl	4.0 µl

Se cubrieron las muestras con una gota de aceite mineral y se centrifugó brevemente. Posteriormente se incubaron a 98 °C por 1.5 minutos en un termociclador. Para finalmente ser incubadas a 68 °C por 8 horas*.

* Las muestras pueden hibridar por 6-12 horas. Y no dejar que excedan las 12 horas de incubación.

Segunda Hibridación.

Las dos muestras de la primera hibridación se mezclaron juntas y ADNc *driver* nuevo desnaturalizado se agregó para enriquecer aun más las secuencias expresadas diferencialmente. Nuevas moléculas híbridas se formaron, las cuales consistieron de ADNc's expresados diferencialmente con diferentes adaptadores en cada extremo.

Importante: No desnaturalizar las muestras de la primera hibridación en esta etapa. Además, no remover las muestras hibridadas del termociclador por más que sea necesario agregar *driver* nuevo.

Repetir los siguientes pasos para cada ADNc *tester* experimental y para el ADNc control de músculo.

Se agregaron los siguientes reactivos en un tubo estéril:

	Por corrida
ADNc Driver digerido con Rsa I	1 µl
4X Buffer de Hibridación	1 µl
Agua estéril	2 µl

Se colocó 1 µl de esta mezcla en un tubo de microcentrífuga de 0.5-mL y se cubrió con 1 gota de aceite mineral. Después se incubó a 98 °C por 1.5 minutos en un termociclador. Posteriormente se removió el tubo que contiene el *driver* nuevo desnaturalizado del termociclador.

Se usó el siguiente procedimiento para mezclar simultáneamente el *driver* con las muestras hibridadas 1 y 2 (preparadas en la primera hibridación). Esto aseguró que las dos muestras se mezclen juntas solamente en la presencia de *driver* desnaturalizado nuevo:

- Se graduó una micropipeta a 15 µL.
- Se tocó suavemente con la punta de la pipeta la interfase aceite mineral de la muestra del tubo conteniendo la muestra hibridada 2.

- c. Después cuidadosamente se aspiró parcialmente la muestra completa en la punta. No se preocupe si una pequeña cantidad de aceite mineral se transfirió con la muestra.
 - d. Se removió la punta del tubo y se aspiró una pequeña cantidad de aire en la punta, creando un pequeño espacio de aire.
 - e. Se repitieron los pasos b-d con el tubo que contiene el driver fresco desnaturalizado. Ahora la punta de la pipeta contiene ambas muestras (muestra 2 hibridada y *driver* desnaturalizado) separadas por una bolsa de aire pequeña.
 - f. Se transfirió la mezcla completa de la punta de micropipeta al tubo que contiene la muestra hibridada 1.
 - g. Posteriormente se mezcló con pipeta de arriba hacia abajo, para después ser centrifugada brevemente e incubada la reacción a 68°C toda la noche.
- Ya realizado esto, se agregó 200 µL de Buffer de Dilución y se mezcló con pipeta, después se calentó la reacción a 68 °C por 7 minutos en un termociclador. Y finalmente se almacenó a -20 °C.

Amplificación por PCR.

Los ADNc's expresados diferencialmente fueron amplificados selectivamente durante las dos reacciones que se describirán en esta sección. Antes de la termociclación, las cadenas faltantes de los adaptares se extendieron en una incubación breve a 75 °C; esto creó el sitio de unión para el *Primer 1* de PCR. En la primera amplificación, solamente ADNc's doble cadena con diferentes secuencias de adaptador en cada extremo son amplificados exponencialmente.

En la segunda amplificación, la PCR anidada es usada para reducir aun más los sedimentos y enriquecer las secuencias expresadas diferencialmente.

Primera PCR.

Se preparó la PCR tomando 1 μ L de cada ADNc (tester sin sustracción y tester con sustracción) en un tubo para PCR. Después se preparó una Mezcla Maestra para los tubos de la primera PCR con los siguientes reactivos en el orden que se muestran:

	Por corrida
Agua estéril	19.5 μ l
10X Buffer de Reacción de PCR	2.5 μ l
Mezcla de dNTP	0.5 μ l
Primer 1 de PCR	1.0 μ L
50X Mezcla Advance ADNc Polimerasa	0.5 μ L

Por cada ADNc experimental adicional, se preparó una reacción adicional.

Se mezcló bien con vortex, y brevemente se centrifugó el tubo. Se tomó 24 μ L de Mezcla Maestra y se colocó en cada tubo de reacción preparado anteriormente (con ADNc tester sin sustracción y con sustracción).

Se incubó la mezcla de reacción a 75 °C por 5 minutos en un termociclador para extender los adaptadores (No remover las muestras del termociclador).

Nota: Este paso “rellenó” la cadena faltante de los adaptadores, creando así sitios de unión para los *Primers* de la PCR.

Inmediatamente se inició con la termociclación con los siguientes parámetros:

27 ciclos:

94 °C	30 segundos
66 °C	30 segundos
72 °C	90 segundos

Se tomó 8 µL de cada reacción para su análisis en un gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio en Buffer TAE 1X.

Segunda PCR.

Se diluyó 3 µL de cada producto de reacción de la primera PCR (ADNc tester sin sustracción y con sustracción) en 27 µL, después se toma una alícuota de 1 µL y se colocó en un tubo para PCR.

Se preparó una Mezcla Maestra de reacción para la segunda PCR más una reacción adicional combinando los reactivos en el siguiente orden:

	Por corrida
Agua estéril	18.5 µl
10X Buffer de Reacción de PCR	2.5 µl
Primer 1 anidado de PCR	1.0 µl
Primer 2R anidado de PCR	1.0 µL
Mezcla de dNTP	0.5 µL
50X Mezcla Advance ADNc Polimerasa	0.5 µL

Se mezcló en vortex y se centrifugó brevemente.

Se tomó una alícuota de 24 μ L de Mezcla Maestra en cada tubo de PCR que contenía el producto de la primera PCR. Inmediatamente se inició con la termociclación con los siguientes parámetros:

12 ciclos:

94 °C 30 segundos

68 °C 30 segundos

72 °C 90 segundos

Se tomó 8 μ L de cada reacción para su análisis en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio en Buffer TAE 1X y finalmente se almacenaron los productos de reacción a -20 °C.

3.6.3. TRANSFORMACIÓN Y CLONACIÓN.

A partir de los productos obtenidos de la SSH se procedió a su clonación, para esto se usó el vector pGEM[®]-Easy Vector (Promega). El protocolo para la reacción de ligación se describe a continuación.

Se centrifugó brevemente el vector y el ADN control de inserto para coleccionar el contenido en el fondo del tubo. Posteriormente se preparó la mezcla de ligación como se indica a continuación:

	Reacción	Control	Control
	Estandar	Positivo	Negativo
2X Buffer de Ligación Rápida	5 µL	5 µL	5 µL
pGEM®-T Easy Vector	1 µL	1 µL	1 µL
Producto de PCR	2 µL	-----	-----
ADN control de inserto	-----	2 µL	-----
T4 ADN Ligasa	1 µL	1 µL	1 µL
Agua desionizada a un volumen final de	10 µL	10 µL	10 µL

Nota: Se agitó con vortex el Buffer de Ligación antes de cada uso y se mantuvo todo tiempo en hielo.

Se mezclaron las reacciones con micropipeta y después se incubó toda la noche a 4 °C.

Se centrifugaron los tubos que tienen las reacciones de ligación para precipitar el contenido del tubo, se agregó 2 µL de cada reacción de ligación a un microtubo de 0.5 mL frío.

Se tomaron 500 µL de la bacteria *E. coli* JM107 y se colocó en 50 mL de medio LB líquido y se dejó incubar de 3 a 4 horas a 37 °C hasta obtener una lectura de densidad óptica de 0.4-0.5 a 590 nm. Después se colocó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 4600 x g por 5 minutos, eliminando el sobrenadante.

Se resuspendió la bacteria en 20 mL de CaCl₂ 0.1M y se incubó en hielo por 1 hora y después se centrifugó a 4600 x g por 5 minutos, eliminado el sobrenadante. La bacteria se resuspendió en 5 mL de CaCl₂ 0.1M.

Se transfirió 50 μL de la célula competente en cada tubo de reacción de ligación, después se chasqueo el tubo cuidadosamente y se colocó en hielo por 20 minutos.

Posteriormente se le dio shock térmico a los tubos por 45 a 50 segundos en baño con agua exactamente a 42 °C (sin agitar). Inmediatamente se regresaron los tubos a hielo por 2 minutos.

Se agregó 950 μL de medio SOC a los tubos que tenían la célula transformada con reacción de ligación; lo anterior se realizó a temperatura ambiente. Después se incubó por 1.5 horas a 37 °C en shaker a 150 rpm.

Se colocó 200 μL de cada reacción en cajas petri con medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal y se dejó incubar por 16 a 24 horas a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se colocaron las cajas a 4 °C para facilitar el desarrollo del color azul. Las colonias blancas son las que contienen el inserto, siendo más grandes que las de color azul.

3.6.4. MINIPREPARACIÓN DE ADN DE PLÁSMIDO.

En 5 mL de medio LB líquido con 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina se colocó la colonia blanca con ayuda de un palillo de madera estéril y se dejó incubar a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se tomarón 1.5 mL y se colocaron en tubos eppendorf, teniendo 2 repeticiones por cada colonia obtenida.

Los tubos fueron colocados en hielo por 5 minutos y después fueron centrifugados a 3 380 x g por 3 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Se resuspendieron en 50 μL de una solución de Tris-HCl 50 mM pH. 8.0 y sacarosa al 25% y se agitaron en un vortex.

Posteriormente se incubaron a 4 °C por 5 minutos y se les agregó 200 µL de solución salina de NaOH y SDS. Se agitó por inversión y se dejaron incubar en hielo por 5 minutos.

Después se agregaron 150 µL de acetato de potasio 5M y se agitaron por inversión para nuevamente ser incubados en hielo por 5 minutos. Se centrifugaron a 15 870 x g por 5 minutos y se recogió el sobrenadante en un tubo estéril nuevo.

Se extrajo una vez con 300 µL de fenol:cloroformo:isoamil (25:24:1 v/v) y se agitaron por inversión para después centrifugarlos a 15 870 x g por 10 minutos, recuperando la fase acuosa (parte superior).

Se colocó la fase acuosa en un tubo estéril nuevo y se agregaron 300 µL de Acetato de sodio 3M y 400 µL de isopropanol frío y se agitó por inversión.

Se incubaron por una hora a -20 °C y después se centrifugaron a 15 870 x g por 15 minutos, eliminado el sobrenadante.

Se lavó 2 veces el pellet con etanol al 70% y se dejó secar por 15 minutos, finalmente se resuspendió en 50 µL de amortiguador TE. Todo lo anterior siguiendo la metodología de Sambrook y Russell (2001).

3.6.5. DIGESTIÓN CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN.

Se procedió a digerir el ADN de plásmido de los insertos obtenidos con *EcoR* I como a continuación se describe. Se colocaron 10 µL de ADN de plásmido purificado en un tubo nuevo estéril, después se agregó 2 µL de amortiguador de enzima de restricción y 1 µL de la enzima *EcoR* I, finalmente se agregó 7 µL de agua destilada estéril para dejar incubar la mezcla a 37 °C por una hora. Se

tomaron 10 μ L de cada digestión y se corrió un gel de agarosa al 0.8% con amortiguador TAE al 0.5% para observar los fragmentos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXPERIMENTO 1.

4.1.1. DAÑO POR FRÍO.

4.1.1.1. COLOR.

4.1.1.1.1. LUMINOSIDAD.

La luminosidad fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) después del tratamiento y en la fecha comercial ($P \leq 0.05$), de igual manera que para el factor variedad (V) en la fecha comercial; además la interacción T x V fue significativa en dicha fecha de muestreo (Cuadro 9). De manera general, la tendencia en las temperaturas de exposición a ambiente y 7 °C después del tratamiento aumentó ligeramente, mientras que para 2 y 0 °C el valor de la luminosidad disminuyó ligeramente. Para el día de muestreo final (fecha comercial) en todas las temperaturas de exposición se obtuvieron valores de luminosidad mayores que en las fechas de muestreo anteriores (Figura 21).

Las variedades en la fecha final de muestreo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) siendo Cinnamon Star el que tuvo el valor más alto en cuanto a luminosidad que el resto de las variedades. Una vez después de ser expuestos a su respectivo tratamiento, Red Elf y Cinnamon Star tuvieron un ligero aumento en la cromaticidad, mientras que en Da Vinci disminuyó este valor.

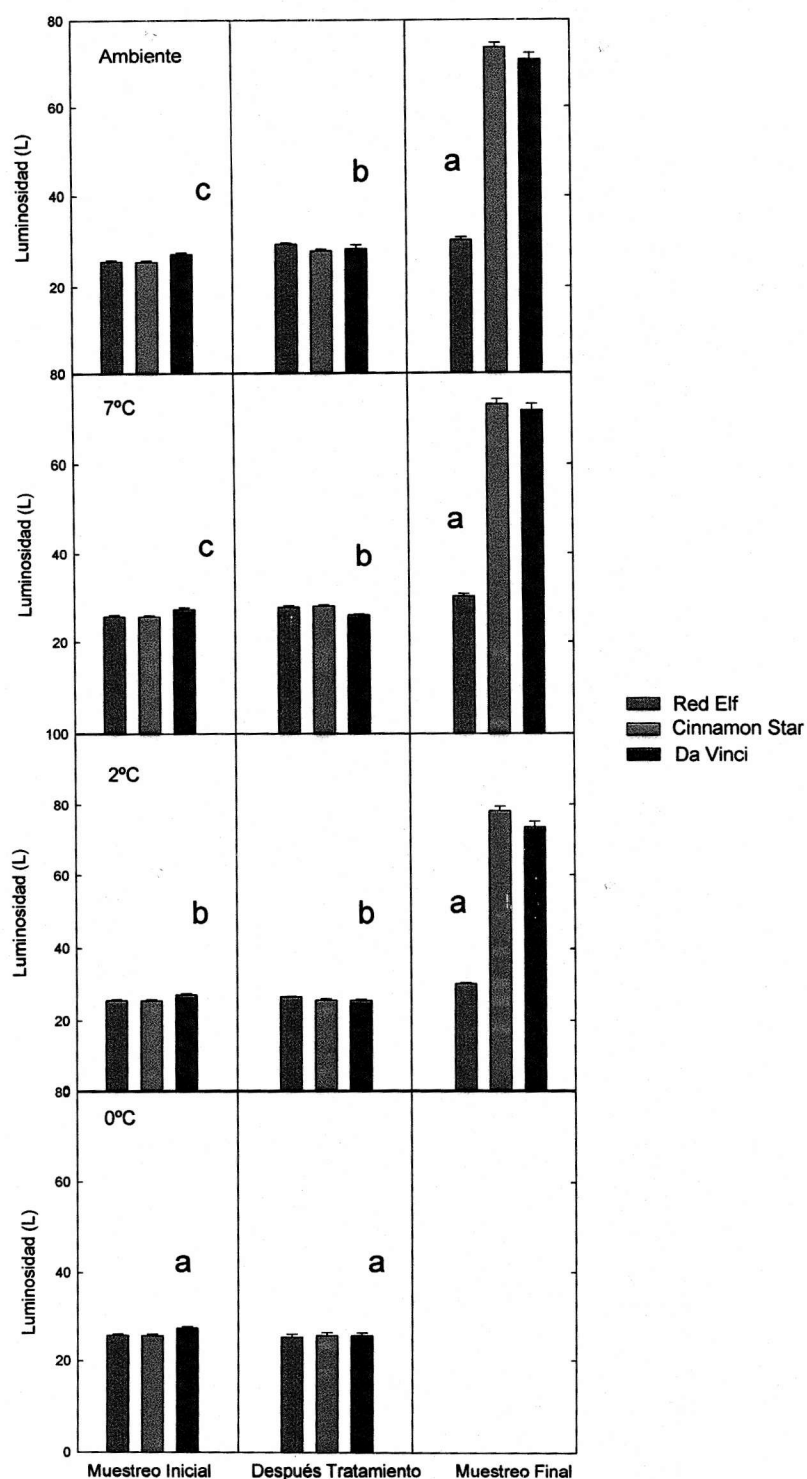


Figura 21. Comportamiento de la luminosidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud estadística

(Tukey; 0.05). DMSH 1.20, 1.05, 0.09 y 0.70 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 9. Comportamiento de la luminosidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Nochebuena expuestas a diferentes temperaturas:			
Factor	Luminosidad (L)		
Nivel	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	26.16 a ^z	28.57 a	58.25 b
7 °C	26.16 a	27.22 b	58.20 b
2 °C	26.16 a	26.07 c	60.68 a
0 °C	26.16 a	25.46 c	---
DMSH	0.81	1.13	2.21
Variedad (V)			
Red Elf	25.57 b	27.27 a	22.73 c
Cinnamon Star	25. 57 b	26.81 a	56.14 a
Da Vinci	27. 27 a	26.40 a	53.98 b
DMSH	0.63	0.89	1.74
T x V	ns	ns	***

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

Estos valores indican una coloración más clara o el inicio de manchas del tejido por efecto de daño por frío (Lyons, 1973; Mckersie y Leshem, 1994). Al final del estudio el Red Elf disminuyó su valor de luminosidad debido al cambio de pigmentación que sufrió (de verde intenso a rojo intenso), mientras que el resto de los cultivares tuvieron valores más altos dado que son cultivares de color bronce y bicolor (Fisher, 2007b). La interacción T x V se presentó en el muestreo final, esto indica que la luminosidad fue afectada por la temperatura del invernadero y/o por el manejo del cultivo al que fueron sometidas las variedades. Gallego *et al.* (2003) en un trabajo realizado con *Eugenia stipitata* L.

almacenada a 7 °C durante 20 días reportaron un incremento en el valor de luminosidad.

4.1.1.1.2. CROMATICIDAD.

La tendencia en la cromaticidad fue similar en las variedades de nochebuena bajo condiciones de bajas temperaturas (Figura 22). Las plantas bajo ambiente, 7 y 2 °C fueron afectadas significativamente solo en el muestreo final; para la temperatura de 0 °C hubo diferencia significativa después del tratamiento, con una leve disminución, llegando al muestreo final sin plantas que hayan sobrevivido después del tratamiento.

La cromaticidad fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) y por la variedad (V) después del tratamiento y en la fecha comercial ($P \leq 0.05$); además la interacción T x V fue significativa en dichas fechas de muestreo (Cuadro 10). De manera general, la tendencia en las plantas expuestas a bajas temperaturas después del tratamiento disminuyó. Para el día de muestreo final (fecha comercial) las plantas de todas las temperaturas de exposición tuvieron un valor de luminosidad mayor que en las fechas de muestreo anteriores.

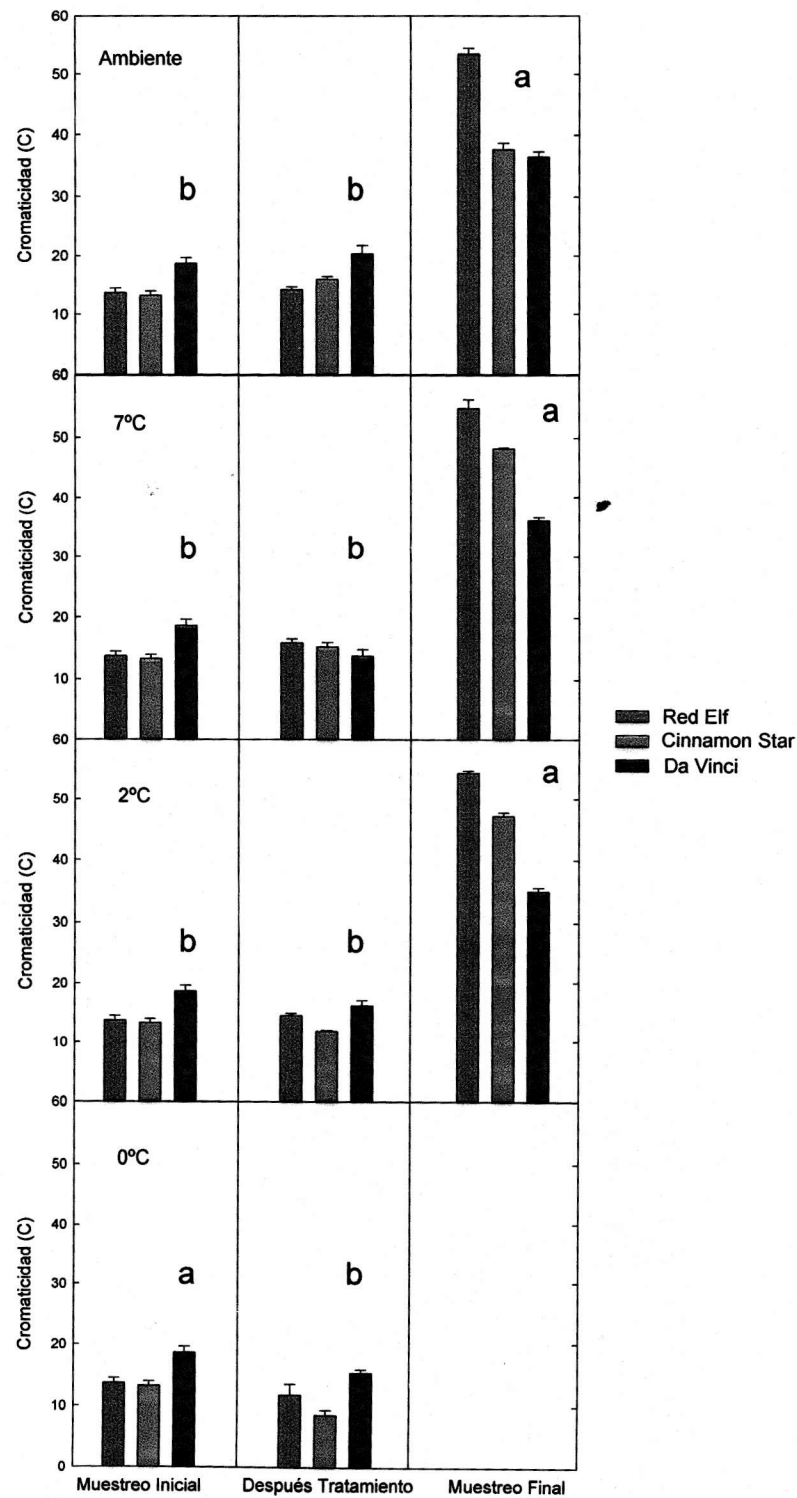


Figura 22. Comportamiento de la cromaticidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud estadística

(Tukey; 0.05). DMSH 1.61, 0.25, 1.07 y 3.31 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 10. Comportamiento de la cromaticidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Cromaticidad (C)		
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	15.16 a ^z	16.77 a	42.46 b
7 °C	15.16 a	14.90 ab	46.30 a
2 °C	15.16 a	14.08 b	45.44 ab
0 °C	15.16 a	11.84 c	---
DMSH	1.90	1.98	2.97
Variedad (V)			
Red Elf	13.66 b	14.04 b	54.11 a
Cinnamon Star	13.19 b	12.83 b	44.30 b
Da Vinci	18.61 a	16.32 a	35.79 c
DMSH	1.50	3.56	2.53
T x V	ns	**	***

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

Las variedades sometidas a bajas temperaturas en todas las fechas de muestreo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) siendo Da Vinci la que tuvo el valor más alto en cuanto a cromaticidad que el resto de las variedades antes y después de ser expuestas a frío. Al final del estudio, las variedades tuvieron un aumento en la cromaticidad. La interacción T x V se presentó después de ser sometidas las plantas a bajas temperaturas y en el muestreo final, esto indica que la cromaticidad fue afectada tanto por la temperatura de exposición como por la temperatura del invernadero y/o por el manejo del cultivo al que fueron sometidas las variedades. El incremento de la cromaticidad se ha reportado como un efecto de la baja temperatura en *Eugenia stipitata* L.

expuesta a 7 °C durante 20 días (Gallego *et al.*, 2003). De igual manera en *Citrus aurantifolia* (lima) almacenada a 5 y 10 °C durante 30 a 60 días se observó un incremento de los valores de cromaticidad (Kluge *et al.*, 2003). En el presente estudio no se vió un incremento significativo posiblemente causado por el tiempo de exposición a frío (solo 72 horas).

4.1.1.1.3. ÁNGULO DE MATÍZ (°HUE).

El tono registrado como °HUE fue afectado significativamente por la temperatura de exposición (T) y por la variedad (V) después del tratamiento y en la fecha comercial ($P \leq 0.05$); además la interacción T x V fue significativa en dichas fechas de muestreo (Cuadro 11). De manera general, la tendencia en las plantas expuestas a bajas temperaturas después del tratamiento se mantuvo (Figura 23). Para el día de muestreo final (fecha comercial) todas las plantas de las temperaturas de exposición tuvieron un valor menor que en las fechas de muestreo anteriores.

Las variedades sometidas a bajas temperaturas en todas las fecha de muestreo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) siendo Cinnamon Star la que tuvo el valor más alto en cuanto a este parámetro que el resto de las variedades después de ser expuestas a bajas temperaturas. Al final del estudio, las plantas tuvieron una disminución en el °HUE.

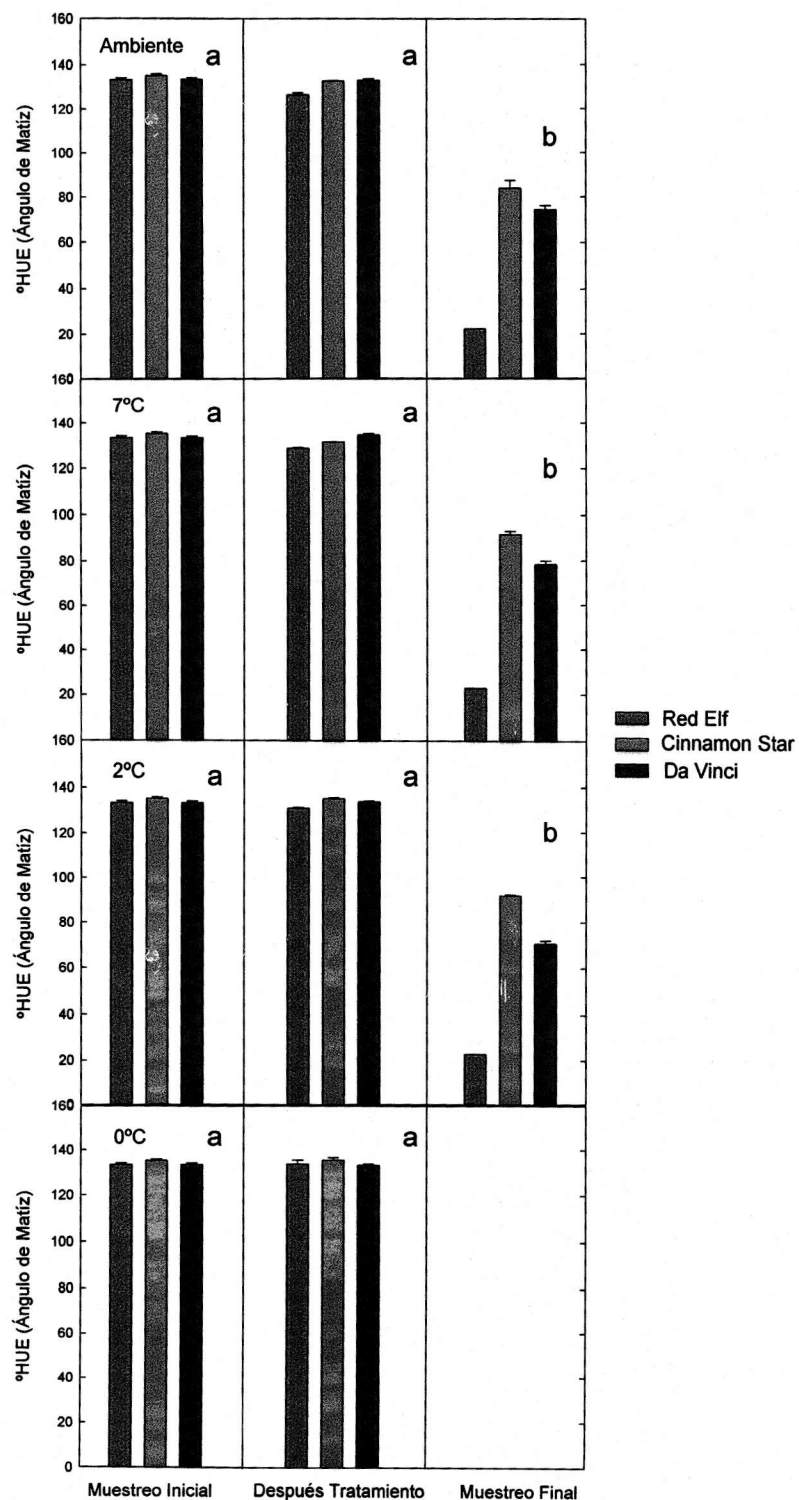


Figura 23. Comportamiento del ángulo de matiz en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud estadística

(Tukey; 0.05). DMSH 3.32, 2.39, 0.63 y 0.15 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 11. Comportamiento del ángulo de matiz en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

de noche buena expuestas a diferentes temperaturas.			
Factor	Ángulo de Matiz (°HUE)		
Nivel	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	133.96 a ^z	130.63 c	60.13 b
7 °C	133.96 a	131.56 bc	64.19 a
2 °C	133.96 a	133.32 ab	61.69 b
0 °C	133.96 a	134.11 a	---
DMSH	1.64	1.84	3.74
Variedad (V)			
Red Elf	133.40 b	129.90 b	22.55 c
Cinnamon Star	135.12 a	133.66 a	89.08 a
Da Vinci	133.35 b	133.66 a	74.37 b
DMSH	1.29	1.45	14.97
T x V	ns	**	***

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

La interacción T x V se presentó después de ser sometidas las variedades a bajas temperaturas y en el muestreo final, esto indica que el color verdadero se afectó tanto por la temperatura de exposición como por la temperatura del invernadero y/o por el manejo del cultivo al que fueron sometidas las plantas. El cambio en coloración indica una respuesta a las bajas temperaturas (Lyons, 1973; Mackersie y Leshem, 1994) y este comportamiento representa un ligero cambio de color de verde hacia amarillo en variedades después de ser expuestas a bajas temperaturas. Además, el tono en Cinnamon Star y Da Vinci cambió de un tono verde/amarillo a uno naranja; mientras que Red Elf cambió

de verde/amarillo a rojo al final del estudio (Anónimo, 2002). Esto se puede observar de mejor manera en las siguientes imágenes:

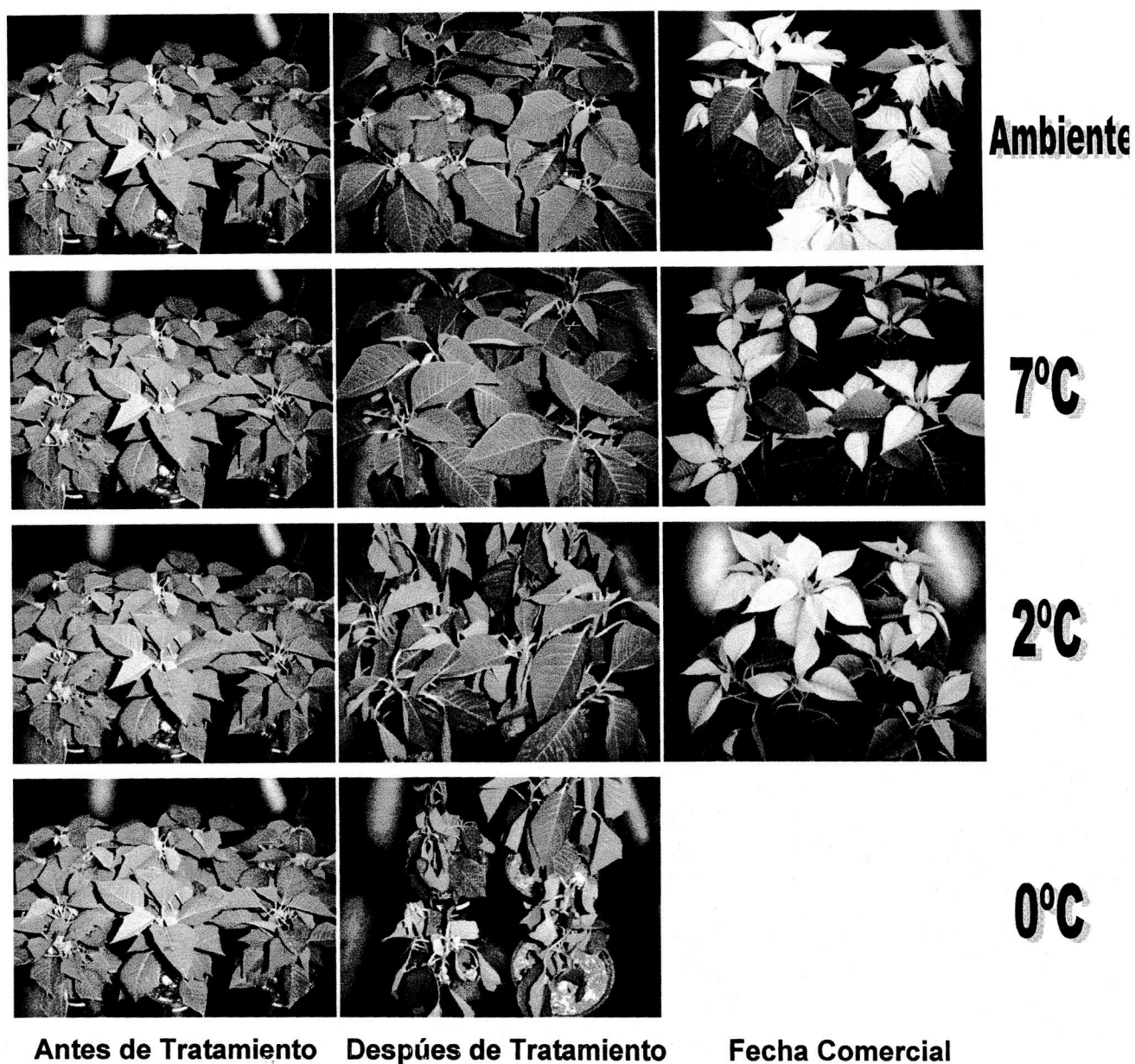


Figura 24. Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Cinnamon Star expuesta a varias temperaturas.

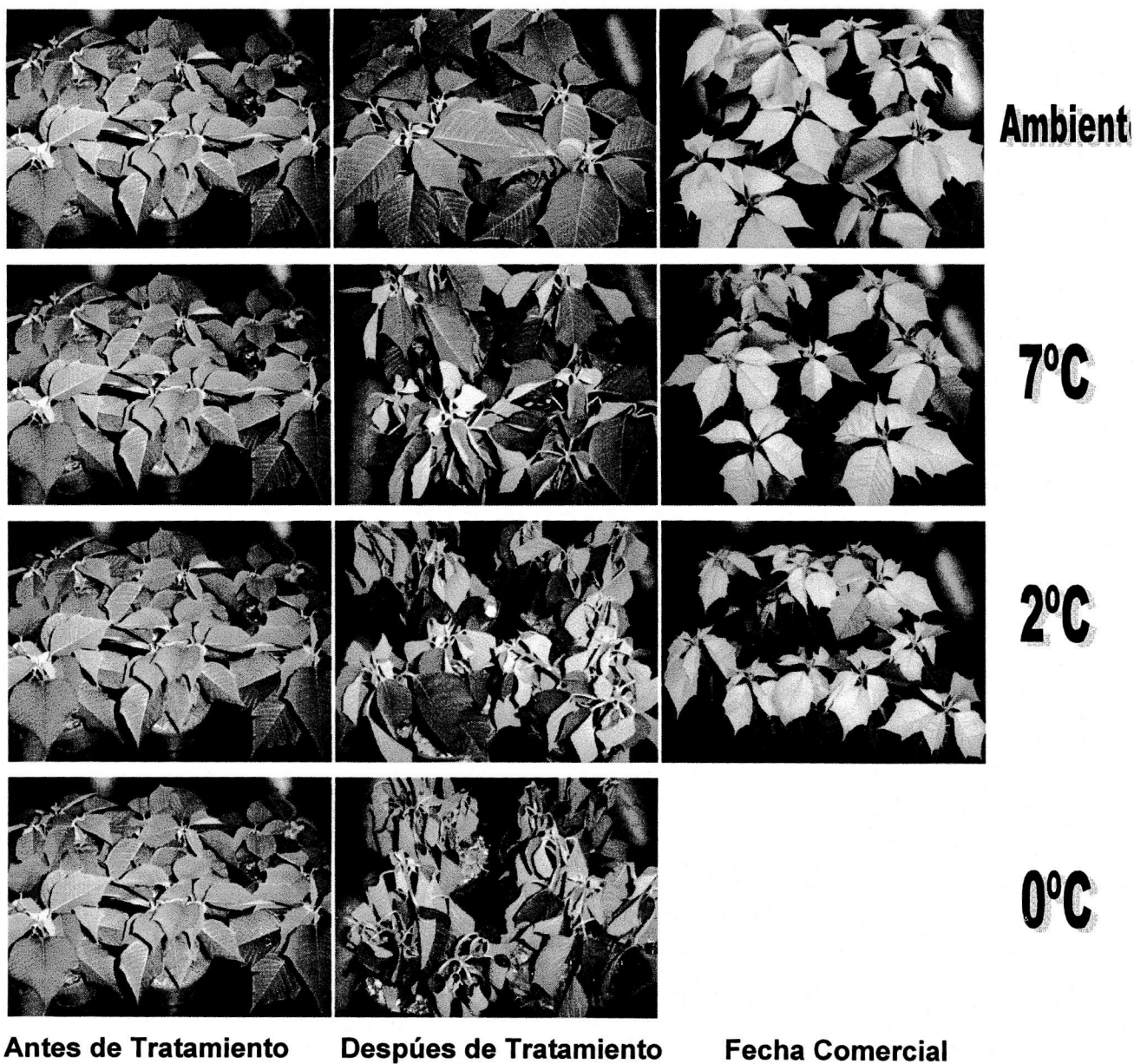


Figura 25. Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Da Vinci expuesta a varias temperaturas.

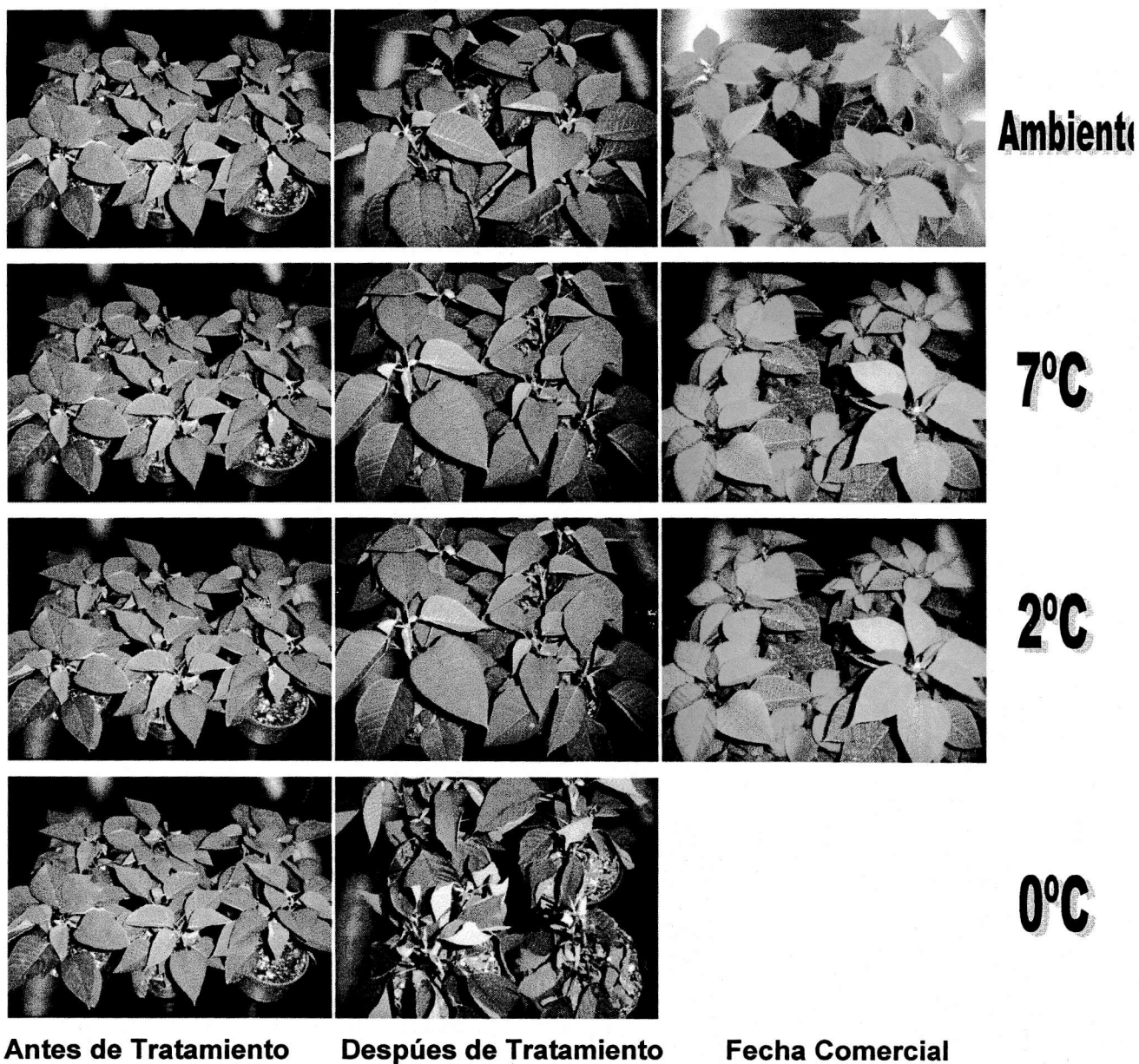


Figura 26. Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Red Elf expuesta a varias temperaturas.

4.1.1.2. CHALCONA ISOMERASA.

La actividad de esta enzima fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) después del tratamiento ($P \leq 0.05$), de igual manera que el factor variedad (V); además la interacción T x V no fue significativa en ninguna fecha de muestreo (Cuadro 12). De manera general, la tendencia en todas las temperaturas de exposición a frío después del tratamiento fue similar, incrementándose gradualmente según a la temperatura que se colocaron las variedades. A 7, 2 y 0 °C la actividad enzimática aumentó conforme la temperatura es menor. En la fecha comercial, la actividad enzimática aumentó significativamente en ambiente, 7 y 2 °C, mientras que a 0 °C esta diferencia se observó después del tratamiento con dicha baja temperatura (Figura 27).

A menor temperatura de exposición a frío se observó una mayor actividad enzimática, mostrando diferencia significativa entre las mismas ($P \leq 0.05$) después del tratamiento de exposición a frío y en la fecha comercial (muestreo final). Las plantas expuestas a 0 °C mostraron una actividad casi 15 veces mayor que bajo condiciones de ambiente.

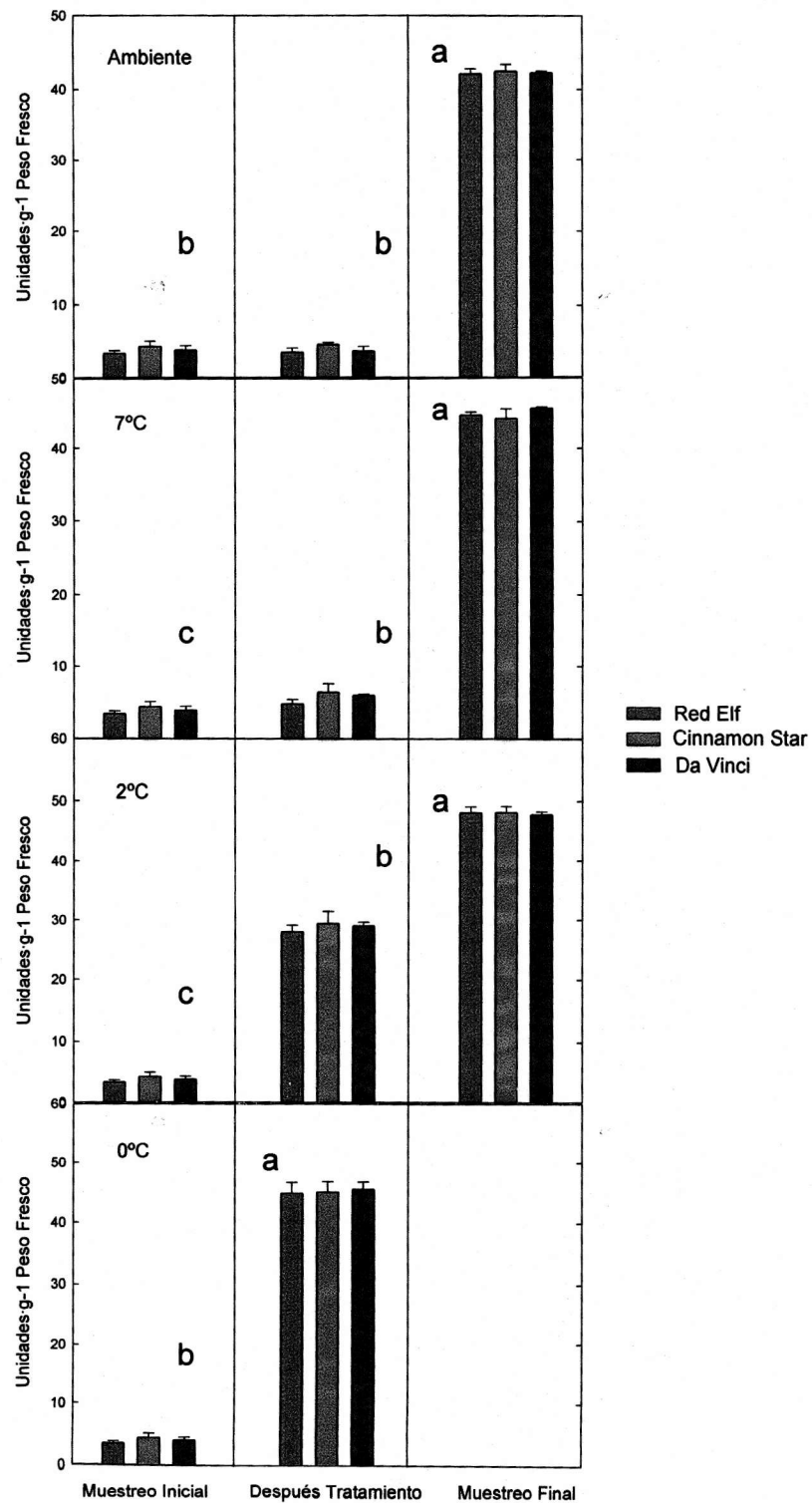


Figura 27. Comportamiento de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de

exposición indican similitud estadística (Tukey; 0.05). DMSH 0.06, 1.82, 2.25 y 3.86 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 12. Comportamiento de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Actividad enzimática CHI (Unidades g ⁻¹ de peso fresco)		
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	3.86 a ^z	3.92 c	42.29 c
7 °C	3.86 a	5.68 c	44.77 b
2 °C	3.86 a	28.73 b	47.99 a
0 °C	3.86 a	45.11 a	---
DMSH	1.30	2.65	2.79
Variedad (V)			
Red Elf	3.40 a	20.24 a	44.93 a
Cinnamon Star	4.33 a	21.33 a	44.91 a
Da Vinci	3.85 a	21.01 a	45.20 a
DMSH	1.02	2.08	2.13
T x V	ns	ns	ns

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

Tanto antes como después de someter las variedades a las diferentes temperaturas de exposición y en el muestreo final no se observó diferencia significativa en la actividad enzimática entre ellas ($P \leq 0.05$), Cinnamon Star presentó una mayor actividad que el resto de las variedades después del tratamiento de frío respectivo, las plantas no mostraron diferencia significativa, pero si se observó un aumento en la actividad enzimática con respecto a antes de ser expuestas a frío. Numerosos genes agrupados bajo procesos de biosíntesis de los fenilpropanoides/flavonoides fueron inducidos por tratamiento de frío. Siete genes inducidos por frío codificaron para enzimas clave en los

pasos principales en la ruta biosintética de los flavonoides, dentro de ellas se encuentra la CHI (Mehrtens *et al.*, 2005). Un aumento al final del estudio no significa que la actividad enzimática sea representativa de daño por frío, sino que la CHI es parte esencial de la biosíntesis de la flavanona (precursor de los pigmentos florales) y enzima clave en la formación de antocianinas (Dong *et al.*, 1998; Jez y Noel, 2002). Por su parte, las variedades con colores veteados, bronce o bicolor contienen mayor cantidad de flavonoles (Stewart *et al.*, 1980), pero esto no significa que la actividad enzimática no regule o actúe en la biosíntesis de compuestos flavonoles (Harborne, 1994; Iwashina, 2000; Li *et al.*, 2002).

4.1.1.3. RESPIRACIÓN.

La producción de CO₂ de las variedades no fue afectada significativamente antes, después del tratamiento en las diferentes temperaturas de exposición (T) y en el muestreo final, de igual manera que para el factor variedad (V); además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 13). La respiración en todas las temperaturas de exposición aumentó después de ser expuestas a su respectiva baja temperatura (Figura 28). Y en la fecha comercial (muestreo final) la producción de CO₂ disminuyó.

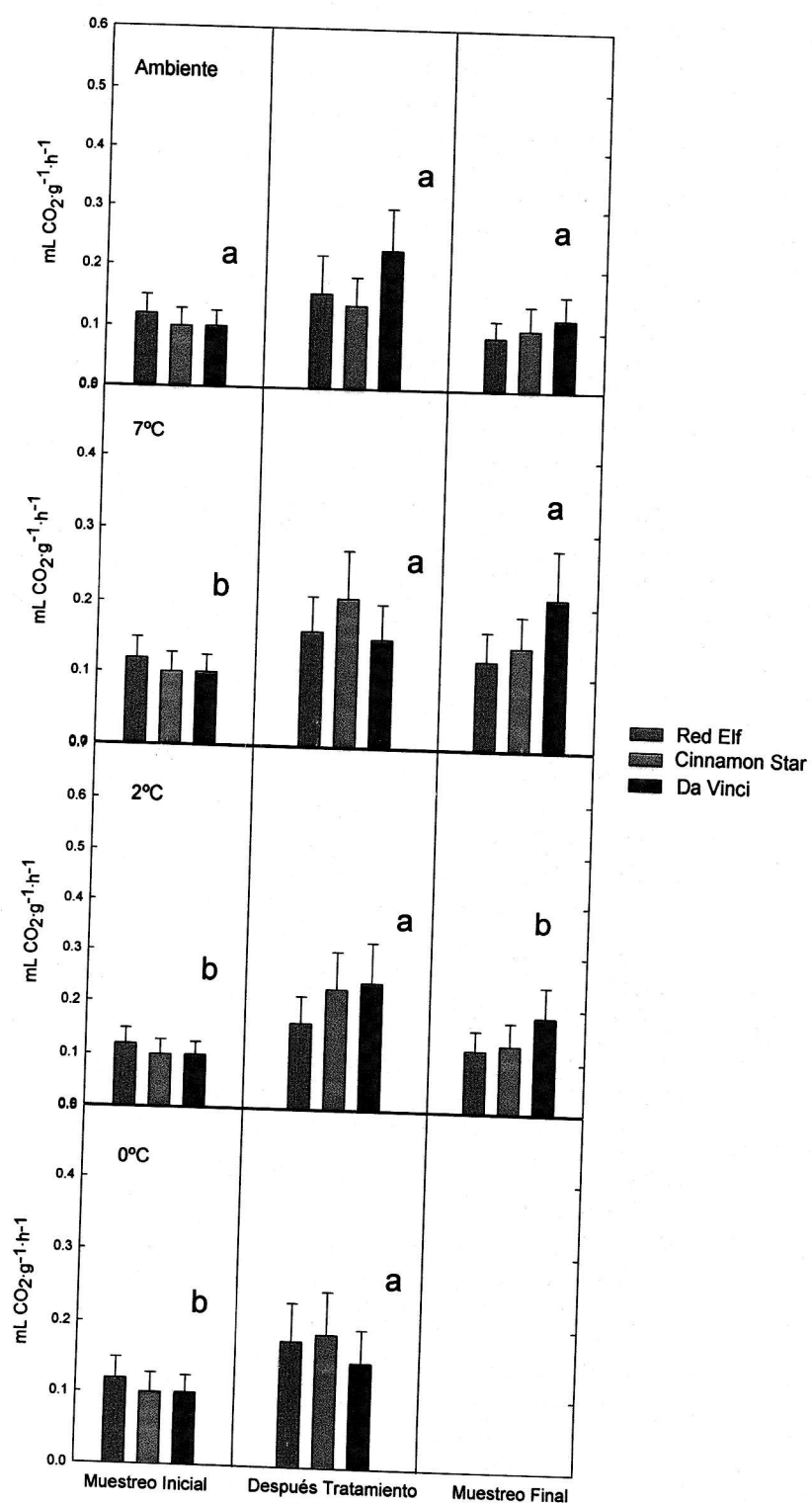


Figura 28. Comportamiento de la respiración en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud estadística

(Tukey; 0.05). DMSH 0.06, 0.06, 0.10 y 0.06 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 13. Comportamiento de la respiración en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Respiración (mL CO ₂ g ⁻¹ h ⁻¹)			
Factor			
Nivel	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	0.1069 a ^z	0.1737 a	0.1043 a
7 °C	0.1069 a	0.1735 a	0.1598 a
2 °C	0.1069 a	0.2121 a	0.1461 a
0 °C	0.1069 a	0.1704 a	---
DMSH	0.059	0.129	0.089
Variedad (V)			
Red Elf	0.1196 a	0.1645 a	0.1113 a
Cinnamon Star	0.1003 a	0.1904 a	0.1259 a
Da Vinci	0.1006 a	0.1925 a	0.1731 a
DMSH	0.047	0.102	0.089
T x V	ns	ns	ns

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

Tanto antes como después de someter las variedades a las diferentes temperaturas de exposición y en el muestreo final no se observó diferencia significativa en la respiración entre ellas ($P \leq 0.05$), Cinnamon Star presentó una mayor producción de CO₂ que el resto de las variedades después del tratamiento de frío respectivo, las plantas no mostraron diferencia significativa, pero si se observó un aumento en la tasa de respiración con respecto a antes de ser expuestas a baja temperatura. Para la fecha comercial, se observó una disminución en este parámetro con respecto a las fechas anteriores en las plantas de nochebuena donde no mostraron diferencia significativa. Cuando se presenta una respiración elevada durante o después del almacenamiento a

bajas temperaturas es debido al daño por frío, seguido de síntomas externos visibles (Lyons, 1973). Además, Navarro (2004) reporta un incremento en la tasa de respiración en variedades silvestres sometidas a 7 y 2 °C, similar a lo que se observó en el presente estudio.

4.1.1.4. PRODUCCIÓN DE ETILENO.

El comportamiento de esta variable fue inversamente al obtenido para la respiración, las plantas analizadas no fueron afectadas significativamente antes y después del tratamiento de frío en las diferentes temperaturas de exposición (T), además el factor variedad (V) no mostró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en ninguna fecha de muestreo; la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 14). La producción de etileno en todas las temperaturas de exposición disminuyó después de ser expuestas a su tratamiento respectivo (Figura 29).

Antes de someter las variedades a las diferentes temperaturas de exposición se observó que Red Elf obtuvo una mayor producción de etileno que el resto de las variedades, no encontrándose diferencias entre ellas. De la misma manera, después del tratamiento de frío respectivo, ninguna variedad mostró diferencia significativa, pero si se observó en Red Elf y Da Vinci una disminución en su producción de etileno con respecto a antes de ser expuestas a frío. Para la fecha comercial, el etileno producido por las plantas fue menor que en las fechas anteriores de muestreo.

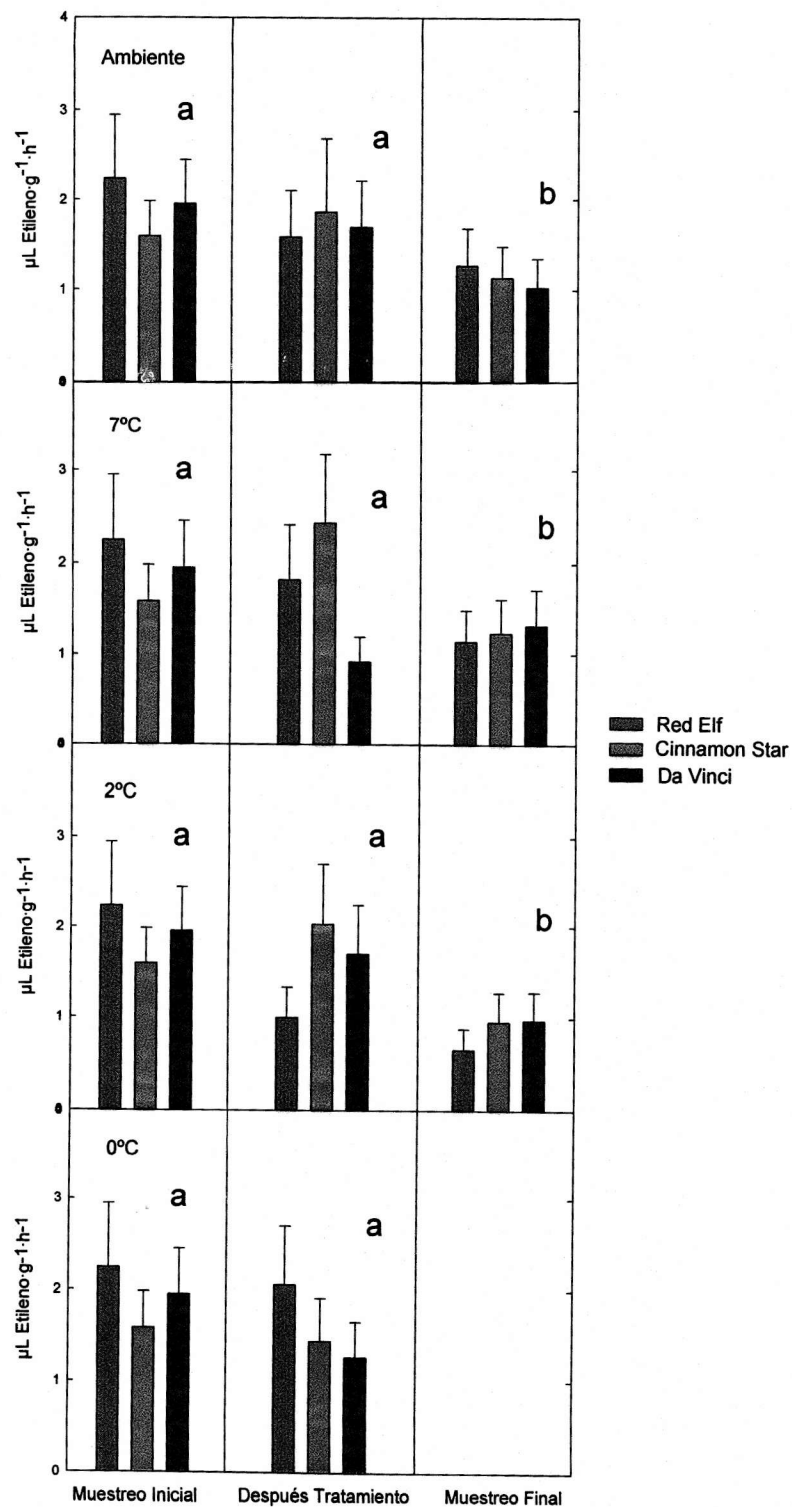


Figura 29. Comportamiento de la producción de etileno en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud

estadística (Tukey; 0.05). DMSH 0.78, 0.20, 0.35 y 0.43 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 14. Comportamiento de la producción de etileno en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Etileno ($\mu\text{L Etileno g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)		
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	1.926 a ^z	1.708 a	1.137 a
7 °C	1.926 a	1.720 a	1.231 a
2 °C	1.926 a	1.573 a	0.862 a
0 °C	1.926 a	1.589 a	---
DMSH	1.170	1.223	0.681
Variedad (V)			
Red Elf	2.238 a	1.613 a	1.020 a
Cinnamon Star	1.589 a	1.939 a	1.106 a
Da Vinci	1.951 a	1.391 a	1.104 a
DMSH	0.922	0.963	0.681
T x V	ns	ns	ns

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

La producción de etileno es uno de los indicativos de daño por bajas temperaturas (Lyons, 1973; Druege, 2006). El inicio en la producción de etileno como efecto de daños por bajas temperaturas, depende de la sensibilidad de la plantas a este tipo de estrés. Puede variar desde una hora en plantas tropicales sensibles como *Episcia reptans* hasta varios días como el pepino. *Passiflora edulis* L. presenta un incremento en la producción de etileno después de cuatro días a una temperatura de 0 °C (Yi y Patterson, 1985). En un estudio realizado con *Citrus sinensis* la producción de etileno disminuyó después de tres y seis días de almacenamiento a baja temperatura y lo correlacionaron con la

expresión de CS-ACS1, el nivel de ACC fue más bajo en 3 días que en 6 (Wong *et al.*, 1999).

4.1.2. ESTRÉS OXIDATIVO.

4.1.2.1. ASCORBATO PEROXIDASA (APX).

La actividad enzimática fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) después del tratamiento y al final del estudio ($P \leq 0.05$), de igual manera que para el factor variedad (V); además la interacción T x V fue significativa en dichas fechas de muestreo (Cuadro 15). De manera general, la tendencia en todas las temperaturas de exposición a frío después del tratamiento fue similar, incrementándose solamente a 7 °C (Figura 30). A menor temperatura de exposición a frío se observó una menor actividad enzimática, mostrando diferencia significativa entre las mismas ($P \leq 0.05$) después del tratamiento de exposición a frío y en la fecha comercial (muestreo final).

Después de haber sido expuestos a bajas temperaturas las variedades, la actividad enzimática de la APX disminuyó, mostrando diferencia significativa ($P \leq 0.05$) siendo Cinnamon Star la que tuvo la valor mayor actividad que el resto de las variedades. En la fecha comercial (muestreo final), los Da Vinci y Cinnamon Star tuvieron una ligera disminución con respecto a las otras fechas de muestreo, por el contrario Red Elf aumentó ligeramente la actividad enzimática de la APX.

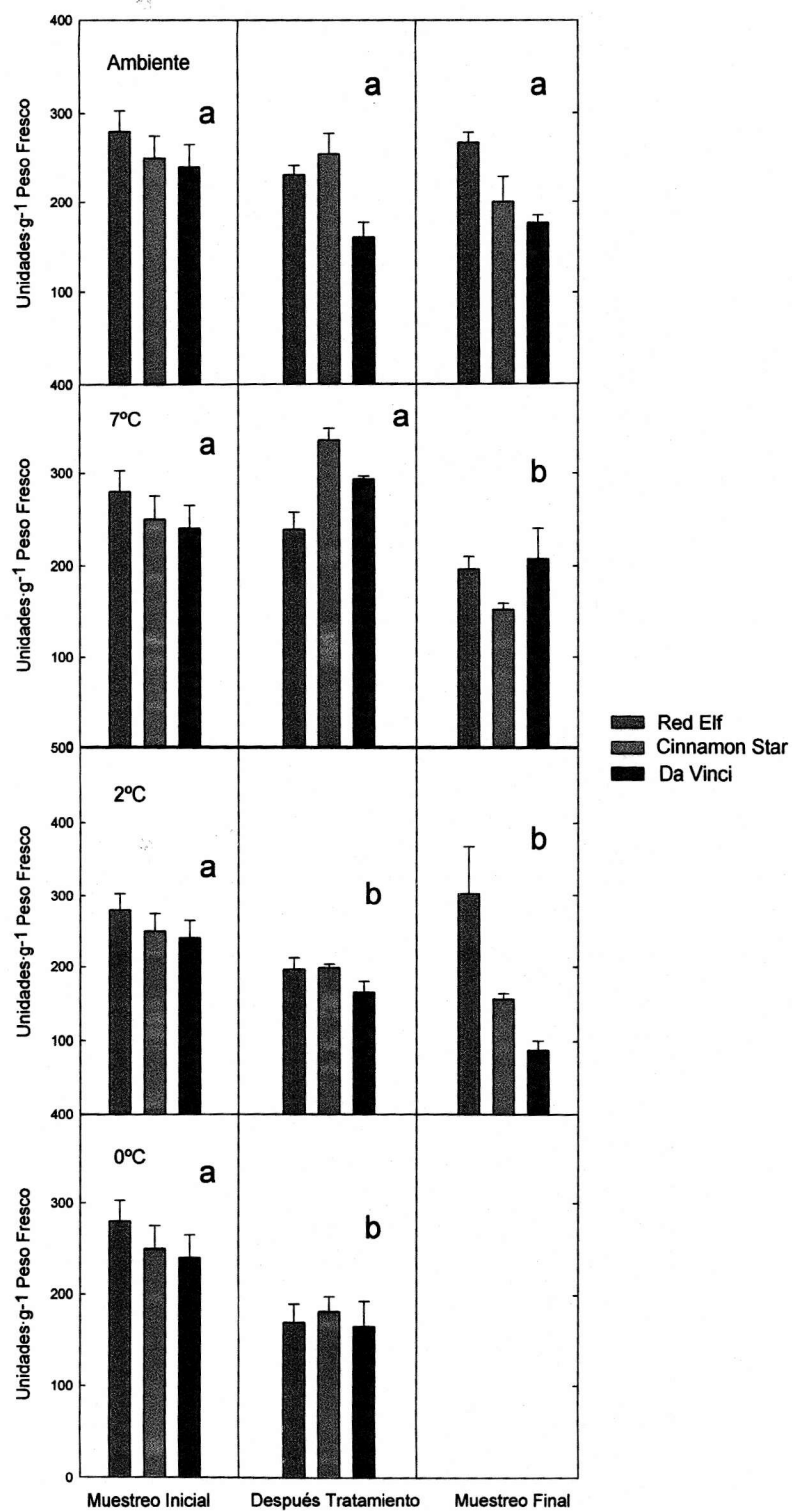


Figura 30. Comportamiento de la actividad de la ascorbato peroxidasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de

exposición indican similitud estadística (Tukey; 0.05). DMSH 0.61, 32.99, 4.25 y 84.02 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 15. Comportamiento de la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa en tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Actividad enzimática APX (Unidades g ⁻¹ de peso fresco)		
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	256.25 a ^z	214.67 b	213.96 a
7 °C	256.25 a	289.24 a	185.48 b
2 °C	256.25 a	186.27 bc	182.02 b
0 °C	256.25 a	172.23 c	---
DMSH	52.77	37.24	23.87
Variedad (V)			
Red Elf	279.57 a	208.70 b	255.01 a
Cinnamon Star	249.59 a	242.38 a	169.35 b
Da Vinci	239.60 a	195.74 b	157.10 b
DMSH	41.56	13.27	61.08
T x V	ns	*	**

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

La interacción T x V se presentó una vez que las plantas salieron de la exposición a baja temperatura y en el muestreo final, esto indica que la actividad enzimática de la APX fue afectada por la temperatura del invernadero y/o por el manejo del cultivo al que fueron sometidas las plantas. Una baja actividad de la APX y catalasa en varias especies expuestas a estrés por frío muestran una tolerancia oxidativa o aclimatación en las mismas (Kuk *et al.*, 2003). El incremento en la concentración de un antioxidante simple o enzima no protege el tejido vegetal si otros mecanismos de búsqueda son limitados o si la sobre-expresión da como resultado una producción incrementada o búsqueda

reducida de las ROS. La tolerancia al estrés oxidativo probablemente depende de una inducción exitosa en una desintoxicación funcional en compartimentos subcelulares específicos que son expuestos a altas concentraciones de radicales libres. Existe evidencia que la sobre-expresión de enzimas antioxidantes puede dar como resultado en la tolerancia de múltiples causas de estrés oxidativo, incluido patógenos, paraquat, estrés osmótico (por frío, salinidad y sequía) (Bray *et al.*, 2000).

4.1.2.2. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).

La actividad enzimática de la SOD fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) al final del estudio ($P \leq 0.05$), de igual manera que para el factor variedad (V) en todas las fecha de muestreo; por otro lado la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 16). De manera general, la tendencia en todas las temperaturas de exposición a frío después del tratamiento fue similar. De la misma manera que para la APX, la exposición a una baja temperatura se observó una menor actividad enzimática de la SOD, mostrando diferencia significativa entre las mismas ($P \leq 0.05$) al final del estudio (muestreo final) (Figura 31).

Después de la exposición a bajas temperaturas las plantas de las variedades, la actividad enzimática disminuyó, mostrando diferencia significativa ($P \leq 0.05$) siendo Cinnamon Star la que tuvo la mayor actividad que el resto de las variedades. En la fecha comercial (muestreo final), las plantas tuvieron una ligera disminución con respecto a las otras fechas de muestreo.

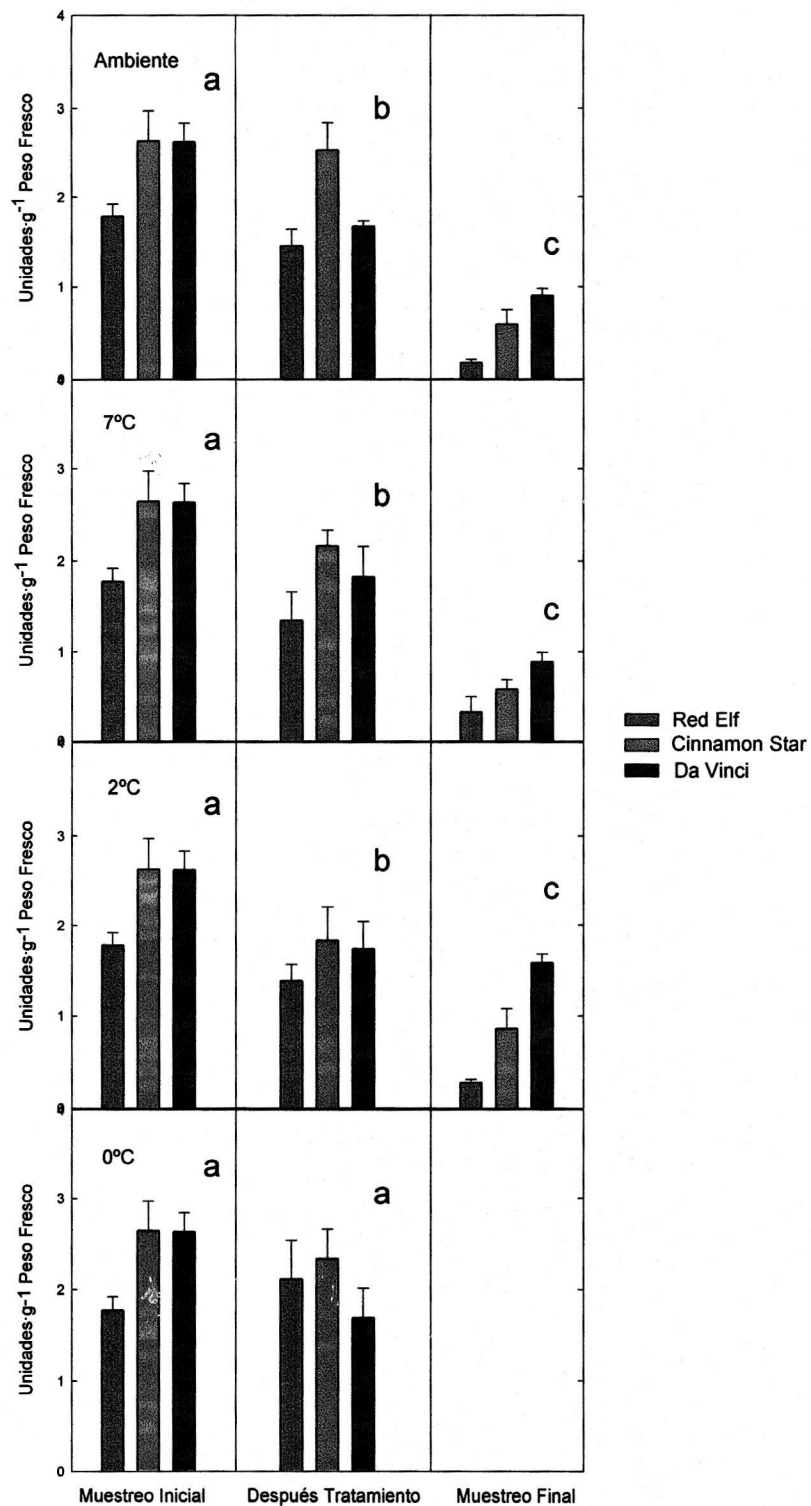


Figura 31. Comportamiento de la actividad de la superóxido dismutasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de

exposición indican similitud estadística (Tukey; 0.05). DMSH 0.46, 0.56, 0.69 y 0.30 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 16. Comportamiento de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Actividad enzimática SOD (Unidades g ⁻¹ de peso fresco)		
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	2.34 a ^z	1.87 a	0.56 b
7 °C	2.34 a	1.77 a	0.59 ab
2 °C	2.34 a	1.64 a	0.90 a
0 °C	2.34 a	2.04 a	---
DMSH	0.52	0.64	0.31
Variedad (V)			
Red Elf	1.77 b	1.57 b	0.26 c
Cinnamon Star	2.63 a	2.21 a	0.68 b
Da Vinci	2.62 a	1.72 ab	1.12 a
DMSH	0.41	0.50	0.30
T x V	ns	ns	ns

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

De la misma manera que la APX, la SOD está asociada con la tolerancia al estrés porque neutraliza la reactividad del O₂⁻ el cual es sobre producido bajo dicha circunstancia (Bowler *et al.*, 1994). En un estudio realizado con plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) bajo condiciones de daño por frío se encontró que una baja actividad de enzimas oxidativas muestran una tolerancia oxidativa, además de ofrecer una protección para aclimatarse a la exposición de baja temperatura (Kuk *et al.*, 2003). Además se ha sugerido que plantas tolerantes a frío pueden mostrar tres diferentes mecanismos para sobrevivir o incluso desarrollarse en bajas temperaturas, como evitar la producción de ROS (tal y como se mostró en

este estudio), protección a si misma de reacciones degradativas o deletéreas asociadas con eficiencia en la búsqueda de ROS ó por la reparación del daño después de que ocurrió la degradación (Pinhero *et al.*, 1997).

4.1.2.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

La peroxidación de lípidos no fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) antes y en la fecha comercial, solamente después del tratamiento ($P \leq 0.05$), de igual manera que el factor variedad (V) antes de ser expuestos a bajas temperaturas; además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 17). De manera general, la peroxidación en todas las temperaturas después de los tratamientos aumentó ligeramente (Figura 32).

Antes de someter las variedades a las diferentes temperaturas de exposición se observó diferencia significativa en la actividad enzimática entre ellas ($P \leq 0.05$), siendo Red Elf la que tuvo una mayor peroxidación lipídica con respecto al resto. Después del tratamiento de frío respectivo y en la fecha comercial (muestreo final), las plantas no mostraron diferencia significativa, pero todas las variedades presentaron una mayor peroxidación.

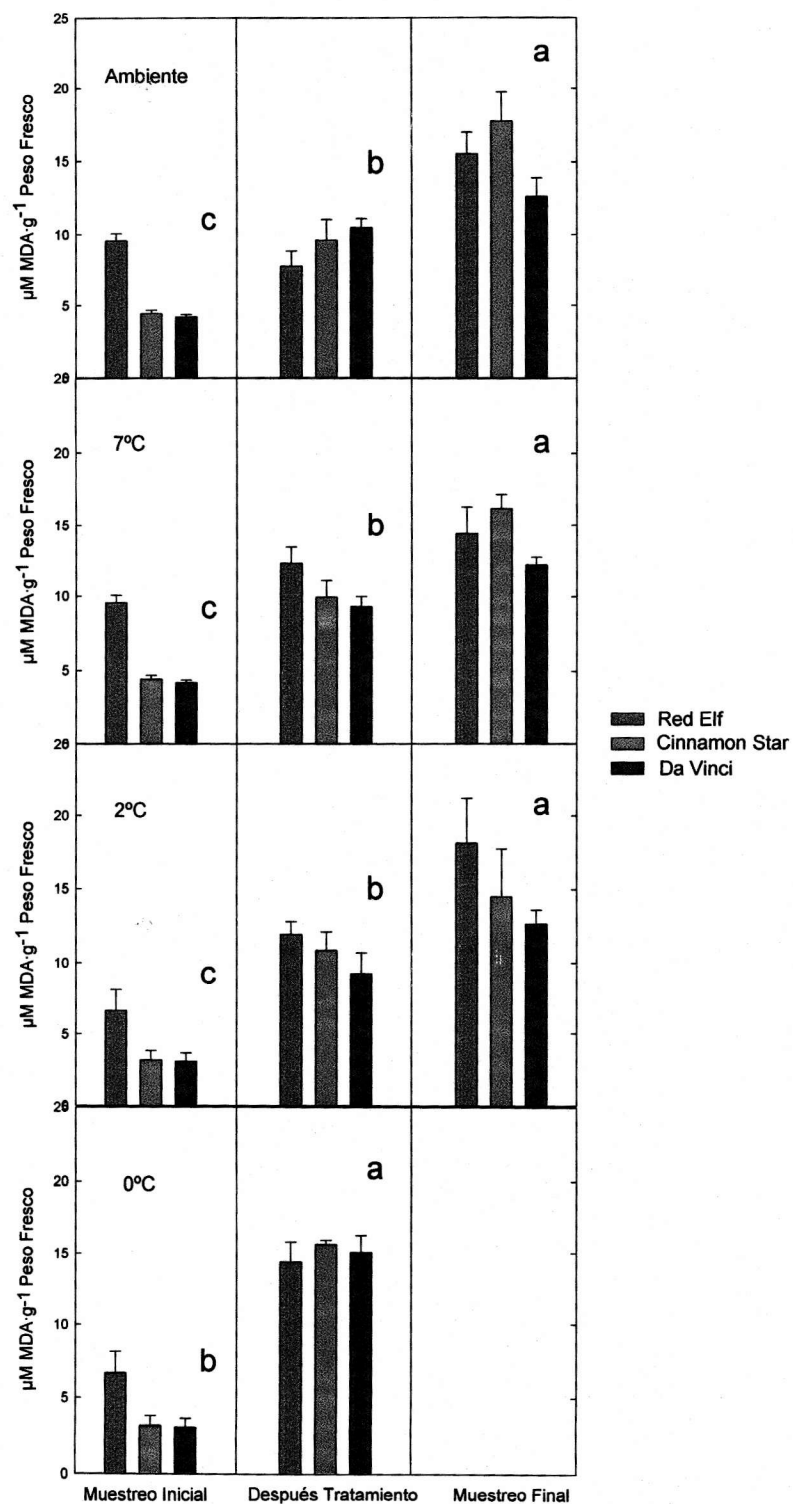


Figura 32. Comportamiento de la peroxidación lipídica en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud

estadística (Tukey; 0.05). DMSH 3.22, 3.74, 4.64 y 6.04 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 17. Comportamiento de la peroxidación de lípidos en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Peroxidación lipídica (μM de MDA g^{-1} de peso fresco)		
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	6.04 a ^z	9.27 b	15.30 a
7 °C	6.04 a	10.49 b	14.24 a
2 °C	6.04 a	10.68 b	15.09 a
0 °C	6.04 a	15.00 a	---
DMSH	0.76	2.45	1.93
Variedad (V)			
Red Elf	9.54 a	11.59 a	16.02 a
Cinnamon Star	4.41 b	11.50 a	16.13 a
Da Vinci	4.18 b	11.00 a	12.48 a
DMSH	0.59	1.93	4.57
T x V	ns	ns	ns

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

La peroxidación de lípidos es una forma de medir el daño celular bajo estrés por frío (Prasad *et al.*, 1994), por lo tanto si existe una baja peroxidación en especies con daño por frío significa que dicha especie es tolerante (Kuk *et al.*, 2003). Un signo temprano de inminente muerte celular en algunas formas de muerte celular programada en plantas es la generación de especies reactivas de oxígeno y de súper óxido (Jabs *et al.*, 1996). En un estudio realizado con pepino almacenado a 4 °C y 95% HR, el daño por frío se presentó a los 7 días incrementado la peroxidación, la producción de etileno y síntomas visuales; estos resultados indican que la potenciación de la peroxidación lipídica está asociada con el inicio de daño irreversible (Kuo y Parkin, 2006).

4.1.3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

4.1.3.1. FRAGMENTACIÓN DE ADN.

Las muestras almacenadas en ultracongelador (-70 °C) sufrieron un aumento en la temperatura (0 °C) dado que el equipo sufrió una descompostura que hizo que las muestras se hidrolizaran y por lo tanto el ADN se fragmentó (Figura 33). Solamente la muestra del cultivar Cinnamon Star en el muestreo inicial y en ambiente después del tratamiento se observó que la fragmentación fue parcial.

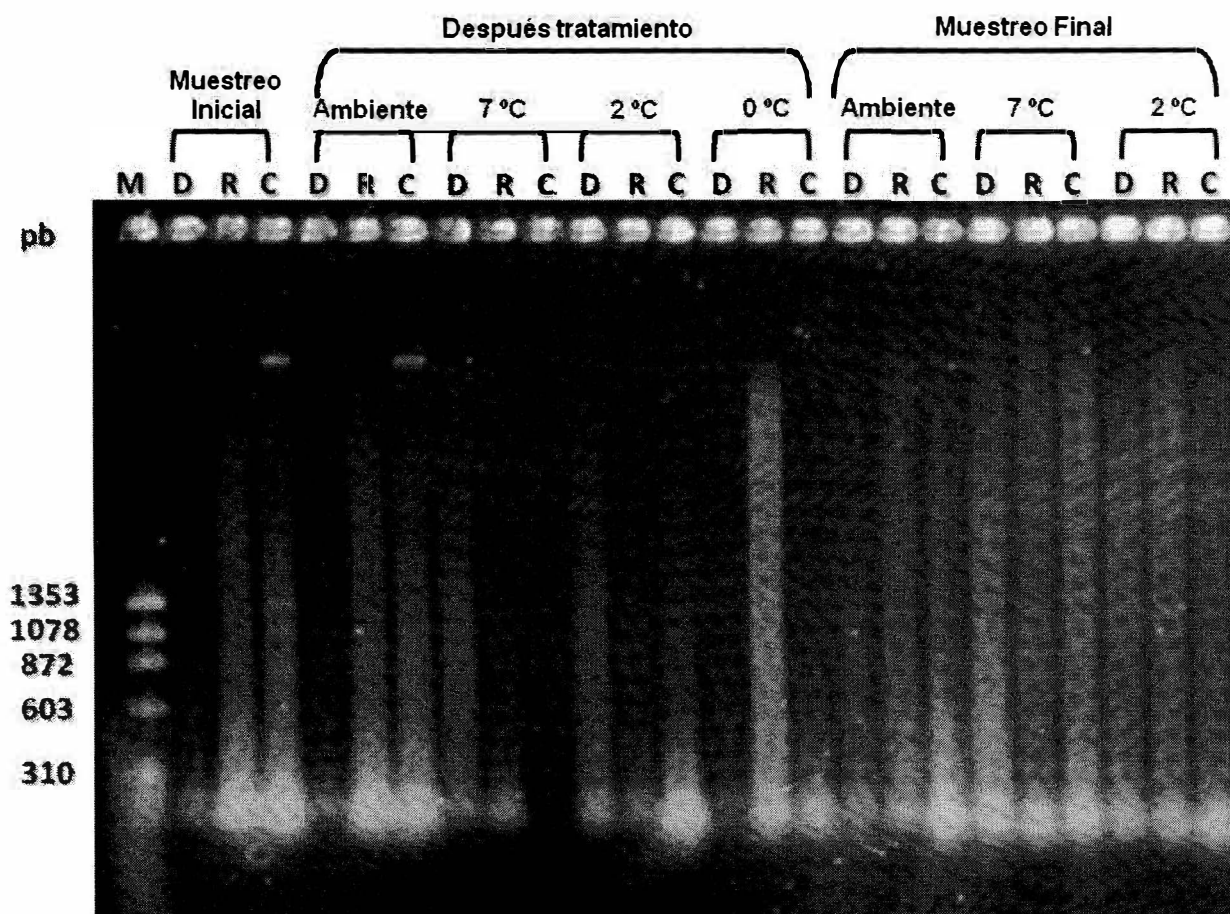


Figura 33. Fragmentación de ADN en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. M, marcador de peso molecular (Φ X174 DNA/Hae III. Promega). D, R y C; Da Vinci, Red Elf y Cinnamon Star, respectivamente.

Si no hubiese habido algún imprevisto con el equipo de almacenamiento se hubiera observado un patrón de bandeo uniforme, ya que el tiempo de almacenamiento a baja temperatura a la que las variedades de nochebuena fueron sometidos no se hubiera presentado la fragmentación, además de que se presentó una baja actividad enzimática de la proteasa (Figura 34). La exposición a baja temperatura (7 y 2 °C) de las variedades no hubiese afectado a la fragmentación del ADN, solamente a 0 °C, ya que las plantas de nochebuena expuestas a esta temperatura que regresaron al invernadero hasta la fecha comercial no sobrevivieron. El pasar de un almacenamiento a -70 °C a uno de 0 °C hizo que las muestras presentaran una hidrolización y por lo tanto se pudo observar claramente como el daño por congelamiento fragmentó al ADN. Rayson y Heath (1996) en un estudio realizado con tejido congelado (-20 °C) de *Vigna unguiculata* y posteriormente dejado a temperatura ambiente por 5 minutos se observó la escalerilla característica de la fragmentación del ADN, tal y como sucedió en presente estudio.

4.1.3.2. ACTIVIDAD DE LA PROTEASA.

La actividad de esta enzima fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) después del tratamiento ($P \leq 0.05$), de igual manera que el factor variedad (V); además la interacción T x V fue significativa al final del estudio (Cuadro 18). De manera general, la tendencia en todas las temperaturas de exposición a frío después del tratamiento fue similar, incrementándose gradualmente según la temperatura que se colocaron las variedades (Figura 34). A menor temperatura de exposición a frío se observó

una mayor actividad enzimática, mostrando diferencia significativa entre las mismas ($P \leq 0.05$). Ya en la fecha comercial (muestreo final) las plantas bajo 2 °C disminuyeron su actividad enzimática.

Después de someter las plantas de las variedades a las diferentes temperaturas de exposición se observó diferencia significativa en la actividad enzimática entre ellas ($P \leq 0.05$), Da Vinci presentó una mayor actividad que el resto de las variedades después del tratamiento de frío respectivo. Al final del estudio, se observó una disminución en la actividad enzimática en las plantas con respecto a su muestreo anterior, donde no mostraron diferencia significativa. La interacción T x V se presentó en el muestreo final, ya que las plantas fueron sometidas a baja temperatura y regresadas bajo condiciones y manejo de invernadero, esto indica que la actividad enzimática fue afectada por estos factores. Las proteasas hidrolizan proteínas por medio de la adición de agua entre los enlaces peptídicos, además catalizan la síntesis de péptidos en solventes orgánicos y en solventes con bajo contenido hídrico (Beg *et al.*, 2003). Una sensibilidad menor al daño por frío de una planta se debe a la habilidad de la especie a aclimatarse o tolerar el daño por frío, influenciado por el tiempo y aparición de daño ultraestructural (Kratsch y Wise, 2000). Existen diversos mecanismos en que las células pueden reparar el daño causado por las caspasas (cysteiny- aspartate-specific proteinases, en inglés) en el cual actúa la PARP (poly-ADP-ribose- polymerase, en inglés) reparando el daño ocasionado por ellas (Levine, 2004).

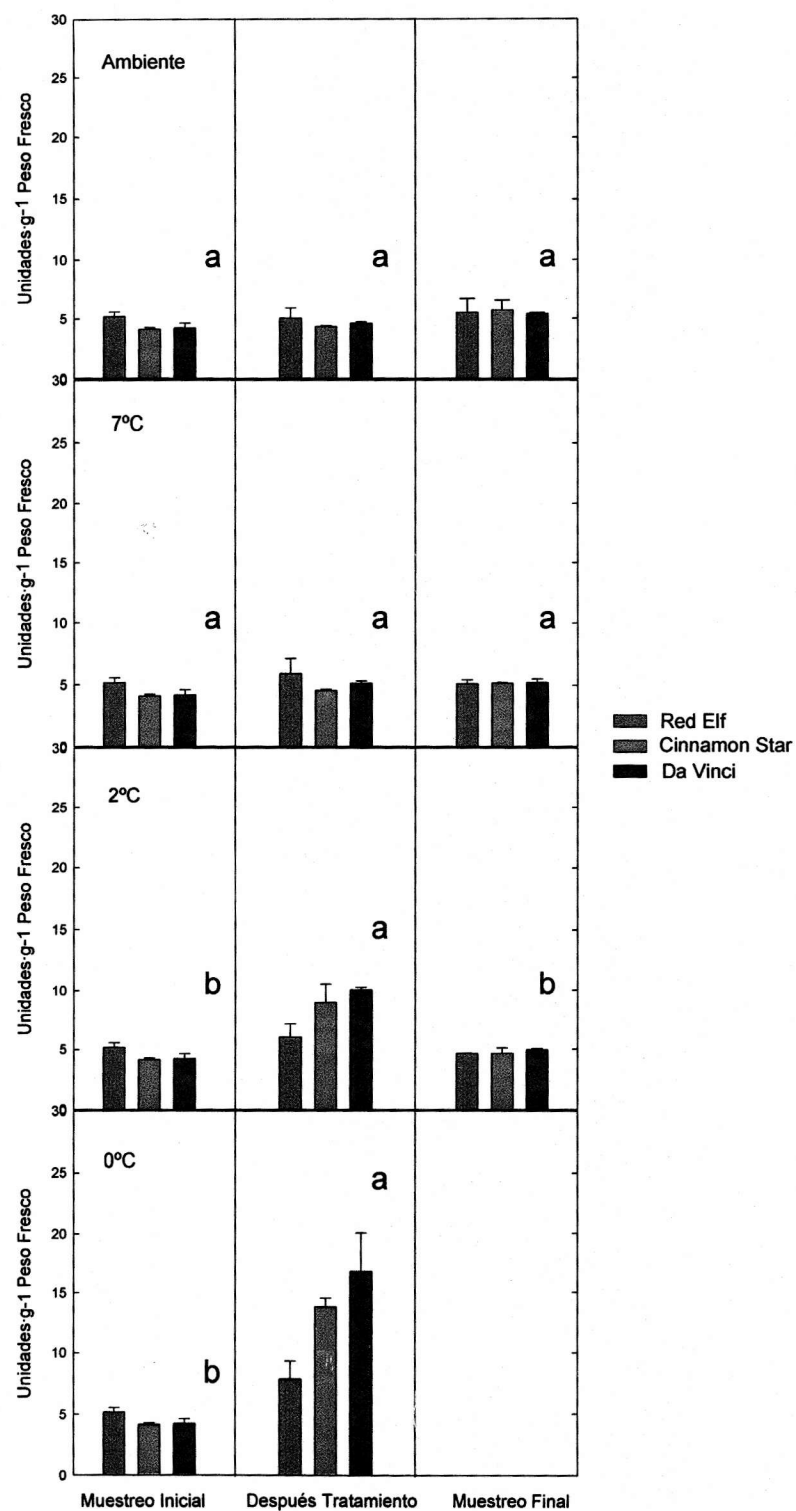


Figura 34. Comportamiento de la actividad de la proteasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales

por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud estadística (Tukey; 0.05). DMSH 1.03, 0.67, 3.62 y 4.49 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 18. Comportamiento de la actividad enzimática de la proteasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Actividad enzimática Proteasa (Unidades g ⁻¹ de peso fresco)		
Nivel	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento	Muestreo Final
Temperaturas (T)			
Ambiente	4.49 a ^z	4.62 c	5.53 a
7 °C	4.49 a	5.19 c	5.16 a
2 °C	4.49 a	8.34 b	4.71 a
0 °C	4.49 a	12.78 a	---
DMSH	0.81	2.82	0.84
Variedad (V)			
Red Elf	4.17 a	6.18 b	5.07 a
Cinnamon Star	4.11 a	7.89 ab	5.16 a
Da Vinci	4.19 a	9.12 a	5.18 a
DMSH	0.73	3.22	0.76
T x V	ns	ns	*

^z: Medias dentro de cada factor en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

4.2. EXPERIMENTO 2.

4.2.1. DAÑO POR FRÍO.

4.2.1.1. COLOR.

4.2.1.1.1. LUMINOSIDAD.

Los valores de luminosidad de las variedades de nochebuena bajo condiciones de bajas temperaturas fueron similares (Figura 35). Las plantas bajo 7 y 0 °C fueron afectadas significativamente después del tratamiento, mientras que las de ambiente y 7 °C no lo fueron.

Este componente de color fue afectado significativamente por la temperatura de exposición (T) después del tratamiento ($P \leq 0.05$), de igual manera que el factor variedad (V); además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 19). De manera general, la tendencia en todas las temperaturas de exposición después del tratamiento fue similar, en donde la luminosidad aumentó ligeramente.

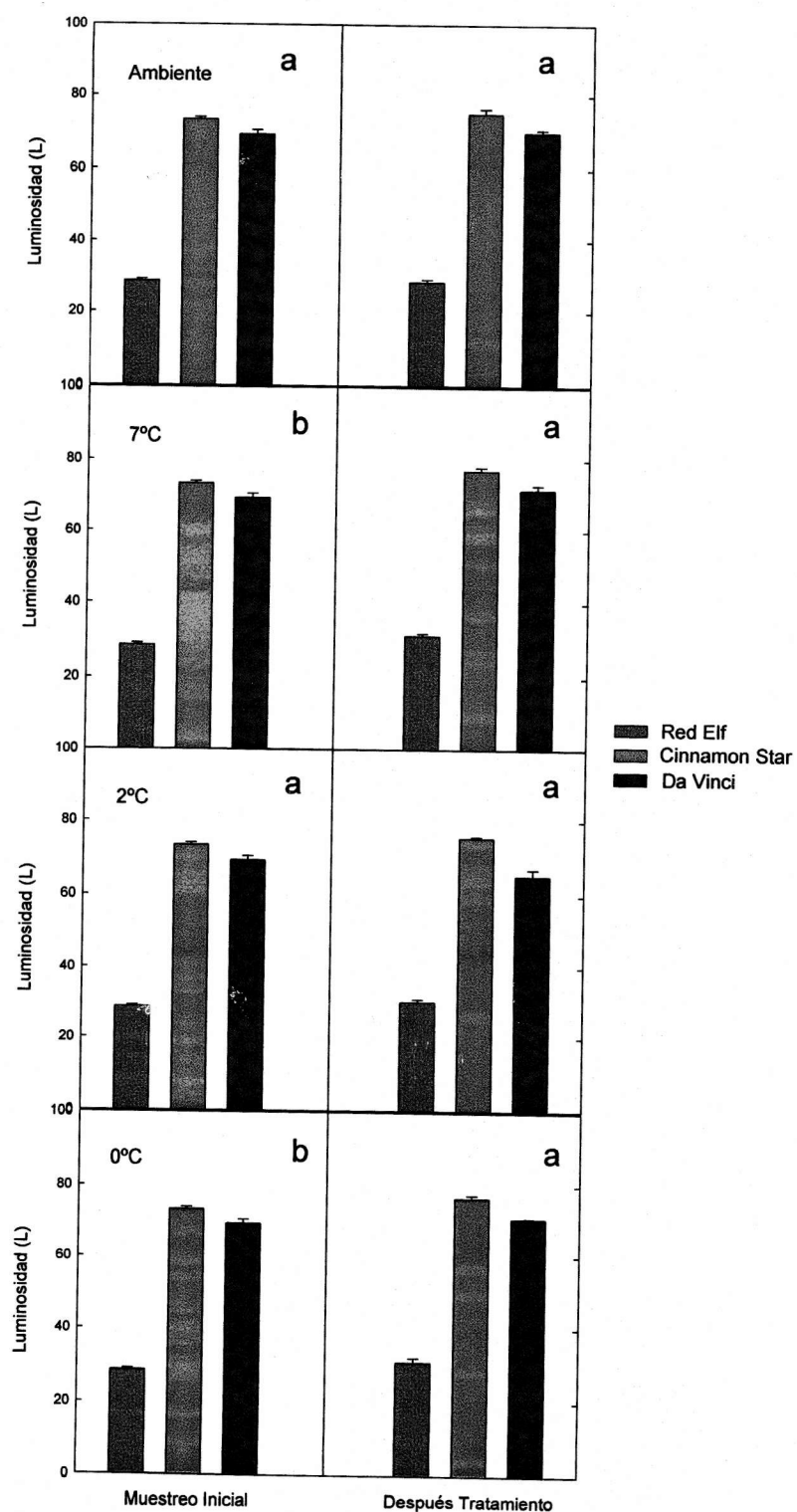


Figura 35. Comportamiento de la luminosidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud estadística

(Tukey; 0.05). DMSH 1.62, 1.61, 1.72 y 1.53 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 19. Comportamiento de la luminosidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor Nivel	Luminosidad (L)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Temperaturas (T)		
Ambiente	57.02 a ^z	57.70 ab
7 °C	57.02 a	59.94 a
2 °C	57.02 a	56.91 b
0 °C	57.02 a	59.39 a
DMSH	1.83	2.37
Variedad (V)		
Red Elf	28.61 c	30.16 c
Cinnamon Star	73.24 a	75.92 a
Da Vinci	69.20 b	69.37 b
DMSH	1.44	1.86
T x V	ns	ns

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

Todas las variedades en ambas fechas de muestreo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) siendo Cinnamon Star la que tuvo el valor más alto en cuanto a luminosidad que el resto de las variedades. Todas las variedades mostraron una mayor luminosidad después de ser expuestos a su respectivo tratamiento. Estos valores indican una coloración más clara o el inicio de manchas blancas del tejido por efecto de daño por frío (Lyons, 1973; Mackersie y Leshem, 1994). Gallego *et al.* (2003) en un trabajo realizado con *Eugenia stipitata* L. almacenada a 7 °C durante 20 días reportaron un incremento en el valor de luminosidad.

4.2.1.1.2. CROMATICIDAD.

El valor de cromaticidad en las variedades de nochebuena bajo condiciones de bajas temperaturas fue similar (Figura 36). La cromaticidad no fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) antes y después del tratamiento, solamente el factor variedad (V) mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$); además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 20). La cromaticidad en todas las temperaturas de exposición después del tratamiento se mantuvo igual que antes del tratamiento con baja temperatura.

Todas las variedades en ambas fechas de muestreo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) siendo Red Elf el que tuvo el valor más alto en cuanto a este componente del color. Todas las variedades mantuvieron su valor de cromaticidad aún después de ser expuestos a las bajas temperaturas. El incremento de la cromaticidad se ha reportado como un efecto de la baja temperatura en *Eugenia stipitata* L. expuesta a 7 °C durante 20 días (Gallego *et al.*, 2003). De igual manera en *Citrus aurantifolia* (lima) almacenada a 5 y 10 °C durante 30 a 60 días se observó un incremento de los valores de cromaticidad (Kluge *et al.*, 2003). En el presente estudio no se vio un incremento significativo posiblemente causado por el tiempo de exposición a frío (solo 72 horas).

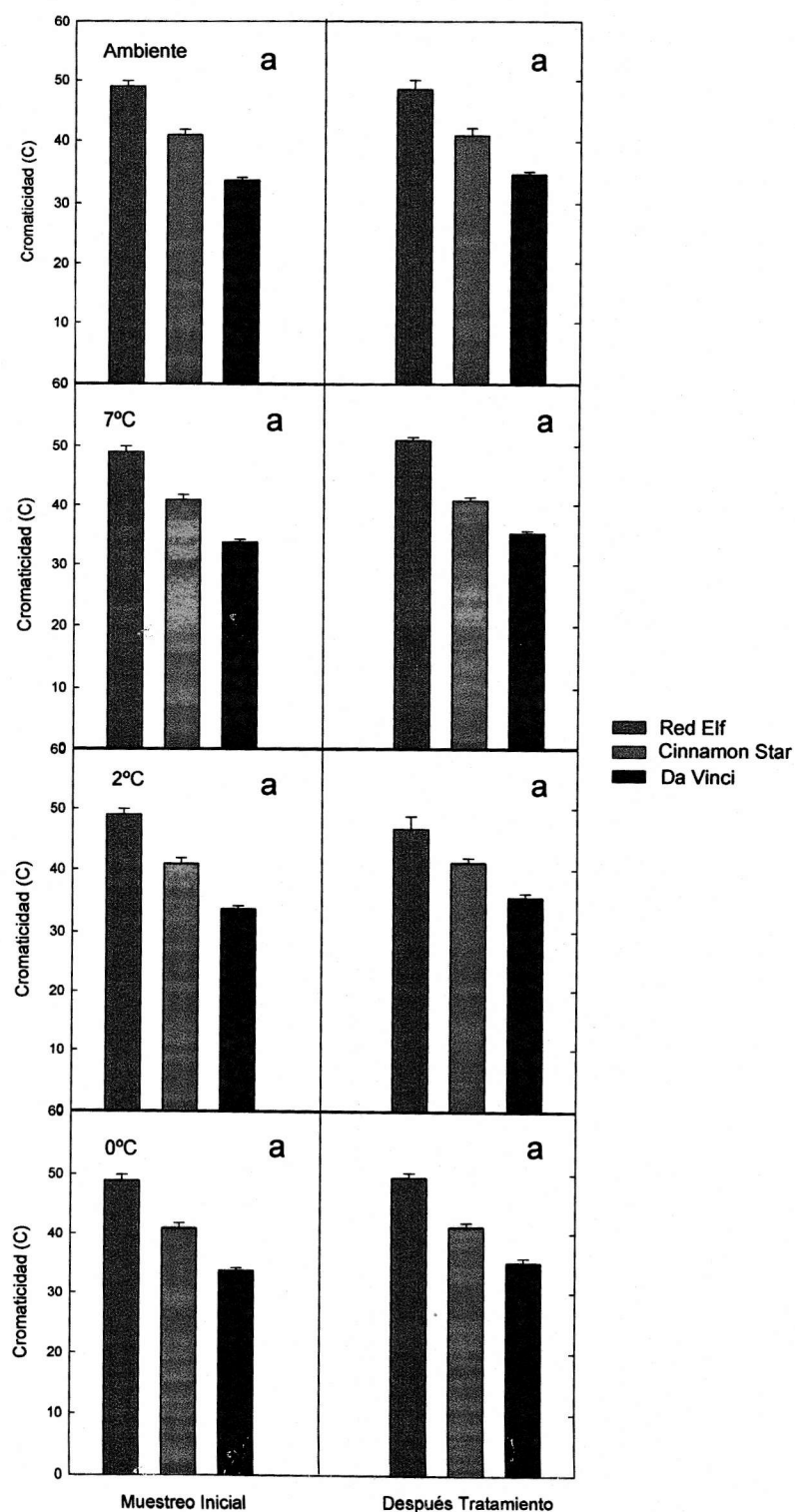


Figura 36. Comportamiento de la cromaticidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud estadística

(Tukey; 0.05). DMSH 1.67, 1.36, 1.8 y 1.47 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 20. Comportamiento de la cromaticidad en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor Nivel	Cromaticidad (C)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Temperaturas (T)		
Ambiente	41.17 a ^z	41.37 a
7 °C	41.17 a	42.25 a
2 °C	41.17 a	41.11 a
0 °C	41.17 a	41.85 a
DMSH	1.82	2.24
Variedad (V)		
Red Elf	48.94 a	48.85 a
Cinnamon Star	40.88 b	40.96 b
Da Vinci	33.68 c	35.13 c
DMSH	1.43	1.76
T x V	ns	ns

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

4.2.1.1.3. ÁNGULO DE MATÍZ (°HUE).

El tono o color verdadero de las plantas de nochebuena bajo condiciones de bajas temperaturas fue similar (Figura 37). El °Hue no fue afectado significativamente por la temperatura de exposición (T) antes y después del tratamiento, solamente el factor variedad (V) mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$); además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 21). El tono en todas las temperaturas de exposición aumentó ligeramente después de ser expuestas a su respectiva temperatura.

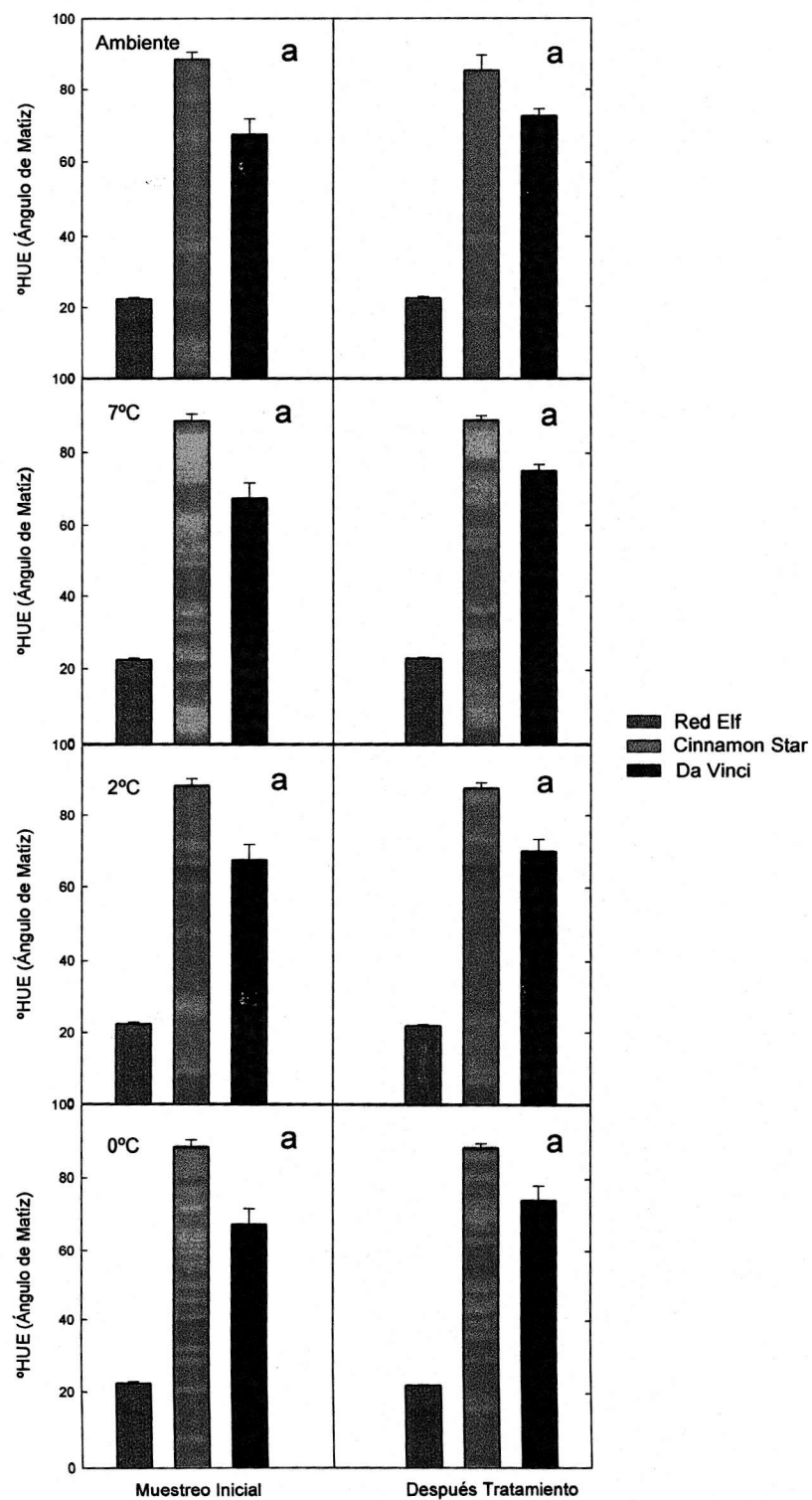


Figura 37. Comportamiento del ángulo de matiz en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha

de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud estadística (Tukey; 0.05). DMSH 4.84, 4.27, 4.57 y 4.69 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 21. Comportamiento del ángulo de matiz en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Ángulo de Matiz (°HUE)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Temperaturas (T)		
Ambiente	59.43 a ^z	60.14 a
7 °C	59.43 a	62.31 a
2 °C	59.43 a	59.85 a
0 °C	59.43 a	61.58 a
DMSH	5.94	4.86
Variedad (V)		
Red Elf	22.40 c	22.40 c
Cinnamon Star	88.42 a	87.50 a
Da Vinci	67.45 b	73.01 b
DMSH	4.68	3.82
T x V	ns	ns

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

Todas las variedades en ambas fechas de muestreo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) siendo Cinnamon Star el que tuvo el valor más alto en cuanto a este componente del color que el resto de las variedades. De manera general, las plantas de todas las variedades mantuvieron su valor de °Hue aún después de ser expuestas a baja temperatura. El cambio en coloración (incremento de hue) indica una respuesta a las bajas temperaturas (Lyons, 1973; Mackersie y Leshem, 1994) y este comportamiento representa un ligero cambio de color del rojo a un color más claro, como el amarillo y cuando es muy severo se generan manchas blancas (Nell y Barrett, 1986; Anónimo, 2002). Esto se puede observar de mejor manera en las siguientes imágenes:

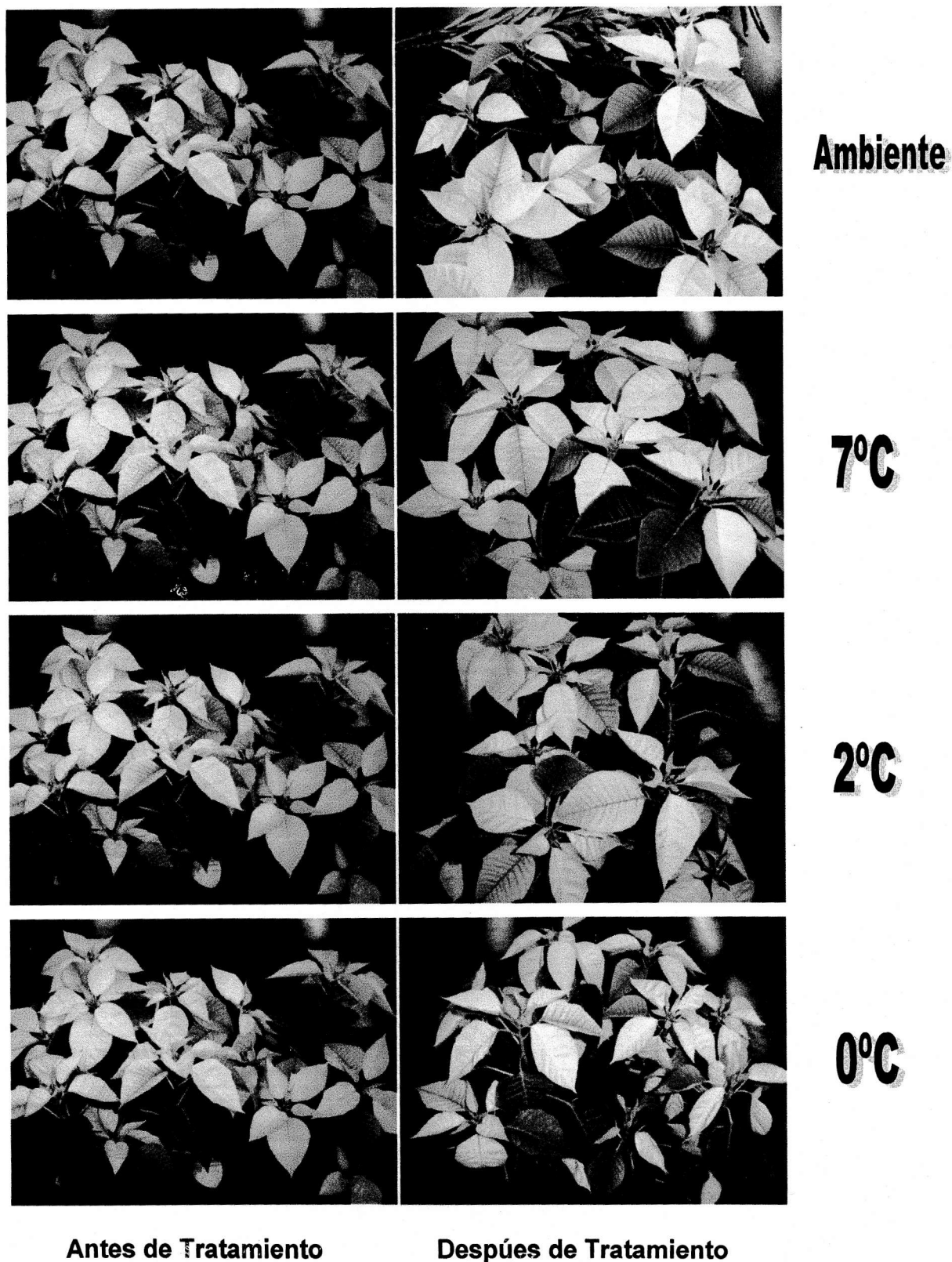


Figura 38. Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Cinnamon Star expuesta a varias temperaturas.

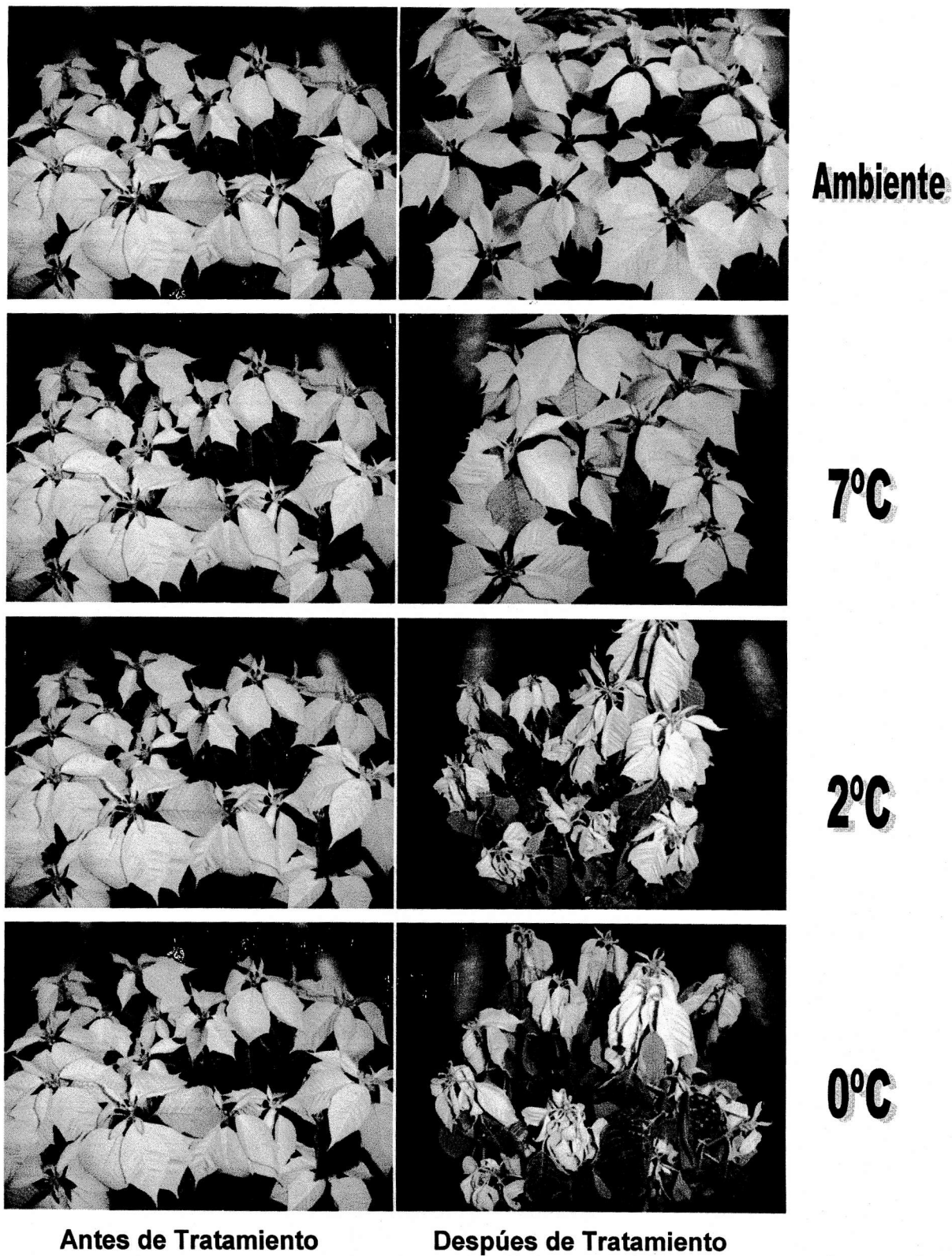


Figura 39. Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Da Vinci expuesta a varias temperaturas.

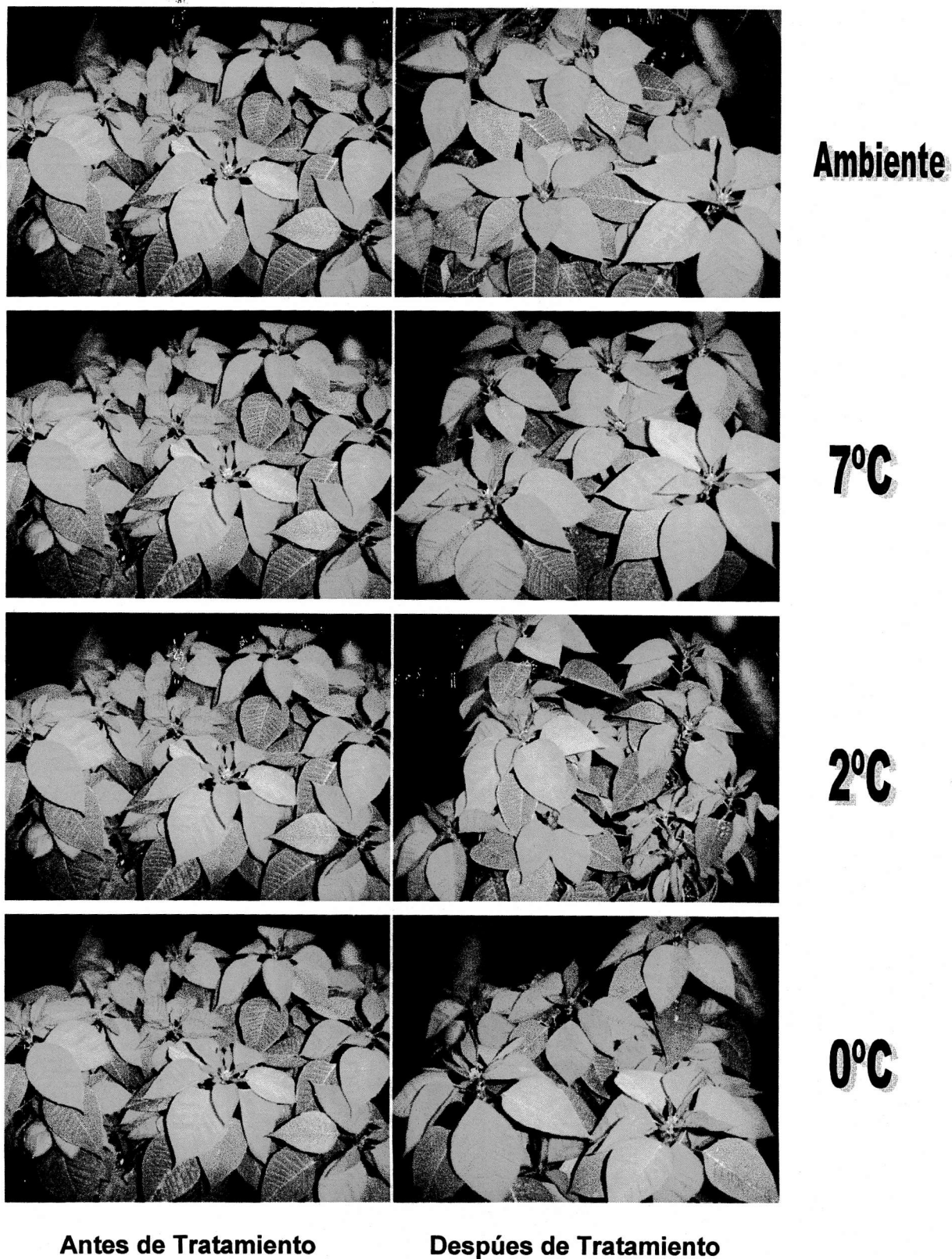


Figura 40. Cambio de color y síntomas de daño por frío en la variedad Red Elf expuesta a varias temperaturas.

4.2.1.2. CHALCONA ISOMERASA.

La actividad enzimática de la chalcona isomerasa en las variedades de nochebuena bajo condiciones de almacenamiento a 2 y 0 °C fue afectada por dichas condiciones (Figura 41). La actividad de la CHI fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) después del tratamiento ($P \leq 0.05$), de igual manera que el factor variedad (V); además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 22). De manera general, se observó una tendencia similar en todas las temperaturas de exposición a frío después del tratamiento, incrementándose gradualmente según a la temperatura que se colocaron las plantas de nochebuena. A menor temperatura de exposición a frío se observó una mayor actividad enzimática, mostrando diferencia significativa entre las mismas ($P \leq 0.05$). Las variedades expuestas a 0 °C mostraron una actividad casi cinco veces mayor que bajo condiciones de ambiente.

Antes de someter las variedades a las diferentes temperaturas de exposición se observó diferencia significativa en la actividad enzimática entre estas ($P \leq 0.05$), Cinnamon Star presentó una mayor actividad que el resto de las variedades. Después del tratamiento de frío respectivo, las variedades no mostraron diferencia significativa, pero si se observó un aumento en la actividad enzimática con respecto a antes de ser expuestas a frío.

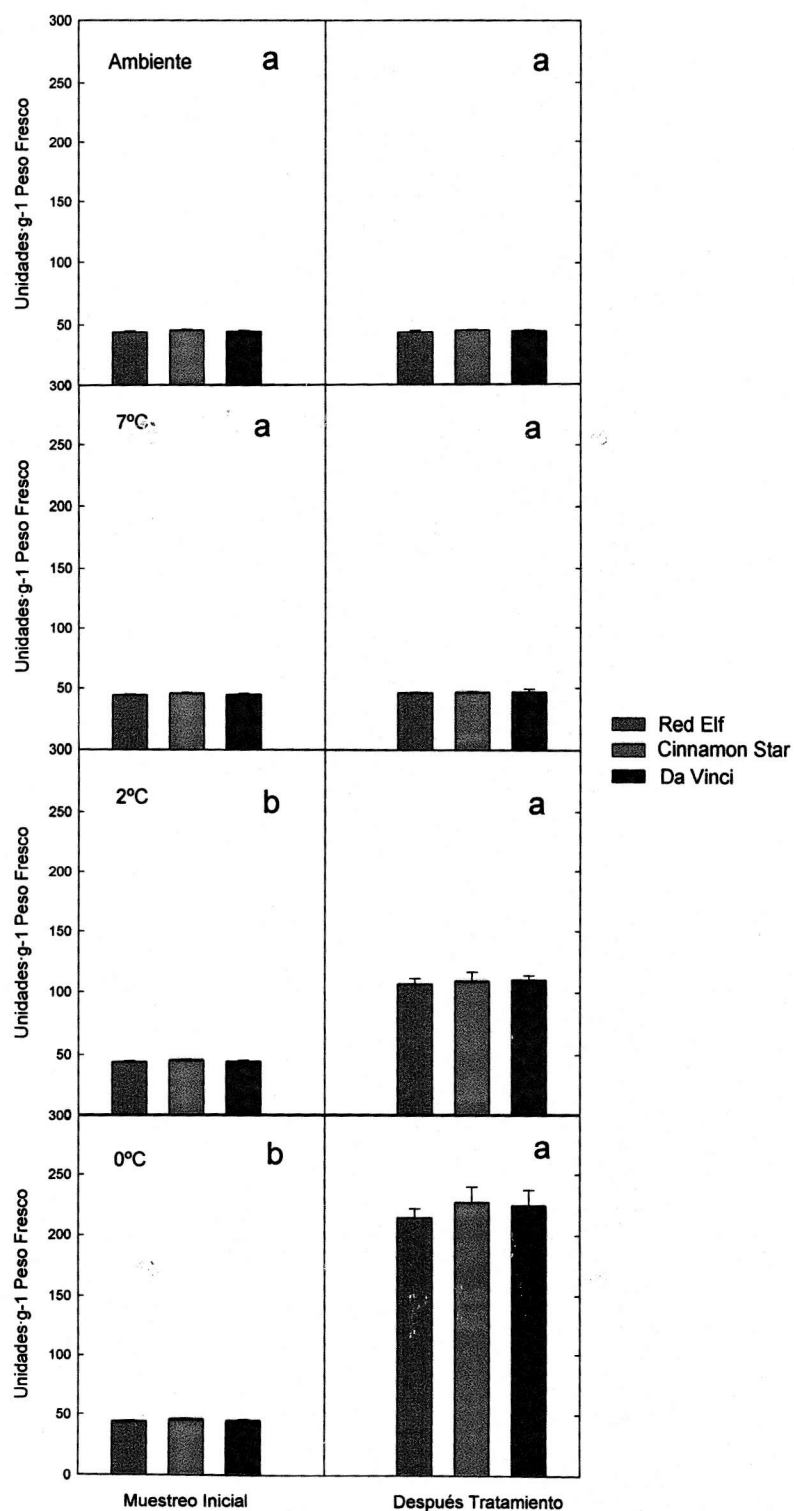


Figura 41. Comportamiento de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de

exposición indican similitud estadística (Tukey; 0.05). DMSH 1.43, 1.86, 5.25 y 10.77 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 22. Comportamiento de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Actividad enzimática CHI (Unidades g ⁻¹ de peso fresco)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Temperaturas (T)		
Ambiente	44.82 a ^z	44.86 c
7 °C	44.82 a	46.26 c
2 °C	44.82 a	108.55 b
0 °C	44.82 a	221.86 a
DMSH	1.57	14.03
Variedad (V)		
Red Elf	44.21 b	102.77 a
Cinnamon Star	45.61 a	107.00 a
Da Vinci	44.65 ab	106.37 a
DMSH	1.23	11.03
T x V	ns	ns

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

Numerosos genes agrupados bajo procesos de biosíntesis de los fenilpropanoides/flavonoides fueron inducidos por el tratamiento con bajas temperaturas. Mehrtens *et al.*, (2005), encontraron que siete genes inducidos por frío codificaron para enzimas clave en los pasos principales en la ruta biosintética de los flavonoides, dentro de ellas se encuentra la chalcona isomerasa.

4.2.1.3. RESPIRACIÓN.

La producción de CO₂ en las plantas de nochebuena bajo condiciones de bajas temperaturas mostró una disminución (Figura 42). La respiración de las variedades analizadas no fue afectada significativamente antes y después del tratamiento en las diferentes temperaturas de exposición (T), solamente el factor variedad (V) mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) antes de someter los diversos cultivares a las bajas temperaturas; además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 23). La respiración en todas las temperaturas de exposición disminuyó después de ser expuestas a su respectiva temperatura.

Antes de someter las variedades a las diferentes temperaturas de exposición se observó que Cinnamon Star presentó una mayor respiración que el resto de las variedades. Después del tratamiento respectivo, las variedades no mostraron diferencia significativa, pero si una disminución en su tasa respiratoria con respecto a antes del tratamiento.

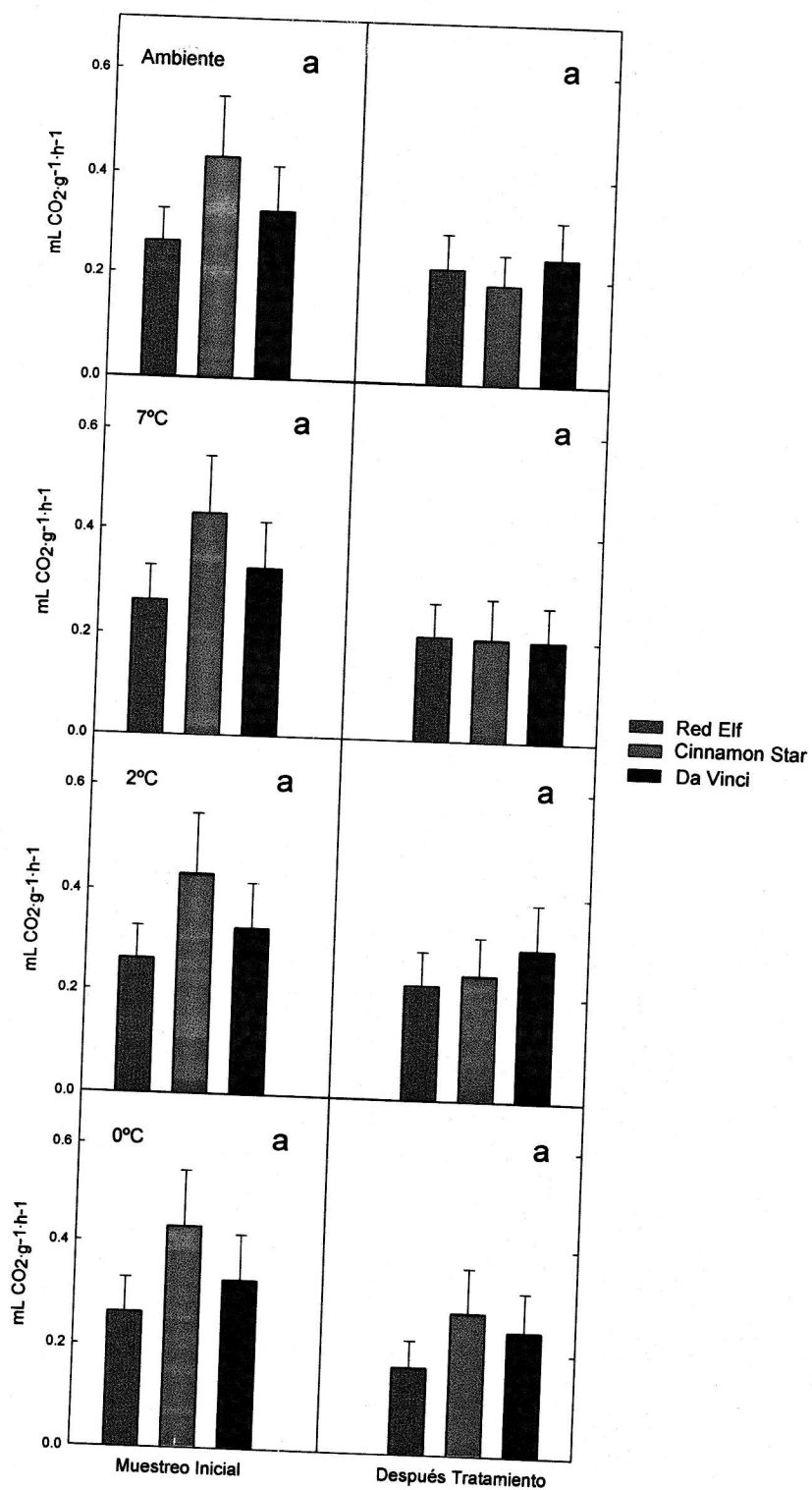


Figura 42. Comportamiento de la respiración en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud estadística

(Tukey; 0.05). DMSH 0.14, 0.14, 0.15 y 0.14 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 23. Comportamiento de la respiración en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor Nivel	Respiración (mL CO ₂ g ⁻¹ h ⁻¹)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Temperaturas (T)		
Ambiente	0.3397 a ^z	0.2169 a
7 °C	0.3397 a	0.2036 a
2 °C	0.3397 a	0.2540 a
0 °C	0.3397 a	0.2298 a
DMSH	0.1972	0.1562
Variedad (V)		
Red Elf	0.2623 b	0.2044 a
Cinnamon Star	0.4310 a	0.2282 a
Da Vinci	0.3257 ab	0.2456 a
DMSH	0.1555	0.1231
T x V	ns	ns

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

Joyce *et al.* (2000) mencionan que una disminución en la tasa de respiración en *Grevillea* spp. se debe a una exposición a baja temperatura por corto tiempo, ya que después ésta se puede incrementar, seguido de síntomas externos visibles. Además Lyons (1973) menciona que cuando hojas de pepino se exponen a temperaturas bajas la respiración disminuye, pero cuando éstas son llevadas a temperaturas más cálidas la respiración se incrementa.

4.2.1.4. PRODUCCIÓN DE ETILENO.

El comportamiento de esta variable fue similar al obtenido para respiración, las plantas analizadas no fueron afectadas significativamente antes y después del

tratamiento de frío en las diferentes temperaturas de exposición (T), solamente el factor variedad (V) mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) antes de someter los diversos cultivares a las temperaturas de exposición a frío; además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 24). La producción de etileno en todas las temperaturas de exposición aumentó después de ser expuestas a su tratamiento respectivo (Figura 43).

Antes de someter los cultivares a las diferentes temperaturas de exposición se observó de igual manera que en la respiración, que para el Cinnamon Star se obtuvo una mayor producción de etileno que para el resto de las variedades, mostrando diferencias entre ellas. Después del tratamiento de frío respectivo, ninguna variedad mostró diferencia significativa, pero si se observó un aumento en su producción de etileno con respecto a antes de ser expuestas a frío. La producción de etileno es uno de los indicativos de daño por bajas temperaturas (Lyons, 1973; Druege, 2006). El inicio en la producción de etileno como efecto de daños por bajas temperaturas, depende de la sensibilidad de la plantas a este tipo de estrés. Puede variar desde una hora en plantas tropicales sensibles como *Episcia reptans*, hasta varios días como el pepino. *Passiflora edulis* L. presenta un incremento en la producción de etileno después de cuatro días a una temperatura de 0 °C (Yi y Patterson, 1985).

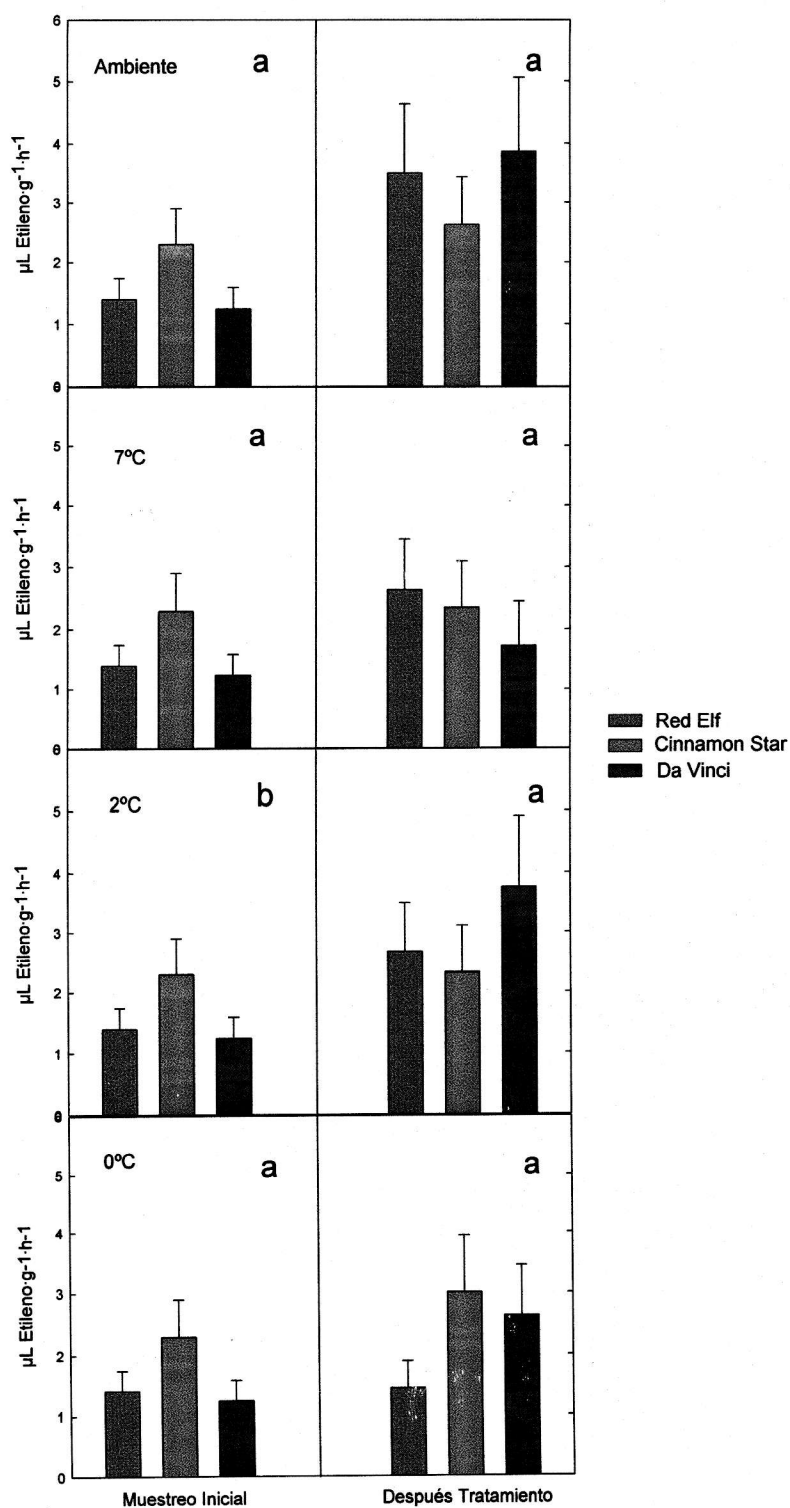


Figura 43. Comportamiento de la producción de etileno en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud

estadística (Tukey; 0.05). DMSH 1.18, 0.96, 1.09 y 0.96 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 24. Comportamiento de la producción de etileno en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Etileno ($\mu\text{L Etileno g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Nivel		
Temperaturas (T)		
Ambiente	1.6413 a ^z	3.3293 a
7 °C	1.6413 a	2.2379 a
2 °C	1.6413 a	2.9155 a
0 °C	1.6413 a	2.3562 a
DMSH	0.9608	1.9186
Variedad (V)		
Red Elf	1.3933 b	2.5587 a
Cinnamon Star	2.2947 a	2.5748 a
Da Vinci	1.2361 b	2.9958 a
DMSH	0.7576	1.5111
T x V	ns	ns

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

4.2.2. ESTRÉS OXIDATIVO.

4.2.2.1. ASCORBATO PEROXIDASA (APX).

La actividad enzimática fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) después del tratamiento, y para el factor variedad (V) hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) antes de someter las plantas a bajas temperaturas; además la interacción T x V fue significativa (Cuadro 25). La actividad de esta enzima disminuyó a 2, 0 °C y ambiente, mientras que a 7 °C aumentó ligeramente (Figura 44).

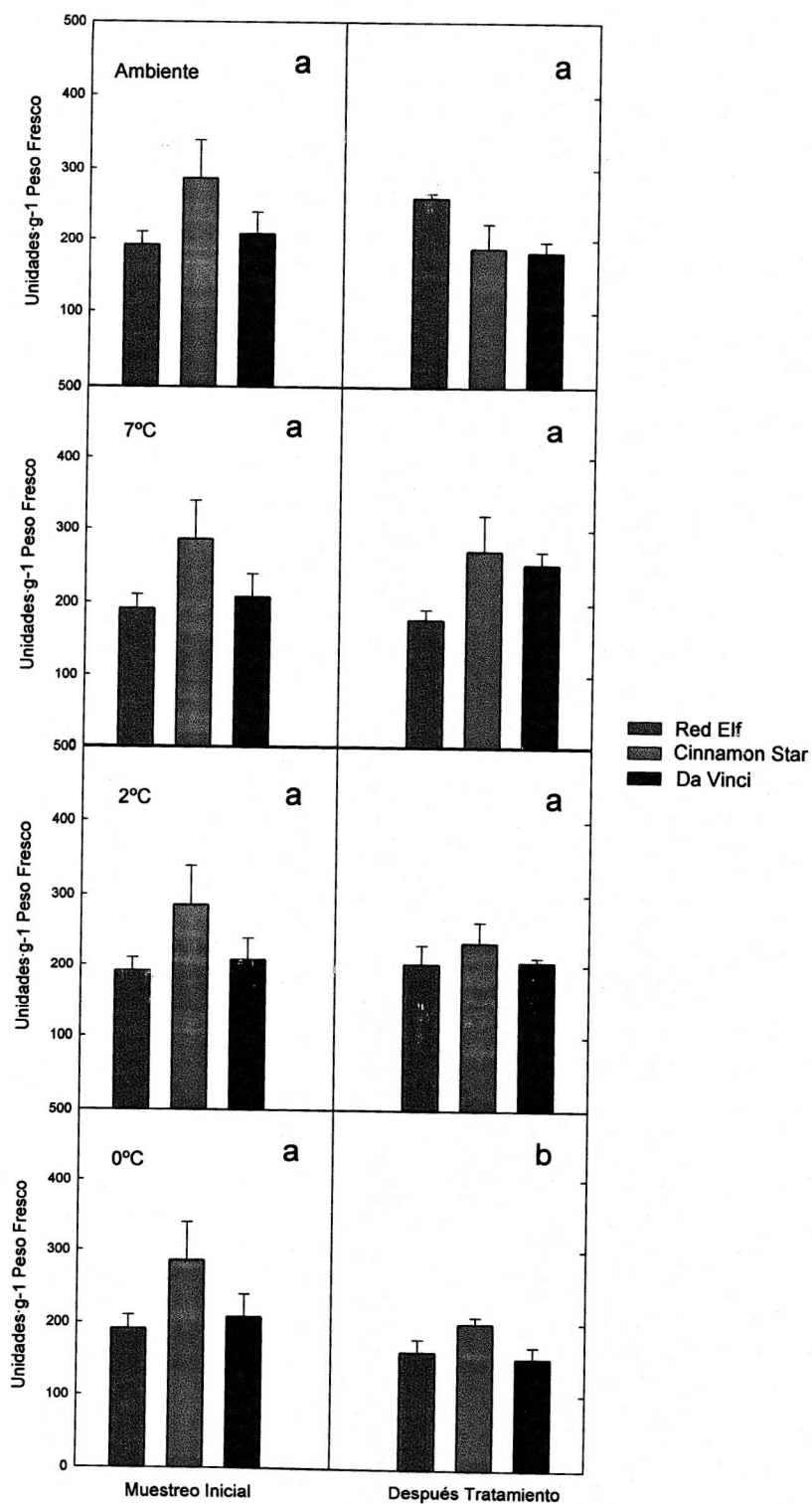


Figura 44. Comportamiento de la actividad de la ascorbato peroxidasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de

exposición indican similitud estadística (Tukey; 0.05). DMSH 59.54, 62.84, 59.96 y 57.34 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 25. Comportamiento de la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Actividad enzimática APX (Unidades g ⁻¹ de peso fresco)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Temperaturas (T)		
Ambiente	228.33 a ^z	209.38 ab
7 °C	228.33 a	233.87 a
2 °C	228.33 a	213.31 ab
0 °C	228.33 a	170.59 b
DMSH	80.52	52.44
Variedad (V)		
Red Elf	191.64 b	199.79 a
Cinnamon Star	285.77 a	222.67 a
Da Vinci	207.57 b	197.90 a
DMSH	63.42	41.22
T x V	ns	*

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

Antes de someter las variedades a los diferentes tratamientos se observó diferencia significativa en la actividad enzimática entre ellos ($P \leq 0.05$), Cinnamon Star presentó una mayor actividad. Después del tratamiento de baja temperatura, las variedades no mostraron diferencia significativa, pero si se observó que en Red Elf aumentó la actividad enzimática y en Cinnamon Star y Da Vinci se observó una disminución en la actividad con respecto a antes de ser expuestas a frío. La interacción T x V se presentó una vez que las variedades se sometieron a las diferentes temperaturas, esto indica que la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa es influenciada por dicha

exposición a frío. Cambios mediados por el estrés en la abundancia de un transcripto en particular no siempre se correlaciona con los cambios correspondientes en el nivel de proteína antioxidante y/o actividades enzimáticas (Mittler y Zilinskas, 1994). Una baja actividad de la APX y catalasa en varias especies expuestas a estrés por frío muestran una tolerancia oxidativa o aclimatación en las mismas (Kuk *et al.*, 2003).

4.2.2.2. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).

La actividad enzimática fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) después del tratamiento, y el factor variedad (V) mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) antes y después de someter las plantas a bajas temperaturas; además la interacción T x V fue significativa (Cuadro 26). De manera general, la actividad de esta enzima disminuyó después de los tratamientos (Figura 45).

Antes de someter las variedades a las diferentes temperaturas se observó diferencia significativa en la actividad enzimática entre ellas ($P \leq 0.05$), Cinnamon Star presentó una mayor actividad que el resto de las variedades. Después del tratamiento de temperatura respectivo, Cinnamon Star y Da Vinci no mostraron diferencia significativa, pero si Red Elf. La actividad enzimática en todas las variedades disminuyó con respecto a antes de ser expuestas a frío.

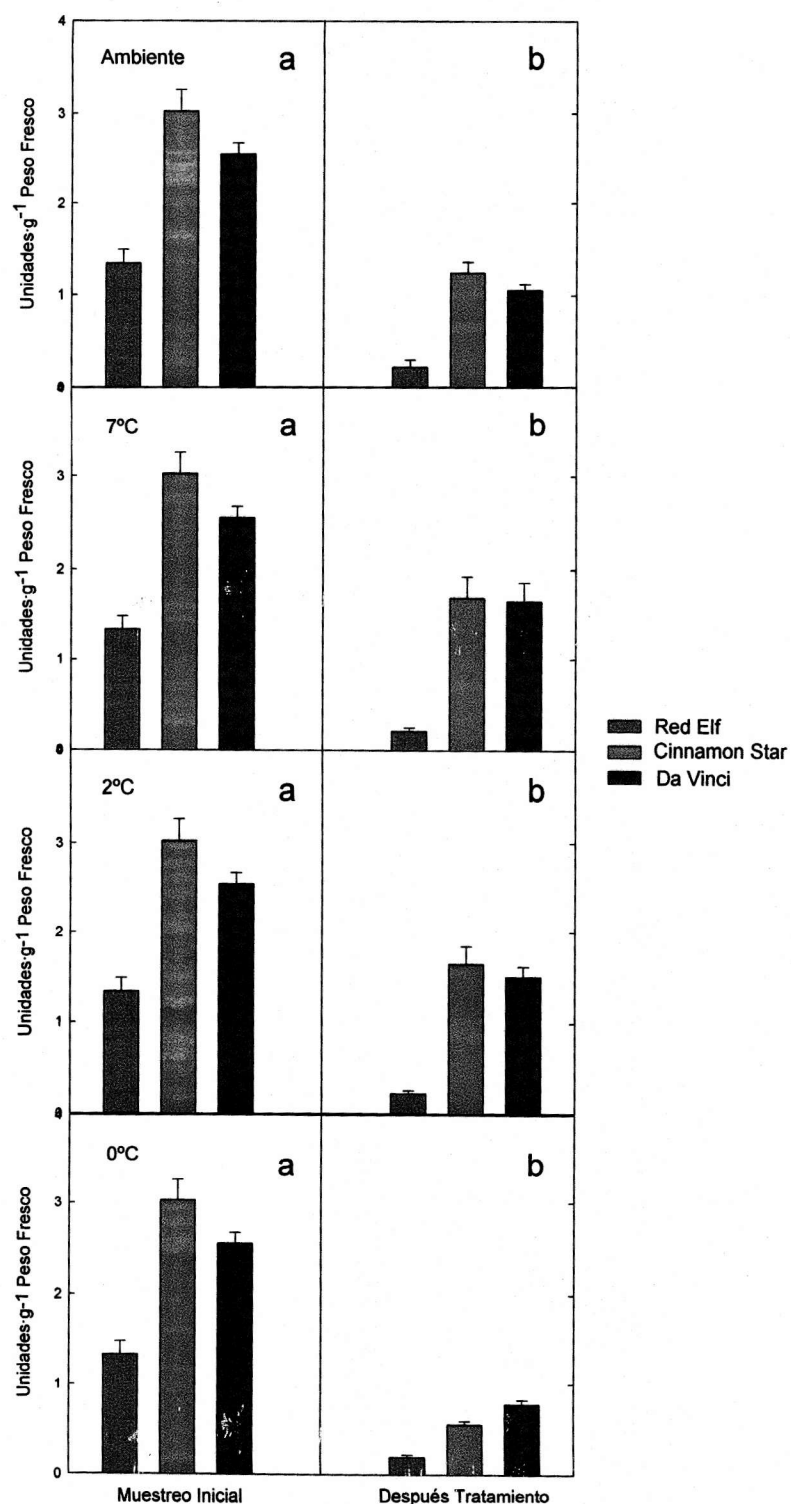


Figura 45. Comportamiento de la actividad de la superóxido dismutasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de

exposición indican similitud estadística (Tukey; 0.05). DMSH 0.27, 0.31, 0.29 y 0.26 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 26. Comportamiento de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Actividad enzimática SOD (Unidades g ⁻¹ de peso fresco)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Temperaturas (T)		
Ambiente	2.30 a ^z	0.83 b
7 °C	2.30 a	1.18 a
2 °C	2.30 a	1.12 a
0 °C	2.30 a	0.49 c
DMSH	0.38	0.27
Variedad (V)		
Red Elf	1.33 c	0.20 b
Cinnamon Star	3.02 a	1.27 a
Da Vinci	2.54 b	1.24 a
DMSH	0.30	0.21
T x V	ns	**

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

De igual manera que en la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa, la interacción T x V se presentó después de los tratamientos de temperatura, esto indica que la actividad enzimática de la superóxido dismutasa también es influenciada por las bajas temperaturas. De la misma manera que la APX, las SOD está asociada con la tolerancia al estrés porque neutraliza la reactividad del O₂⁻ el cual es sobre producido bajo dicha circunstancia (Bowler *et al.*, 1994). Una baja actividad de las enzimas oxidativas bajo daño por frío muestran una tolerancia oxidativa o aclimatación de las especies (Kuk *et al.*, 2003).

4.2.2.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

La peroxidación de lípidos no fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) antes y después del tratamiento ($P \leq 0.05$), de igual manera que el factor variedad (V) después de ser expuestos a temperaturas de frío; además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 27). De manera general, la peroxidación en todas las temperaturas después de los tratamientos disminuyó ligeramente (Figura 46).

Antes de someter las variedades a las diferentes temperaturas de exposición se observó diferencia significativa en la actividad enzimática entre ellas ($P \leq 0.05$), siendo Red Elf la que tuvo una mayor peroxidación lipídica con respecto a las otras variedades. Después del tratamiento de frío respectivo, las variedades no mostraron diferencia significativa, pero en Cinnamon Star y Da Vinci se observó una ligera disminución en la peroxidación, mientras que en Red Elf aumentó. La peroxidación de lípidos es una forma de medir el daño celular bajo estrés por frío (Prasad *et al.*, 1994), por lo tanto si existe una baja peroxidación en especies con daño por frío significa que dicha especie es tolerante (Kuk *et al.*, 2003). Un signo temprano de inminente muerte celular en algunas formas de muerte celular programada en plantas es la generación de especies reactivas de oxígeno y de súper óxido (Jabs *et al.*, 1996).

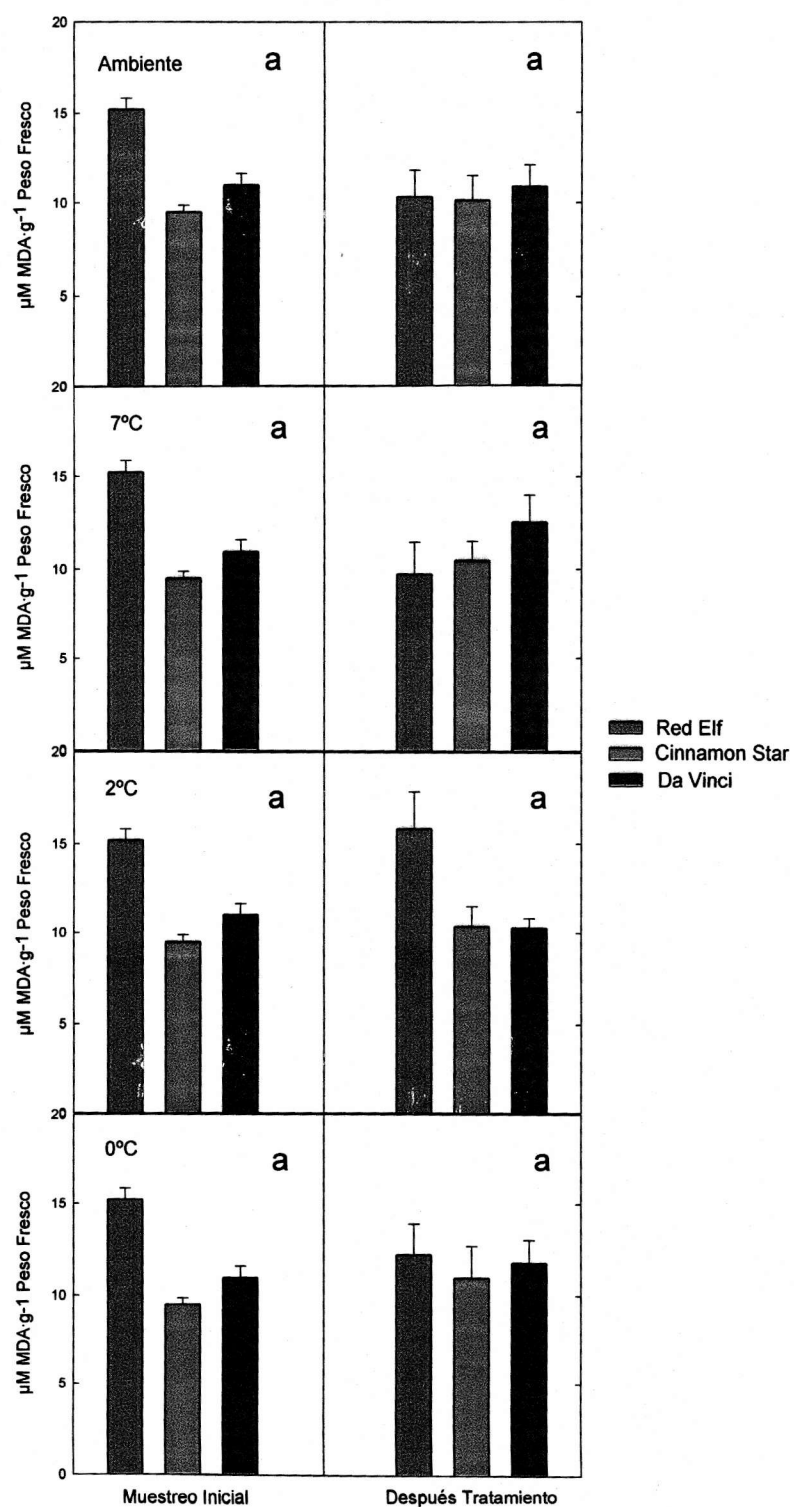


Figura 46. Comportamiento de la peroxidación lipídica en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud

estadística (Tukey; 0.05). DMSH 1.52, 1.60, 1.55 y 1.70 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

Cuadro 27. Comportamiento de la peroxidación lipídica en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Peroxidación lipídica (μM de MDA g^{-1} de peso fresco)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Nivel		
Temperaturas (T)		
Ambiente	11.89 a ^z	10.44 a
7 °C	11.89 a	10.92 a
2 °C	11.89 a	12.14 a
0 °C	11.89 a	11.69 a
DMSH	1.22	3.17
Variedad (V)		
Red Elf	15.22 a	12.03 a
Cinnamon Star	9.48 c	10.48 a
Da Vinci	10.97 b	11.39 a
DMSH	0.96	2.49
T x V	ns	ns

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

4.2.3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

4.2.3.1. FRAGMENTACIÓN DE ADN.

De igual forma que en el experimento uno, las muestras almacenadas en ultracongelador (-70 °C) sufrieron un aumento en la temperatura (0 °C) dado que el equipo sufrió una descompostura que hizo que las muestras se hidrolizaran y por lo tanto el ADN se fragmentó (Figura 47). Solamente en la muestra de la variedad Da Vinci expuesta a 2 °C se observó que la fragmentación fue parcial.

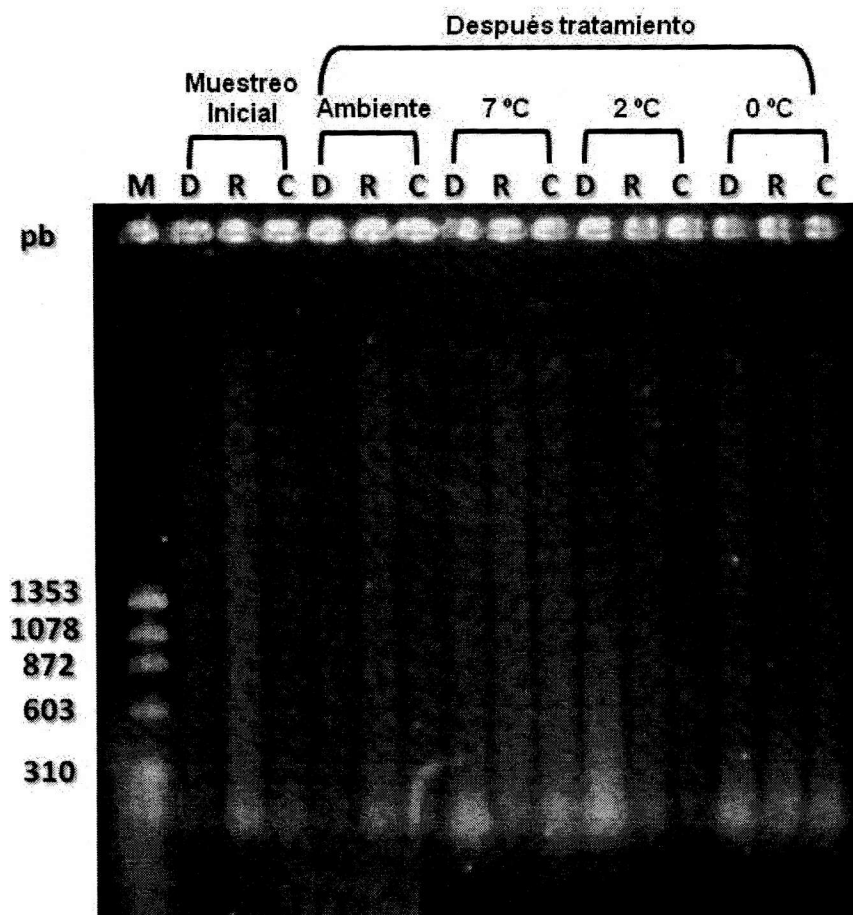


Figura 47. Fragmentación de ADN en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. M, marcador de peso molecular (Φ X174 DNA/*Hae* III. Promega). D, R y C; Da Vinci, Red Elf y Cinnamon Star, respectivamente.

Si no hubiese habido algún imprevisto con el equipo de almacenamiento se hubiera observado un patrón de bandeo uniforme, ya que el tiempo de almacenamiento a baja temperatura a la que las variedades de nochebuena fueron sometidos no se hubiera presentado la fragmentación, además de que se presentó una baja actividad enzimática de la proteasa (Figura 48). La exposición a baja temperatura (7 y 2 °C) de las variedades no hubiese afectado

a la fragmentación del ADN, solamente a 0 °C, ya que las plantas de nochebuena expuestas a esta temperatura posiblemente no hubiesen sobrevivido y se pudo haber observado una clara fragmentación. El pasar de un almacenamiento a -70 °C a uno de 0 °C hizo que las muestras presentaran una hidrolización y por lo tanto se pudo observar claramente como el daño por congelamiento fragmentó al ADN. Rayson y Heath (1996) en un estudio realizado con tejido congelado (-20 °C) de *Vigna unguiculata* y posteriormente dejado a temperatura ambiente por 5 minutos se observó la escalerilla característica de la fragmentación del ADN, tal y como sucedió en presente estudio. El daño por frío inducido es observado primeramente en el cloroplasto, por lo tanto se cree que la generación de ROS en el cloroplasto, inducida por condiciones que dan como resultado el retraso de la respuesta de las plantas al frío, incremento en los iones libres de calcio. El calcio libre puede estar envuelto en la fragmentación del ADN del cloroplasto y del núcleo, por acción de las endonucleasas que separan moléculas de ADN en fragmentos más cortos para ser más eficientes (Snedden y Fromm, 1998).

4.2.3.2. ACTIVIDAD DE LA PROTEASA.

La actividad proteolítica de esta enzima fue afectada significativamente por la temperatura de exposición (T) después del tratamiento ($P \leq 0.05$), pero no para el factor variedad (V); además la interacción T x V no fue significativa (Cuadro 28). De manera general, la tendencia en todas las temperaturas de exposición a frío después del tratamiento fue similar, incrementándose gradualmente según la temperatura a la que se colocaron las plantas de nochebuena (Figura 48). A

menor temperatura de exposición a frío se observó una mayor actividad enzimática, mostrando diferencia significativa entre las mismas ($P \leq 0.05$). Las variedades expuestas a 0°C mostraron una actividad mayor que con el resto de las temperaturas.

Antes de someter las variedades a las diferentes temperaturas de exposición se observó diferencia significativa en la actividad enzimática entre ellas ($P \leq 0.05$), Red Elf y Da Vinci presentaron una mayor actividad que Cinnamon Star. Después del tratamiento de frío respectivo, las variedades no mostraron diferencia significativa, pero si se observó un aumento al doble en la actividad enzimática con respecto a antes de ser expuestas a frío (Cuadro 28). Las proteasas hidrolizan proteínas por medio de la adición de agua entre los enlaces peptídicos, además catalizan la síntesis de péptidos en solventes orgánicos y en solventes con bajo contenido hídrico (Beg *et al.*, 2003). La sensibilidad al daño por frío de una planta puede deberse a la habilidad de algunas especies a aclimatarse al daño, influenciado por el tiempo y aparición del daño ultraestructural dando como resultado en bajo, moderado o severo (Kratsch y Wise, 2000).

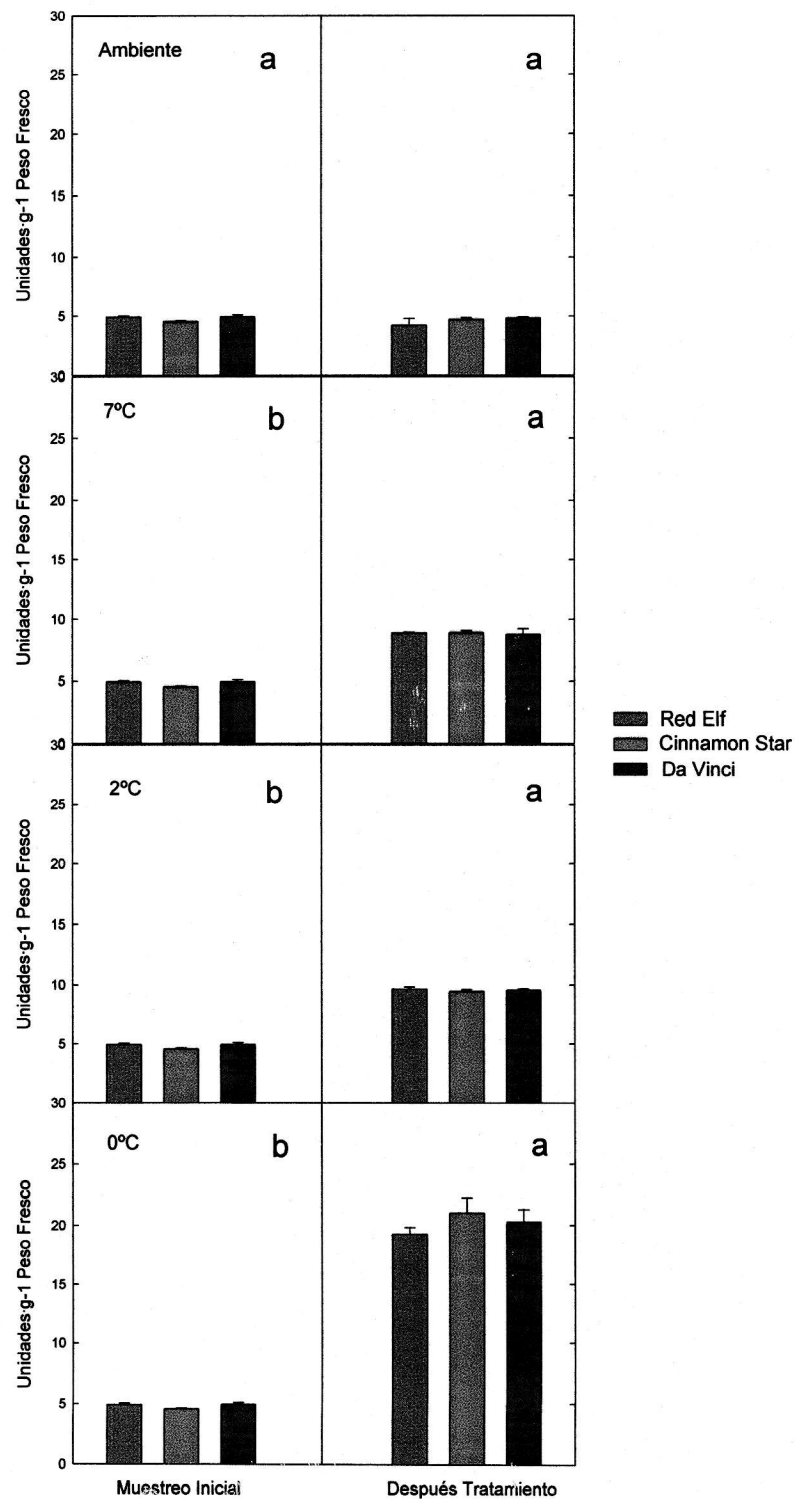


Figura 48. Comportamiento de la actividad de la proteasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas. Letras iguales por fecha de muestreo en cada temperatura de exposición indican similitud

estadística (Tukey; 0.05). DMSH 0.39, 0.35, 0.25 y 0.95 correspondiente a Ambiente, 7, 2 y 0 °C, respectivamente.

El daño por frío inducido es observado primeramente en el cloroplasto, por lo tanto se cree que la generación de ROS en el cloroplasto, inducida por condiciones que dan como resultado el incremento en los iones libres de calcio. Los iones libres de Ca^{2+} inducen cambios en la fosforilación de proteínas y actúan como mensajeros secundarios para estimular una variedad de procesos (Snedden y Fromm, 1998), incluyendo una cascada de enzimas proteolíticas (como las Caspasas) que separan selectivamente proteínas celulares clave.

Cuadro 28. Comportamiento de la actividad enzimática de la proteasa en plantas de tres variedades de nochebuena expuestas a diferentes temperaturas.

Factor	Actividad enzimática Proteasa (Unidades g^{-1} de peso fresco)	
	Antes de Tratamiento	Después de Tratamiento
Nivel		
Temperaturas (T)		
Ambiente	4.79 a ^z	4.59 c
7 °C	4.79 a	8.83 b
2 °C	4.79 a	9.55 b
0 °C	4.79 a	20.17 a
DMSH	0.30	1.21
Variedad (V)		
Red Elf	4.92 a	10.50 a
Cinnamon Star	4.53 b	11.00 a
Da Vinci	4.93 a	10.85 a
DMSH	0.23	0.95
T x V	ns	ns

^z: Medias dentro de cada nivel en el sentido de las columnas por fecha de muestreo indican similitud estadística (Tukey; 0.05).

4.3. EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA A FRÍO.

Mediante la técnica de Hibridación Sustrativa y Supresora (SSH) se obtuvieron los ADNc's de las plantas de nochebuena variedad Da Vinci expuestas a baja temperatura (0°C) (Figura 49).

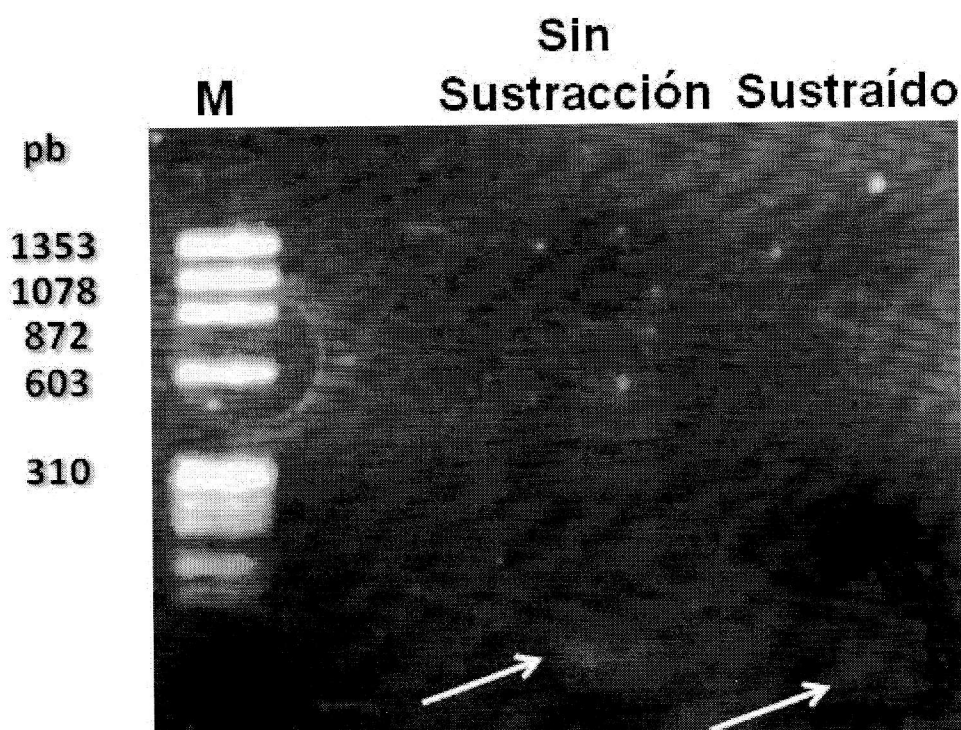


Figura 49. Eficiencia de sustracción y análisis de productos secundarios de PCR. M, marcador de peso molecular (Φ X174 DNA/*Hae* III. Promega). Las flechas indican que la SSH fue exitosa. Sin Sustracción: ADNc control; Sustraído: ADNc de la variedad Da Vinci expuesto a baja temperatura.

Una vez obtenidos los productos de PCR de la SSH se realizó la transformación y clonación, en las que se obtuvieron 3 colonias blancas que contenían el inserto ó gen que se sobre-expresa bajo exposición a frío en la variedad Da Vinci (Figura 50).

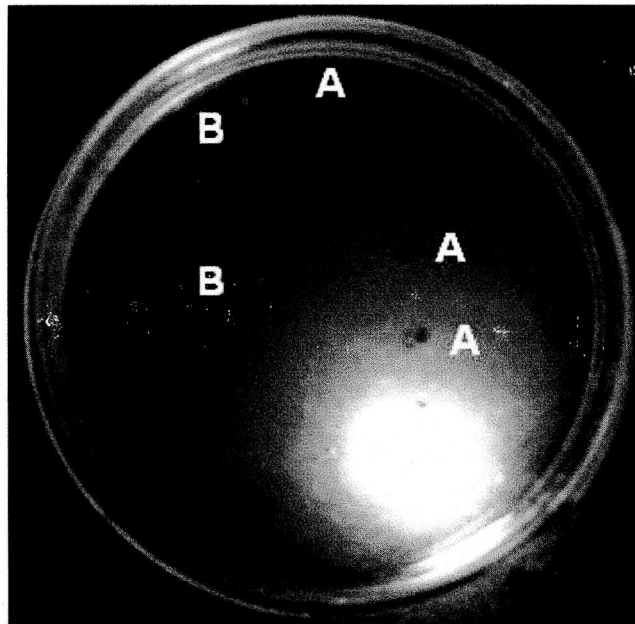


Figura 50. Transformación de colonias de la librería sustraída. Las colonias crecieron en medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal. A, colonias azules (sin inserto). B, colonias blancas (con inserto).

Finalmente se liberaron los insertos del plásmido mediante digestión con enzima de restricción (Figura 51).

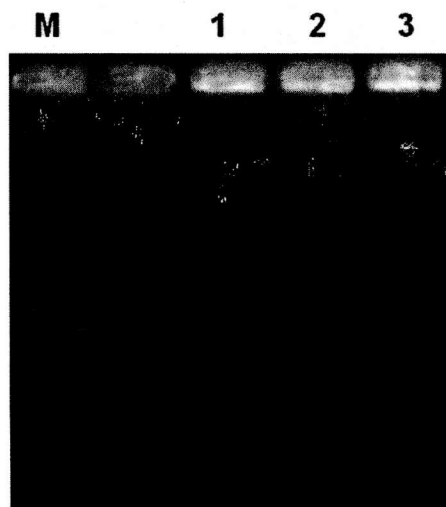


Figura 51. Digestión con enzima de restricción *EcoR* I de ADN de plásmido de los insertos obtenidos. M, marcador de peso molecular (1kb. Promega). 1,2 y 3,

ADN digerido de los insertos obtenidos de la variedad Da Vinci expuesta a baja temperatura.

Kim *et al.* (2004) encontraron 3 genes ribosomales (*GmRPS13*, *GmRPS6* y *GmRPS37*) inducidos por baja temperatura en soya. La expresión de estos genes comenzó a incrementarse a los 3 días después de ser tratadas las plantas de soya con baja temperatura y concluyen que la inducción de estos genes podría aumentar el proceso de traducción o ayudar a que el ribosoma funcione bajo condiciones de baja temperatura.

Por otra parte, Min-Ming Sun *et al.* (2007) realizaron un estudio de genes expresados diferencialmente bajo aclimatación a frío en *Physcomitrella patens* y mejoraron la tolerancia a congelamiento, además de elucidar rutas mediante AFLP's con ADNc y SSH. Se encontraron 510 EST's expresados diferencialmente bajo condiciones de frío que fueron clasificados en base a su función: procesos biológicos (135 EST's), componentes celulares (94 EST's) y procesos moleculares (140 EST's), el resto de los 141 EST's no se tiene reportado la función específica que realiza.

V. CONCLUSIONES

Experimento 1.

- ✓ Las enzimas oxidativas tuvieron una disminución en su actividad ofreciendo una tolerancia oxidativa a las variedades expuestas a baja temperatura.
- ✓ La peroxidación lipídica aumentó después de que las variedades fueron sometidas a baja temperatura.
- ✓ La exposición de las variedades de nochebuena a baja temperatura incrementa la actividad enzimática de la proteasa.
- ✓ Una exposición a baja temperatura promueve la fragmentación de ADN.
- ✓ Los cultivares de nochebuena evaluados son tolerantes y pueden aclimatarse a las bajas temperaturas.
- ✓ La actividad enzimática de la chalcona isomerasa aumenta conforme disminuye la temperatura de exposición en nochebuena.
- ✓ Una exposición a baja temperatura afecta los componentes de luminosidad y cromaticidad en las variedades de nochebuena, mientras que el tono no se vio afectado por la baja temperatura.
- ✓ La producción de CO₂ en las variedades expuestas a baja temperatura aumentó pero una vez regresadas a condiciones y manejo de invernadero ésta disminuyó.
- ✓ La producción de etileno no se vio afectada por la baja temperatura.

Experimento 2.

- ✓ De igual manera que en el experimento 1, las enzimas oxidativas y la peroxidación lipídica tuvieron una disminución en su actividad dando a las variedades expuestas a baja temperatura una tolerancia oxidativa.
- ✓ La exposición de las variedades de nochebuena a 2 y 0 °C incrementa la actividad enzimática de la proteasa.
- ✓ La exposición a 0 °C por 72 horas en la variedad Da Vinci sobreexpresa genes de respuesta a frío.
- ✓ La actividad enzimática de la chalcona isomerasa se vió afectada a 2 y 0 °C debido a dichas temperaturas de exposición en nochebuena.
- ✓ Una exposición a baja temperatura no afecta los componentes de cromaticidad y ° Hue en las variedades de nochebuena, mientras que la luminosidad fue afectada a 0 °C.
- ✓ La producción de CO₂ en las variedades expuestas a baja temperatura disminuyó.
- ✓ La producción de etileno aumentó ligeramente debido a la baja temperatura.
- ✓ Los cultivares de nochebuena evaluados son tolerantes y pueden aclimatarse a bajas temperaturas.

VI. LITERATURA CITADA

- Abeles F.B., P. W. Morgan, and M. E. Saltveit. 1992. Ethylene in plant biology. Vol 15, 2^a ed. Academia Press, San Diego, CA. p. 208.
- Alexander L., and D. Grierson. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climateric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 53:2039-2055.
- Allen R. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology* 107:1049-1054.
- Alscher R., N. Erturk, and L. Heath. 2002. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 372:1331-1341.
- Anónimo. 2001. Tropical Products Transport Handbook. Potted Flowering and Foliage Plants. Agricultural Marketing Service. USDA.
- Anónimo. 2002. Escalas para medir color y la expresión numérica del color. Guía para entender la comunicación del color. X-Rite. 25 p.
- Anónimo. 2007. Estudio de la Peroxidación Lipídica. Página web http://descargas.cervantesvirtual.com/servlet/SirveObras/57950552545462052754491/005348_3.pdf Consultado el día 05 de febrero de 2007.
- Anthony R., R. Henriques., A. Helfer, G. Ríos, C. Testerink, and C. Koncz. 2004. A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 23:572-581.
- Antunes M., and M. Sfakiotakis. 2002. Chilling induced ethylene biosynthesis in 'Hayward' kiwifruit following storage. *Scientia Horticulturae* 92:29-39.
- Apel K., and H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative-stress and signaling transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In: Foyer C. Mullineaux P. (ed.). Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants. Boca Raton: CRC Press, pp. 77-104.
- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:601-639.

- Asada K., and M. Takahashi. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: *Photoinhibition* (Kyle, D., editor). pp. 227-287.
- Baldensperger J. 1979. An iron containing superoxide dismutase from the chemo lithotrophic *Thiobacillus denitrificans* rt strain. *Archive of Microbiology* 119:237-244.
- Ball, V. 1991. Ball Red Book. Ball Publishing. 15th Ed. Minnesota, USA. 802 p.
- Bannister W., J. Bannister, D. Barra, J. Bond, and F. Bossa. 1991. Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radical Research Communications* 12-13:349-361.
- Barro D., M. Schinina, F. Bossa, K. Puget, and P. Durosay. 1990. A tetrameric iron superoxide dismutase from the eukaryote *Tetrahymena pyridornis*. *Journal of Biological Chemistry* 265:17680-17687.
- Barry C.S., B. Blume, M. Bouzayen, W. Cooper, A. J. Hamilton, and D. Grierson. 1996. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxilate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal* 9:525-535.
- Bate N.J., and S. J. Rothstein. 1998. C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant Journal* 16:561-569.
- Baxter-Burrell A., Z. Yang, P. Springer. and J. Bailey-Serres. 2002. RopGAP4-Dependent Rop GTPase Rheostat Control of *Arabidopsis* Oxygen Deprivation Tolerance. *Science* 296:2026-2028.
- Bayly A., R. Roberts, and C. Dive. 1997. Mechanism of apoptosis. In: *Advances in Molecular and Cell Biology*, Vol. 20, Mechanism of Cell Toxicity. Bittar E. and Chipman (Eds.), Jain Press, Greenwich. pp. 183-229.
- Bednar R., and J. Hadcock. 1988. Purification and characterization of chalcone isomerase from soybeans. *Journal of Biological Chemistry* 263:9582-9588.
- Beg Q., V. Sahai, and R. Gupta. 2003. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in bioreactor. *Process Biochemistry* 39.
- Beyer F. W., and I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161:559-566.
- Bleecker A. B., and H. Kende. 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16:1-18.

- Bleecker A.B., M. A. Estelle, C. Somerville, and H. Kende. 1988. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241:1086-1089.
- Bonnet M., O. Camares, and P. Veisseire. 2000. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *Journal of Experimental Botany* 346:945-953.
- Bordo D., K. Djinoovic, and M. Bolognesi. 1994. Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *Journal of Molecular Biology* 238:366-386.
- Bowler C. 1992. Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
- Bowler C., and R. Fluhr. 2000. The role of calcium and activated oxygen as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Science* 5:241-246.
- Bowler C., W. Van Camp, M. Van Montagu, and D. Inzé. 1994. Superoxide dismutases in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 13:199-218.
- Boyer J. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448.
- Bozhkov P., L. Filonova, M. Suarez, A. Helmersson, A. Smertenko, B. Zhivotovsky, and S. von Arnold. 2004. VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death and Differentiation* 11:175-182.
- Bray E., J. Bailey-Serres, and E. Weretilnyk. 2000. Response to abiotic stresses. In: *Biochemical & Molecular Biology of Plants*. Buchanan B., W. Gruissem, and R. Jones (eds.). American Society of Plants Biologists. Rockville, MD. USA. p. 1196.
- Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botan.* 48:181-199.
- Buckner B., D. Janick-Buckner, and J. Gray. 1998. Cell-death mechanism in maize. *Trends in Plants Science* 3:218-223.
- Carmichael J. L. 1990. Manual de Nochebuena PLANTEC. Ed. No. 4. Amacuzac, Morelos. 23 p.
- Chang C. K., S.F. Bleecker, and E. M. Meyerowitz. 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262:539-544.

- Chen L. Q. 1997. Formation of intracellular free radicals in guinea pig airway epithelium during in vitro exposure to ozone. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143:96-101.
- Christie P., M. Alfenito, and V. Walbot. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194:541-549.
- Collins P. C., and T. Blessington. 1982. Postharvest effects of dark storage, light duration, and source on keeping quality of *Ficus benamina* L. *HortScience* 17:906-908.
- Conzatti C. 1988. Flora taxonómica mexicana. Volumen I. Editorial. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. D.F. 220 p.
- D'Erme M., A. Scarchilli, A. Artale, and M. Pasquali Lasagni. 1998. Ozone therapy in lumbar sciatic pain. *Radiol. Med.* 95:21-4.
- D'Silva I., G. Poirier, and M. Heath. 1998. Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response. A form of programmed cell death. *Experimental Cell Research* 245:389-399.
- Dangl J., R. Dietrich, and M. Richberg. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8:1793-1807.
- Dat J., S. Vandenabeele, E. Vranová, M. Van Montagu, D. Inzé, and Van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:779-795.
- Davidson J., and R. Schiestl. 2001. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* 21:8483-8489.
- Davletova S., L. Rizhsky, H. Liang, Z. Shengqiang, D. Oliver, J. Coutu, V. Shulaev, K. Shlauch, and R. Mittler. 2005. Cytosol ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:268-281.
- del Río L., L. Sandalio, J. Palma, P. Bueno, and F. Corpas. 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomed and cellular implications. *Free Radicals in Biology and Medicine* 13:557-580.
- Delledonne M., J. Zeier, A. Marocco, and C. Lamb. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 98:13454-13459.

- Depreatere V., and P. Golstein. 1998. Dismantling in cell death: Molecular mechanisms and relationship to caspase activation. *Scandinavian Journal of Immunology* 47:523-531.
- Dhaunsi G., S. Gulati, A. Singh, J. Orak, K. Asayama, and I. Singh. 1992. Demonstration of Cu-Zn superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. Biochemical and immunochemical evidence. *Journal of Biological Chemistry* 267:6870-6873.
- Dickman M. B., and J. C. Reed. 2004. Paradigms of cell death in animals and plants. In: Programmed Cell Death. Gray J. (ed.). Blackwell Publishing Ltd. p. 26.
- Dixon R., and N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Donahue J.L., C.M. Okpodu, C.L. Cramer, E.A. Grabau, and R.G. Alscher. 1997. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiology* 113:249-57.
- Dong Yi-Hu, L. Beuning, K. Davies, D. Mitra, B. Morris, and A. Kootstra. 1998. Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers. *Australian Journal of Plant Physiology* 25:245-252.
- Dorey S., F. Baillieul, P. Saindrenan, B. Fritig, and S. Kauffmann. 1998. Tobacco Class I and II Catalases Are Differentially Expressed During Elicitor-Induced Hypersensitive Cell Death and Localized Acquired Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:1102-1109.
- Druege U. 2006. Ethylene and plant responses to abiotic stresses. In: Ethylene Action in Plants. Khan N. A. (ed.). Springer-Verlag. Berlin, Germany. 206 p.
- Durner J., and D. Klessig. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 92:11312-11316.
- Ecke P. 1990. The poinsettia manual. Third edition. Editorial Paul Ecke Poinsettia California, USA. 267 p.
- Ecke P., J. Faust, A. Higgins, and J. Williams. 2004. The Ecke Poinsettia Manual. Ball Publishing. Batavia, Illinois. USA. 287 p.

- Elstner E. 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cell. *In*: Pell E., Steffen K. (eds.) Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists. pp. 13-25.
- Epple P., A. Mack, V. Morris, and J. Dangel. 2003. Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in *Arabidopsis* by two related, plant-specific zinc finger proteins. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 100:6831-6836.
- Esterbauer H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, MDA and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 11:81.
- Evans D. E. 2004. Programmed cell death in response to abiotic stress. *In*: Programmed Cell Death. Gray J. (ed.). Blackwell Publishing Ltd. p. 194.
- Ferrer J. L., J. M. Jez, M. E. Bowman, R. A. Dixon, and J. P. Noel. 1999. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology* 6:775-784.
- Fisher. 2007a. <http://www.fischerusa.com/default.aspx?tabid=7&pid=50-660>. Página Consultada el 19 de Septiembre de 2007.
- Fisher. 2007b. <http://www.fischerusa.com/default.aspx?tabid=7&pid=50-809>. Página Consultada el 19 de Septiembre de 2007.
- Foyer C.H. 1993. Ascorbic acid. *In*: antioxidants in higher plants. R.G. Alscher and J.L. Hess (eds.). CRC Press, Boca Raton, Fl. pp. 31-58.
- Fridovich I. 1986. Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 58:61-97.
- Galicia, J. A. B. 2000. Intensidad de sombreado y su influencia en el crecimiento y calidad de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex. Klotzschii) cv. Supjibi. Tesis de Maestría en Ciencias. Especialidad de Botánica. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Gallego L., M. S. Hernández, J. P. Fernández-Trujillo, O. Martínez, and M. Quicazán. 2003. Color development of arazá fruit as related to modified atmosphere packaging. *Acta Horticulturae* 628:343-350.
- Gamble R.L., X. Qu, and E. G. Schaller. 2002. Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1. Role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity. *Plant Physiology* 128:1428-1438.

- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Universidad Autónoma de México, D. F. México. 219 p.
- Giannopolities C. N., and S. K. Ries. 1977. Superoxide dismutases. *Plant Physiology* 59:309-314.
- Grace S., R. Pace, and T. Wydrzynski. 1995. Formation and decay of monodehydroascorbate radicals in illuminated thylakoids as determined by EPR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1229:155-165.
- Grant J., and G. Loake. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124:21-29.
- Gray J. 2004. Paradigms of the evolution of programmed cell death. *In: Programmed Cell Death*. Gray J. (ed.). Blackwell Publishing Ltd. p. 18.
- Gray J., and G. Johal. 1998. *In Arabidopsis*. Roberts J. (ed.). Scheffield University Press. p. 407.
- Guija E. 2007. Peroxidación de Lípidos. Página web http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://tumi.lamolina.edu.pe/UNALM_PRINCIPIOS%2520BIOACTIVOS/images/Emilio/Diapositiva82.JPG&imgrefurl=http://tumi.lamolina.edu.pe/UNALM_PRINCIPIOS%2520BIOACTIVOS/15.htm&h=540&w=720&sz=78&hl=es&start=2&tbid=sCMYGXG1DRXXuM:&tbnh=105&tbnw=140&prev=/images%3Fq%3Dperoxidacion%2Bde%2Blipidos%26svnum%3D10%26hl%3Des. Consultada el 5 de febrero del 2007.
- Gupta R., Q. Beg, and P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59.
- Gutiérrez-Martínez P., R. López-Gómez, and M. A. Gómez-Lim. 2001. Identification of an ETR-1-homologue from mango fruit expressing during fruit ripening and wounding. *Journal of Plant Physiology* 158:101-108.
- Halliwell B., and J. Gutteridge. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd Edition. Oxford University Press. 899 p.
- Hamberg M., A. Sanz, and C. Castresana. 1999. A-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogeninduced oxygenase (PIOX) as an α -dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *Journal of Biological Chemistry* 274:24503-24513.
- Hammond-Kosack K., and J. Jones. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.

- Hannah M. A., D. Wiese, S. Freund, O. Fiehn, A. Heyer, and D. Hinch. 2006. Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142:98-112.
- Harborne J. B. 1994. The Flavonoids: advances in research since 1986. 1st Edition. Chapman & Hall. Great Britain. 335 p.
- Hiraga S., K. Sasaki, H. Ito, Y. Ohashi, and H. Matsui. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42:462-468.
- Hirayama T., and J. M. Alonso. 2000. Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception. *Plant Cell Physiology* 41:548-555.
- Holcomb E. J., C. Lee, and R. Berghage. 1996. Interaction of DIF and irrigation method on poinsettia. *Bull. Penn. Flower Growers N.* 437:232-239.
- Howe G. A., and A. L. Schillmiller. 2002. Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5:230-236.
- Hsieh T., J. Lee, P. Yang, L. Chiu, Y. Chang, Y. Wang, and M. Chan. 2002. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology* 129:1086-1094.
- Hua J., and E. M. Meyerowitz. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis*. *Cell* 94:261-271.
- Iba K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 53:225-245.
- Ishikawa H. A. 1996. Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suspension-cultured mung bean cells. *American Journal of Botany* 83:825-835.
- Iwashina T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* 113:287-299.
- Jabs T., R. Dietrich, and J. Dangl. 1996. Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273:1853-1856.
- Jacobson M. D., M. Weil, and M. C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.

- Jez J. M., M. E. Bowman, R. Dixon, and J. Noel. 2000. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature Structural Biology* 7:786-791.
- Jez J. M., and J. Noel. 2002. Reaction mechanism of chalcone isomerase. *Journal of Biological Chemistry* 277:1361-1369.
- Jiang Y., and J. Fu. 2000. Ethylene regulation of fruit ripening: Molecular aspects. *Plant Growth Regulation* 30:193-200.
- Jones A., and J. Dangl. 1996. Logjam at Styx: programmed cell death in plants. *Trends in Plant Science* 1:114-119.
- Joyce D. C., S. Meara, S. Hetherington, and P. Jones. 2000. Effects of cold storage on cut Grevillea 'Sylvia' inflorescences. *Postharvest Biology and Technology* 18:49-56.
- Kanematsu S., and K. Asada. 1978. Superoxide dismutase from an anaerobic photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 185:473-482.
- Kanematsu S., and K. Asada. 1979. Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 195:535-545.
- Kanematsu S., and K. Asada. 1990. Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiology* 31:99-112.
- Karpinski S., C. Escobar, B. Karpinska, G. Creissen, and P.M. Mullineaux. 1997. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 9:627-640.
- Kenny A. 1999. Nomenclature and classes of peptidases. In: Proteolytic Enzymes Tools and Targets. Sterchi E. and W. Stöcker (eds.). Springer-Verlag. Germany. pp. 1-8.
- Kim Kee-Young, S. Park, Y. Chung, C. Chung, J. Kim, and J. Lee. 2004. Molecular cloning of low temperature-inducible ribosomal proteins from soybean. *Journal of Experimental Botany* 399:1153-1155.
- Kirby T., J. Lancaster, and I. Fridovich. 1981. Isolation and characterization of the iron-containing superoxide dismutase of *Methanobacterium bryantii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 210:140-148.

- Kitanaka C., and Y. Kuchino. 1999. Caspase-independent cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differentiation* 6:508-515.
- Klee H. 2002. Control of the ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany* 53:2057-2061.
- Klee H., and D. Tieman. 2002. The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum* 115:336-341.
- Klessing D., J. Durner, R. Noad, D. Navarre, D. Wendehenne, D. Kumar, J. Zhou, J. Shah, S. Zhang, P. Kachroo, Y. Trifa, D. Pontier, E. Lam, and H. Silva. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:8849-8855.
- Kliebenstein D., R. Monde, and R. Last. 1998. Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* 118:637-650.
- Kluge R. A., M. L. Jomori, and A. Jacomino. 2003. Intermittent warming of 'Tahiti' lime to prevent chilling injury during cold storage. *Scientia Agricola* 60:729-734.
- Knight H., and M. Knight. 2001. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends of Plants Science* 6:262-267.
- Korsmeyer S. 1998. Regulation of cell death. *Trends of Genetics* 11:101-105.
- Kratsch H. A., and R. R. Wise. 2000. The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment* 23:337-350.
- Krishnamurthy K., R. Krishnaraj, R. Chozhavendan, and F. Samuel-Christopher. 2000. The programme of cell death in plants and animals - A comparison. *Current Science* 9:1169-1181.
- Kristjansson M. 2005. Proteolytic Enzymes: Activity Measurements of Proteinases Using Synthetic Substrates. In: Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, Proteins, Enzymes, Lipids and Carbohydrates. Wrolstad R., T. Acree, E. Decker, M. Penner, D. Reid, S. Schwartz, E. Shoemaker, D. Smith and P. Sporns (eds.). Wiley & Sons. USA. pp. 349-357.
- Kristoffersen T. 1968. Influence of daylength and temperature on growth and development in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.). *Acta Horticulturae* 14:73-89.
- Kroemer G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology* 60:619-642.

- Kuk Y., J. Shin, N. Burgos, T. Hwang, O. Han, H. Cho, S. Jung, and J. Guh. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science* 43:2109-2117.
- Kuo S., and K. Parkin. 2006. Chilling injury in Cucumbers associated with lipid peroxidation as measured by ethane evolution. *Journal of Food Science* 54:1488-1491.
- Kusunose E., K. Ichihara, Y. Noda, and M. Kusunose. 1976. Superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biochemistry* 80:1343-1352.
- Larkindale J., and M. Knight. 2002. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* 128:682-695.
- Lee B., H. Lee, L. Xiong, and J. Zhu. 2002. A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell* 14:1235-1251.
- Legaria-Solano J. 2005. Patrones de faseolinas y análisis RAPD en especies domesticadas de *Phaseolus*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28:195-202.
- Lelièvre J. M., A. Latché, B. Jones, M. Bouzayen, and J. C. Pech. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 101:727-739.
- Leunissen J., and W. de Jong. 1986. Copper/zinc superoxide dismutase: how likely is gene transfer from ponyfish to *Photobacter leiognathi*? *Journal of Molecular Evolution* 23:250-258.
- Levine A., R. I. Pennel, M. Álvarez, R. Palmer, and C. Lamb. 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* 6:427-437.
- Levine A., R. Tenhaken, R. Dixon, and C. Lamb. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Levitt J. 1980. Chilling, freezing and high temperature stress. Volume I *In: Responses of plants to environmental stress*. Academic Press. London England. 495 p.
- Li Z., H. Gemma, and S. Iwahori. 2002. Stimulation of 'Fuji' apple skin color by ethephon and phosphorus-calcium mixed compounds in relation to flavonoid synthesis. *Scientia Horticulturae* 94:193-199.

- Little A. C., 1975. Off on tangent. A Research Note. *Journal of Food Science* 40:410-411.
- Lyons M. J. 1973. Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 24:445-466.
- Mandelman D., F. Schwarz, H. Li, and T. Poulos. 1998. The role of quaternary interactions of stability and activity of ascorbate peroxidase. *Protein Science* 7:2089-2098.
- Martin J., and I. Fridovich. 1981. Evidence for a natural gene transfer from the ponyfish to its bioluminescent bacterial symbiont *Photobacter leiognathi*. The close relationship between bacteriocuprein and the copper-zinc superoxide dismutase of teleost fishes. *Journal of Biological Chemistry* 256:6080-6089.
- Martínez M. 1995. Manual Práctico de Producción de Nochebuena. Consultoría OASIS. Morelos, México. 87 p.
- Maxwell D., Y. Wang, and L. McIntosh. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy Sciences* 96:8271-8276.
- Mckersie D. B., and Y. Leshem. 1994. Chilling stress *In: Stress and stress coping in cultivated plants*. Kluwer Academics Publishers. London, England. 256 p.
- Mehrtens F., H. Kranz, P. Bednarek, and B. Weisshaar. 2005. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 as a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology* 138:1083-1096.
- Michaeli R., S. Philosoph, J. Riov, and S. Meir. 1999. Chilling-induced leaf abscission of *Ixora coccinea* plants. I. Induction by oxidative stress via increased sensitivity to ethylene. *Physiologia Plantarum* 107:166-173.
- Ming-Ming Sun, L. Li, H. Xie, R. Ma, and Y. He. 2007. Differentially expressed genes under cold acclimation in *Phycosmitrella patens*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40:986-1001.
- Minorsky P. 1985. An heuristic hypothesis of chilling injury in plants: a role for calcium as the primary physiological transducer of injury. *Plant Cell and Environment* 8:75-94.
- Mitsuhara I., K. Malik, M. Miura, and Y. Ohashi. 1999. Animal cell-death suppressors Bcl-x_L and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Current Biology* 9:775-778.

- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.
- Mittler R., E. Herr, B. Orbar, W. van Camp, H. Willekens, D. Inzé, and B. Ellis. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:14165-14170.
- Mittler R., and E. Lamb. 1995. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell* 7:1951-1962.
- Mittler R., and E. Lamb. 1996. Sacrifice in the face of foes: Pathogen-induced programmed cell death in higher plants. *Trends in Microbiology* 4:10-15.
- Mittler R., and V. Shulaev. 2004. Programmed cell death in plants: future perspectives, applications, and methods. In: Programmed Cell Death. Gray J. (ed.). Blackwell Publishing Ltd. p. 257.
- Mittler R., L. Simon L., and E. Lam. 1997. Ultrastructural changes and fragmentation of nuclear and chloroplast DNA during the hypersensitive response in tobacco. *Journal of Cell Science* 110:1333-1344.
- Mittler R., S. Vanderauwera, M. Gollery, and F. Van Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9:490-498.
- Mittler R., and B. Zilinskas. 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant Journal* 5:397-405.
- Moon H., B. Lee, G. Choi, D. Shin, D. Prasad, O. Lee, S. Kwak, D. Kim, J. Nam, J. Bahk, J. Hong, S. Lee, M. Cho, C. Lim, and D. Yun. 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:358-363.
- Mullen R. T., and R. N. Trelease. 2000. The sorting signals for peroxisomal membrane-bound ascorbate peroxidase are within its C-terminal tail. *Journal of Biological Chemistry* 275:16337-44.
- Mullineaux P., L. Ball, C. Escobar, B. Karpinska, G. Creissen, and S. Karpinski. 2000. Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? *Philosophical Transactions of the Royal Society Lond. B. Biol. Sci.* 355:1531-40.

- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365.
- Nakajima N., H. Mori, K. Yamazaki, and H. Imaseki. 1990. Molecular cloning and sequence of a complementary-DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. *Plant Cell Physiology* 31:1021-1029.
- Navarro E. 2004. Tolerancia a bajas temperaturas de genotipos cultivados, semicultivados y silvestres de nochebuena. Tesis de Maestría en Ciencias. Depto de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 112 p.
- Neill J. 1993. Isolation of mRNA from plant tissues using the PolyATtract[®] System 1000. *Promega Notes Magazine* 44:10-14.
- Nell T. A., and J. E. Barrett. 1986a. Growth and incidence of bract necrosis in 'Gutbier V-14 Glory' poinsettia. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 111:266-269.
- Nell T. A., and J. Barrett. 1986b. Influence of simulated shipping on the interior performance of Poinsettias. *HortScience* 21:310-312.
- Niyogi K. 1999. Photoprotection revised: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:333-359.
- Noctor G., and C. Foyer Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:249-279.
- Nowak J., and R. M. Rudnicki. 1990. Postharvest Handling and Storage of Cut Flowers, Florist Greens and Potted Plants. Chapman and Hall. London, UK. 210 p.
- O'Kane D., V. Gill, P. Boyd, and R. Burdon. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* 198:371-377.
- Oberhammer F., K. Hochegger, G. Froschl, R. Tiefenbacher, and M. Pavelka. 1993. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *Journal of Cell Biology* 126:827-837.
- Ogawa K., S. Kanematsu, and K. Asada. 1997. Generation of superoxide anion and localization of CuZn superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiology* 38:1118-1126.

- Orozco-Cárdenas M., and C. Ryan. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:6553-6557.
- Okada S., S. Kanematsu, and K. Asada. 1979. Intracellular distribution of manganese and ferric superoxide dismutases in blue-green algae. *FEBS Letters* 103:106-110.
- Palavan-Unsal N., B. Elif-Damla, and A. T. Mehmet. 2005. Programmed cell death in plants. *Journal of Cell and Molecular Biology* 4:9-23.
- Parida K. A., A. Das, B. Mittra, and P. Mohanty. 2004. Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in Mangrove *Bruguiera parviflora*. *Zeitschrift für Naturforschung* 59:408-414.
- Paull R. E. 1990. Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. In: Wang C. Y. (ed.). *Chilling Injury of Horticultural Crops*. C.R.C. Press. Boca Ratón. pp. 17-36.
- Pérez G. F., y J. B. Martínez-Laborde. 1994. *Introducción a la Fisiología Vegetal*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 218 p.
- Pfannschmidt T., A. Nilsson, A. Tullberg, G. Link, and J.F. Allen. 1999. Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB Life* 48:271-6.
- Pinhero R., M. Rao, G. Paliyath, D. Murr, and R. Fletcher. 1997. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiology* 114:695-704.
- Polle A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* 126:445-462.
- PolyATtract® System 1000. 2006. Technical Manual. Promega Corporation. Madison, WI. USA. 22 p.
- Prasad T.K. 1996. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant Journal* 10:1017-1026.
- Prasad T.K., M.D. Anderson, B.A. Martin, and C.R. Stewart. 1994a. Evidence for chilling induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.

- Prasad T.K., M.D. Anderson, and C.R. Stewart. 1994b. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiology* 105:619-627.
- Puget K., and M. Michelson. 1974. Iron containing superoxide dismutases from luminous bacteria. *Biochimie* 56:1255-1267.
- Quintanar A. F. 1961. Las Plantas Ornamentales (Floricultura). Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D.F. 165 p.
- Raison J. K., and J. Lyons. 1996. Chilling injury: A plea for uniform terminology. *Plant Cell and Environment* 9:685.
- Rao M., A. Tanksale, S. Mohini, and V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62.
- Reid M. S. 2002. Ethylene in postharvest technology. In: Postharvest Technology of Horticultural Crops. Third Edition. Kader A. (ed.). University of California. Agriculture and Natural Resources. Publication 3311. pp.149-157.
- Rentel M., D. Lecourieux, F. Ouaked, S. Usher, L. Petersen, H. Okamoto, H. Knight, S. Peck, C. Grierson, H. Hirt, and M. Knight. 2004. OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature* 427:858-861.
- Reymond P., and E. E. Farmer. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 1:404-411.
- Ribas C. M. y M. A. Gonzáles. 2000. Fisiología de la respiración de las plantas. In: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón B. J. y M. Talón (eds.) McGRAW-HIL INTERAMERICANA. Madrid, España.
- Rizhsky L., S. Davletova, H. Liang, and R. Mittler. 2004. The Zinc Finger Protein Zat12 Is Required for Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Expression during Oxidative Stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 279:11736-11743.
- Rodríguez C. B. 1985. Botánica sistemática. Editado por: Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

-
- Rodríguez F., A. Fierro, y M. González. 2000. Dos sistemas de riego en la producción de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) en campo experimental de la UAM-X. Artículo: ANEI-S10006 del X Congreso Nacional de Irrigación. Chihuahua, Chihuahua, México. del 16 al 18 de agosto.
- Rodriguez-Milla M., A. Maurer, A. Rodríguez-Huete, and P. Gustafson. 2003. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stress through diverse signaling pathways. *Plant Journal* 36:602-615.
- Romero C. S. 1996. Plagas y enfermedades de ornamentales. UACH, Chapingo, México. 244 p.
- Rudnicki R. M., J. Nowak, and D. Goszczynska. 1991. Cold storage and transportation conditions for cut flowers cuttings and potted plants. *Acta Horticulturae* 298:225-236.
- Ryerson D., and M. Heath. 1996. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *The Plant Cell* 8:393-402.
- Salin M. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* 72:681-689.
- Salin M., and S. Bridges. 1980. Localization of superoxide dismutase in chloroplasts from *Brassica campestris*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 99:37-47.
- Salin M., and S. Bridges. 1981. Absence of the iron-containing superoxide dismutase in mitochondria from mustard (*Brassica campestris*). *Biochemical Journal* 195:229-233.
- Saltveit M. E. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 15:279-292.
- Sakai H., J. Hua, Q. Chen, C. Chang, A. Bleecker, L. Medrano, and E. Meyerowitz. 1998. *ETR2* is an *ETR1*-like gene controlling ethylene signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:5812-5817.
- Sambrook J., and D. Russell. 2001. Protocol 1: Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: miniprep. *In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor New York. Third edition. pp. 32-34.

- Sandalio L., and L. del Río. 1987. Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrillus vulgaris*: functional implications in cellular metabolism. *Journal of Plant Physiology* 127:395-409.
- Sarma A., and R. Sharma. 1999. Purification and characterization of UV-B induced phenylalanine ammonia-lyase from rice seedlings. *Phytochemistry* 50:729-737.
- SAS. 2002. SAS Procedures Guide Version 9.0. SAS Institute. Cary, North Carolina, USA.
- Sato-Nara K., K. Yuhashi, K. Higashi, K. Hosoya, M. Kubota, and H. Ezura. 1999. Stage- and tissue-specific expresión of ethylene receptor homolog genes during fruit development in muskmelon. *Plant Physiology* 119:321-329.
- Sato Y., T. Murakami, H. Funatsuki, S. Matsuba, H. Saruyama, and M. Tanida. 2001. Heat shock-mediated APX gene expresión and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of the Experimental Botany* 52:145-151.
- Saunders J., and J. McClure. 1974. Phytochrome controlled phenylalanine ammonia lyase in *Hordeum vulgare* plastids. *Phytochemistry* 14:1285-1289.
- Schaller F. 2001. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *Journal of Experimental Botany* 52:11-23.
- Scott L. F., T. Blessington, and J. Price. 1982. Postharvest performance of poinsettia as affected by micronutrient source, storage and cultivar. *HortScience* 17:901-902.
- Scott L., F., T. M. Blessington, and J. Price. 1983. Postharvest effects of temperature, dark storage duration, and sleeving on quality retention of 'Gutbier V-14Glory' Poinsettia. *HortScience* 18:749-750.
- Searcy K., and D. Searcy. 1981. Superoxide dismutase from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 670:39-46.
- Seki M., M. Narusaka, J. Ishida, T. Nanjo, M. Fujita, Y. Oono, A. Kamiya, M. Nakajima, A. Enju, T. Sakurai, M. Satou, K. Akiyama, T. Taji, K. Yamaguchi, P. Carninci, J. Kawai, Y. Hayashizaki, and K. Shinozaki. 2002. Monitoring the expression profiles of 700 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* 31:279-292.

-
- Sen Gupta A., J. L. Heinen, A. S. Holaday, J. J. Burke, and R. D. Allen. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:1629-1633.
- Shanks J. B. 1980. Poinsettias-Nochebuenas. *In: Introduction to Floriculture*. Larson R. A. (ed.). Academic Press. New York. USA. p. 273-295.
- Sharom M., C. Willemont, and J. Thompson. 1994. Chilling injury induces lipid phase changes in membranes of tomato fruit. *Plant Physiology* 105:305-308.
- Shuch U. R., A. Redak, and J. Bethke. 1995. Whole-plant response of six poinsettia cultivars to three fertilizer and two irrigation regimes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 12:69-76.
- SigmaStat. 2006. SigmaStat User's Guide Version 3.5. Point Richmond, California, USA. 844 p.
- Smith M., and R. Doolittle. 1992. A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutases. *Journal of Molecular Evolution* 34:175-184.
- Snedden W., and H. Fromm. 1998. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science* 3:299-304.
- Stauffer C. E. 1989. Enzyme assays for food scientists. Van Nostrand Reinhold. USA.
- Suzuki N., and R. Mittler. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126:45-51.
- Stewart R. N., S. Asen, D. R. Massie, and K. H. Norris. 1980. The identification of poinsettia cultivars by HPLC analysis of their flavonol content. *Biochemical Systematics and Ecology* 8:119-125.
- Swiderski A., P. Muras, and H. Koloczec. 2004. Flavonoid composition in frost-resistant *Rhododendron* cultivars grown in Poland. *Scientia Horticulturae* 100:139-151.
- Takahashi M., and K. Asada. 1983. Superoxide anion permeability of phospholipids membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 226:558-566.

- Tan S. C. 1980. Phenylalanine ammonia-lyase and phenylalanine ammonia-lyase inactivation system effects of light, temperature and mineral deficiencies. *Australian Journal of Plant Physiology* 7:159-168.
- Tantau H., and K. Dorffling. 1991. Effects of chilling on physiological responses and changes in hormone levels in two *Euphorbia pulcherrima* varieties with different chilling tolerance. *Journal of Plant Physiology* 138:734-740.
- Tognolli M., C. Penel, H. Greppin, and P. Simon. 2002. Analysis and expression of class III plant peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288:129-138.
- Thomashow M. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:571-599.
- Thompson J.E., C. D. Froese, E. Madey, M. D. Smith, and Y. Hong. 1998. Lipid metabolism during plant senescence. *Progress in Lipid Research* 37:119-141.
- Torres M., and J. Dangl. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8:397-403.
- Uren A., K. O'Rourke, L. Aravind, M. Pisabarro, E. Seshagiri Si Koonin, and V. Dixit. 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell* 6:961-967.
- Van Camp W., K. Capiou, M. Van Montagu, D. Inzé, and L. Slooten. 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* 112:1703-1714.
- Van Camp W., H. Willekens, C. Bowler, M. Van Montagu, D. Inzé, C. Langebartels, and H. Sandermann. 1994. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *BioTechnology* 12:165-168.
- Van Dijk A., and A. Gelder. 1990. Differences in transportability of poinsettia. Comparison of cultivars very necessary. *Vakblad voor de Bloemisterij*. 45: 54-55.
- Van Dijk A., and H. Barendse. 1991. Determining keeping quality of pot plants. *Acta Horticulturae* 298:267-273.

- Vartapetian B. B., and M. Jackson. 1997. Plant adaptations to anaerobic stress. *Annals of Botany* 79:3-20.
- Vidalie H. 1992. Producción de flores y plantas ornamentales. Editorial Mundi-Prensa. 2ª edición. Madrid, España. 310 p.
- Villegas R. 1998. Determinación del número de noches largas necesarias para inducir la floración y pigmentación de brácteas en el cultivo de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd) cv. Supjibi. Tesis de Licenciatura. Depto. de Fitotecnia, UACH. Chapingo, Estado de México.
- Vogel J., D. Zarca, H. Van Buskirk, S. Fowler, and M. Thomashow. 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 41:195-211.
- Vranová E., D. Inzé, and F. Van Breusegem. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53:1227-1236.
- Wang C. Y. 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. In: Chilling injury of horticultural crops: an overview. Morris L. L. (ed.). *HortScience* 17:162-186.
- Wang K. L. C., H. Li, and J. Ecker. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell Supplement*:131-151.
- Wang M., B. Oppedijk, M. Caspers, G. Lamers, M. Boot, D. Geerlings, B. Bakhuizen, A. Meijer, and B. van Duijn. 1998. Spatial and temporal regulation of DNA fragmentation in the aleurone of germinating barley. *Journal of Experimental Botany* 49:1293-1301.
- Wang X. 1999. The role of phospholipase D in signaling cascades. *Plant Physiology* 120:645-651.
- Ward O. 1985. Proteolytic Enzymes. In: Comprehensive Biotechnology. Moo-Young M. (ed.). Pergamon Press. Great Britain. pp. 789-818.
- Weisshaar B., and G. Jenkins. 1998. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 1:251-257.
- Williamson J. D. and J. G. Scandalios. 1992. Differential response of maize catalases and superoxide dismutases to the photoactivated fungal toxin cercosporin. *Plant Journal* 2:351-358.
- Willie A. 1998. Cell death. In: Apoptosis and cell proliferation. 2nd edition. Boehringer, Mannheim. VI-VII.

- Wise R. 1995. Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynthesis Research* 45:79-97.
- Wise R. R., J. McWilliam, and A. Naylor. 1983. A comparative study of low-temperature-induced ultrastructural alterations of three species with differing chilling sensitivities. *Plant Cell and Environment* 6:525-535.
- Witaszek W., and K. Mynett. 1989. Light and growth regulators in the cuttings production of poinsettia / *Euphorbia pulcherrima* / mother plants. *Acta Horticulturae* 251:315-318.
- Wong W. S., W. Ning, P. Xu, S. Kung, S. Yang, and N. Li. 1999. Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes from citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) fruit. *Plant Molecular Biology* 41:587-600.
- Woods C., V. Polito, and M. Reid. 1984. Response to chilling stress in plant cells, II. Redistribution of intracellular calcium. *Protoplasma* 121:17-24.
- Wu J., J. Lightner, N. Warwick, and J. Browse. 1997. Low-temperature damage and subsequent recovery of *fab1* mutant *Arabidopsis* exposed to 2°C. *Plant Physiology* 113:347-356.
- Xu H., and M. Heath. 1998. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell* 10:585-597.
- Yen C., and C. Yang. 1998. Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. *Plant Cell Physiology* 39:922-927.
- Yi Z. Ch., and D. Patterson. 1985. Ethylene and 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid as indicators of chilling sensitivity in various plant species. *Australian Journal of Plant Physiology* 12:377-385.
- Yoshimura K., K. Miyao, A. Garber, T. Takeda, H. Kanaboshi, H. Miyasaka, and S. Shigeoka. 2004. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplast or cytosol. *Plant Journal* 37:21-33.
- Yost F., and I. Fridovich. 1973. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 248:4905-4908.
- Yung J. G., T. Hayashi, S. Yazawa, T. Katoh, and Y. Yasuda. 1996. Acute morphological changes of palisade cells of *Saintpaulia* leaves induced by rapid temperature drop. *Journal of Plant Research* 109:339-342.

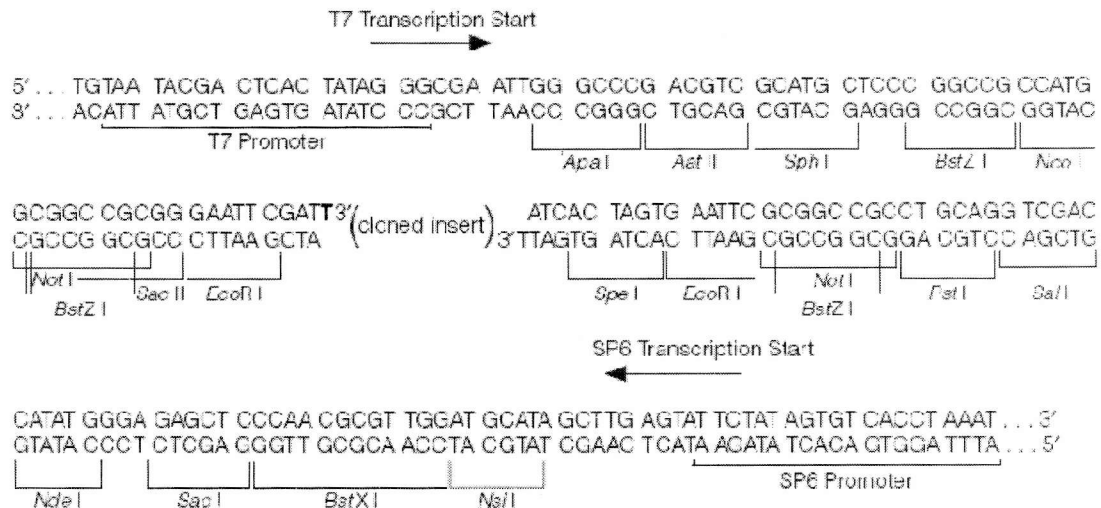
Zacarías L., y M. T. Lafuente. Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. *In: Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcón B. J. y M. Talón (eds.) Edi. McGRAW-HIL INTERAMERICANA. Madrid, España. 522 p.

Zhu D., and J. Scandalios. 1993. Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 90:9310-9314.

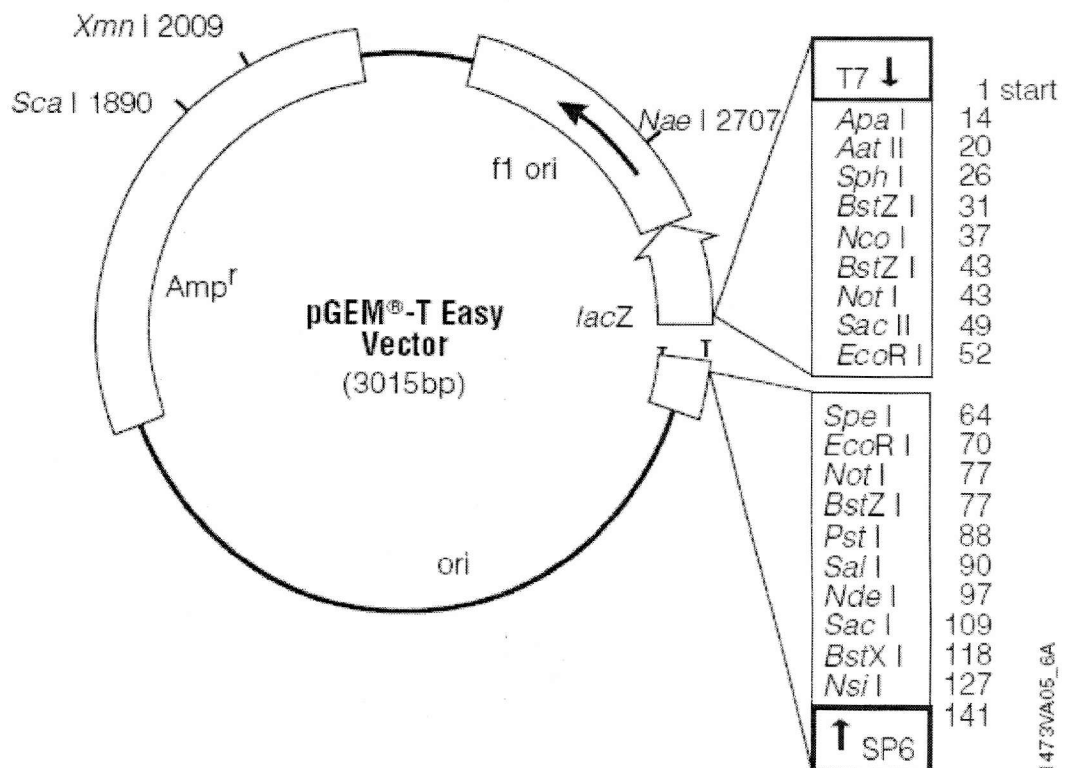
VII. APÉNDICE

Anexo 1. Promotor y secuencia de clonación múltiple del pGEM®-T Easy Vector.

pGEM®-T Easy Vector



Anexo 2. Mapa circular y referencia de puntos de secuencia del pGEM®-T Easy Vector.



Anexo 3. Preparación de soluciones y medios de cultivo.

A) Solución de IPTG (0.1 M).

1.2 g de IPTG.

Se agrega agua a un volumen final de 50 mL. Esterilizar con filtro y almacenar a 4 °C.

B) X-Gal (2 mL).

100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactoside.

Se disuelve en 2 mL de N,N'-dimetil-formamida. Cubrir con aluminio y almacenar a -20 °C.

C) Medio LB (por litro).

10 g de Bacto[®] -triptona

5 g de Bacto[®] -extracto de levadura

5 g de NaCl

Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH

D) Placas de medio LB con ampicilina.

Se agrega 15 g de agar a 1 litro de medio LB, después se esteriliza en autoclave. Se deja enfriar el medio a 50 °C antes de agregar la ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL. Agregar de 30 a 35 mL a cajas de petri de 85 mm. Dejar que el agar solidifique. Almacenar a 4 °C por más de un mes o a temperatura ambiente por más de una semana.

E) Placas de medio LB con ampicilina/IPTG/X-Gal.

Se hacen las placas de medio LB con ampicilina y después se agrega 100 μ L de solución de IPTG y 20 μ L de X-Gal por placa. Se dispersan las soluciones (con perlititas) y se deja que absorba por 30 minutos a 37 °C antes de usarse.

F) Medio SOC (100 mL).

2.0 g de Bacto[®] -triptona.

0.5 g de Bacto[®] -extracto de levadura.

1 mL de NaCl (1 M).

0.25 mL de KCl (1 M).

1 mL de solución de Mg^{2+} (2 M).

1 mL de glucosa (2 M), esterilizada con filtro

Se agrega Bacto[®] -triptona, Bacto[®] -extracto de levadura, NaCl y KCl en 97 mL de agua destilada. Se agita hasta disolver. Se esteriliza en autoclave y se deja reposar a temperatura ambiente. Se agrega la solución de Mg^{2+} y la glucosa. Aforar a 100 mL con agua destilada estéril. El pH final deberá ser de 7.0.

G) Solución de Mg^{2+} (2 M).

20.33 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

24.65 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Se agrega agua destilada hasta 100 mL. Esterilizar con filtro.

H) Solución Alcalina NaOH y SDS.

10 mL de NaOH 2N.

10 mL de SDS al 1%.

80 mL de H_2O esterilizada.

Anexo 4. Análisis de varianza de la luminosidad en el experimento 1.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	43.8	21.9	29.7	<0.001
Error	69	50.8	0.73		
Total	71	94.6			
CV	3.5				
$\bar{x}$	26.13				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento						Muestreo final				
FV	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	6.04	3.02	2.8	0.072	2	14918	7459	4.4	0.001
Temperatura	3	67.8	22.6	21.1	<0.001	2	48.3	24.1	1377.2	0.021
VxT	6	11.1	1.8	1.7	0.14	4	32	8	1.4	0.23
Error	36	38.4	1.06			27	146.2	5.4		
Total	47	123.4	2.6			35	15144.5	432		
CV	8.5					12.7				
$\bar{x}$	26.82					44.28				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 5. Análisis de varianza de la cromaticidad en el experimento 1.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	433	216.5	53.2	<0.001
Error	69	280.6	4		
Total	71	713.6			
CV	3.9				
$\bar{x}$	15.1				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento						Muestreo final				
FV	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	100.3	50.1	15.3	<0.001	2	2017.2	1008.6	392.6	<0.001
Temperatura	3	150.4	50.1	15.3	<0.001	2	90.7	45.3	17.6	<0.001
VxT	6	116.2	19.3	5.9	<0.001	4	160.8	40.2	15.6	<0.001
Error	36	117.7	3.2			26	66.7	2.5		
Total	47	484.7	10.3			34	2312.4	68.0		
CV	13.6					12.5				
$\bar{x}$	14.3					44.7				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 6. Análisis de varianza del tono (°HUE) en el experimento 1.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	49	24.5	8	<0.001
Error	69	209.9	3		
Total	71	258.9			
CV	4.1				
$\bar{x}$	133.95				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento						Muestreo final				
FV	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	150.5	75.2	26.6	<0.001	2	28400.6	14200.3	1789.5	<0.001
Temperatura	3	91	30.3	10.7	<0.001	2	96.4	48.2	6	0.007
VxT	6	75.2	12.5	4.4	0.002	4	163.7	40.9	5.1	0.003
Error	36	101.7	2.8			26	206.3	7.9		
Total	47	418.5	8.9			34	29301.8	861.8		
CV	6.8					5.2				
$\bar{x}$	132.4					62.0				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 7. Análisis de varianza de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en el experimento 1.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	10.4	5.2	2.7	0.072
Error	69	131.5	1.9		
Total	71	142			
CV	3.7				
$\bar{x}$	3.8				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento						Muestreo final				
FV	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	10	5	0.8	<0.001	2	0.6	0.3	0.1	0.890
Temperatura	3	14007	4669	799.8	0.430	2	187.2	93.6	35.3	<0.001
VxT	6	3.4	0.5	0.09	0.996	4	4.3	1.1	0.4	0.798
Error	36	210.1	5.8			26	68.9	2.6		
Total	47	14230.7	302.7			34	263.7	7.7		
CV	4.7					7.3				
$\bar{x}$	20.8					45.0				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 8. Análisis de varianza de la respiración en el experimento 1.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	0.008	0.004	0.685	0.506
Error	105	0.67	0.006		
Total	107	0.68			
CV	7.8				
$\bar{x}$	0.1068				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

	Después de tratamiento					Muestreo final				
FV	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	0.01	0.005	0.2	0.764	2	0.03	0.01	1.5	0.225
Temperatura	3	0.02	0.007	0.3	0.805	2	0.03	0.01	1.2	0.302
VxT	6	0.05	0.008	0.4	0.870	4	0.006	0.001	0.1	0.972
Error	60	1.2	0.02			45	0.5	0.01		
Total	71	1.3	0.01			53	0.6	0.01		
CV	9.3					11.8				
$\bar{x}$	0.1824					0.1367				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 9. Análisis de varianza de la producción de etileno en el experimento 1.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	7.6	3.8	1.5	0.219
Error	105	259.7	2.4		
Total	107	267.3			
CV	5.8				
$\bar{x}$	1.92				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento						Muestreo final				
FV	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	3.6	1.8	0.9	0.394	2	0.08	0.04	0.05	0.942
Temperatura	3	0.3	0.1	0.05	0.983	2	1.3	0.6	0.92	0.403
VxT	6	8.9	1.4	0.7	0.596	4	0.5	0.1	0.19	0.940
Error	60	115.7	1.9			45	32	0.7		
Total	71	128.6	1.8			53	34	0.6		
CV	7.4					10.4				
$\bar{x}$	1.64					1.07				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 10. Análisis de varianza de la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa en el experimento 1.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	20771.5	10385.7	3.3	0.052
Error	69	215372.1	3121.3		
Total	71	236143.6			
CV	5.1				
$\bar{x}$	256.25				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento						Muestreo final				
FV	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	18548.5	9274.2	8.08	0.001	2	67553.2	33776.6	11.2	<0.001
Temperatura	3	97973.7	32657.9	28.4	<0.001	2	6871.4	3435.7	1.1	0.335
VxT	6	22925.1	3820.8	3.33	0.010	4	52056.8	13014.2	4.3	0.008
Error	36	41311.9	1147.5			26	78398	3015.3		
Total	47	180759.2	3845.9			34	206209.1	6064.9		
CV	6.9					9.2				
$\bar{x}$	215.60					193.82				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 11. Análisis de varianza de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en el experimento 1.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	11.7	5.8	18.9	<0.001
Error	69	21.2	0.3		
Total	71	32.9			
CV	3.8				
$\bar{x}$	2.34				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

FV	Después de tratamiento					Muestreo final				
	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	3.5	1.7	5.1	0.011	2	4.4	2.2	36.9	<0.001
Temperatura	3	1	0.3	0.9	0.408	2	0.8	0.4	7.14	0.003
VxT	6	1.6	0.2	0.8	0.562	4	0.6	0.1	2.5	0.064
Error	36	12.3	0.3			26	1.5	0.06		
Total	47	18.5	0.3			34	7.5	0.2		
CV	12.9					15.3				
$\bar{x}$	1.83					0.68				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 12. Análisis de varianza de la peroxidación de lípidos en el experimento 1.

FV	Antes de tratamiento				
	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	439.9	219.9	338.4	<0.001
Error	69	44.8	0.6		
Total	71	484.8			
CV	4.7				
$\bar{x}$	6.04				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

FV	Después de tratamiento					Muestreo final				
	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	3.1	1.5	0.3	0.729	2	101	50.5	3.4	0.056
Temperatura	3	226	75.3	15.1	<0.001	2	7.3	3.6	0.2	0.778
VxT	6	49.8	8.3	1.6	0.158	4	41.6	10.4	0.7	0.589
Error	36	179.6	4.9			26	378.4	14.5		
Total	47	458.8	9.7			34	523.9	15.4		
CV	7.2					14.4				
$\bar{x}$	11.36					14.87				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 13. Análisis de varianza de la actividad enzimática de la proteasa en el experimento 1.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	16.6	8.3	12.6	0.101
Error	69	45.6	0.6		
Total	71	62.3			
CV	5.8				
$\bar{x}$	4.15				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento						Muestreo final				
FV	GL	SC	CM	F	P	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	69.8	34.9	5.2	0.010	2	0.08	0.04	0.04	0.959
Temperatura	3	503.8	167.9	25.4	<0.001	2	3.8	1.9	1.8	0.171
VxT	6	135.5	22.5	3.4	0.009	4	0.3	0.09	0.09	0.983
Error	36	237.9	6.6			26	26.3	1		
Total	47	947.2	20.1			34	30.5	0.8		
CV	8.2					3.6				
$\bar{x}$	7.73					5.13				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 14. Análisis de varianza de la luminosidad en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	29247.6	14623.8	3874.4	<0.001
Error	69	260.4	3.7		
Total	71	29508			
CV	4.7				
$\bar{x}$	57.01				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	19599.1	9799.5	2096.8	<0.001
Temperatura	3	72.2	24	5.1	0.005
VxT	6	54.1	9	1.9	0.102
Error	36	168.2	4.6		
Total	47	19893.7	423.2		
CV	6.7				
$\bar{x}$	58.48				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 15. Análisis de varianza de la cromaticidad en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	2796.6	1398.3	374.2	<0.001
Error	69	257.7	3.7		
Total	71	3054.3			
CV	7.2				
$\bar{x}$	41.16				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	1516.9	758.4	181.9	<0.001
Temperatura	3	9.3	3.1	0.74	0.532
VxT	6	31.3	5.2	1.25	0.303
Error	36	150	4.1		
Total	47	1707.7	36.3		
CV	6.3				
$\bar{x}$	41.64				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 16. Análisis de varianza del tono (°HUE) en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	54626.8	27313.4	689.7	<0.001
Error	69	2732.3	39.6		
Total	71	57359.2			
CV	5.7				
$\bar{x}$	59.42				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	37391.5	18695.7	953.8	<0.001
Temperatura	3	49.3	16.4	0.83	0.481
VxT	6	46	7.6	0.39	0.879
Error	36	705.6	19.6		
Total	47	38192.5	812.6		
CV	8.2				
$\bar{x}$	60.97				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 17. Análisis de varianza de la actividad enzimática de la chalcona isomerasa en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	24.5	12.2	4.4	0.015
Error	69	191.4	2.7		
Total	71	216.0			
CV	5.0				
$\bar{x}$	44.82				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	166.9	83.4	0.5	0.603
Temperatura	3	248824.1	82941.3	509	<0.001
VxT	6	218.6	36.4	0.2	0.966
Error	36	5865.2	162.9		
Total	47	255074.9	5427.1		
CV	9.5				
$\bar{x}$	105.38				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 18. Análisis de varianza de la respiración en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	0.52	0.26	3.7	0.027
Error	105	7.37	0.07		
Total	107	7.89			
CV	3.5				
$\bar{x}$	0.3396				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	0.02	0.010	0.32	0.722
Temperatura	3	0.02	0.008	0.26	0.851
VxT	6	0.04	0.007	0.22	0.968
Error	60	1.88	0.031		
Total	71	1.97	0.027		
CV	6.8				
$\bar{x}$	0.2260				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 19. Análisis de varianza de la producción de etileno en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	23.4	11.7	7	0.001
Error	105	175.1	1.6		
Total	107	198.5			
CV	3.9				
$\bar{x}$	1.64				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	2.9	1.4	0.3	0.734
Temperatura	3	13.9	4.6	0.9	0.409
VxT	6	19.3	3.2	0.6	0.668
Error	60	284.6	4.7		
Total	71	320.8	4.5		
CV	7.2				
$\bar{x}$	2.70				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 20. Análisis de varianza de la actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	121838.9	60919.4	8.3	<0.001
Error	69	501437.1	7267.2		
Total	71	623276			
CV	5.8				
$\bar{x}$	228.32				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	6081.5	3040.7	1.3	0.275
Temperatura	3	25117.4	8372.4	3.6	0.021
VxT	6	35469	5911.5	2.5	0.034
Error	36	81902.1	2275		
Total	47	148570.1	3161		
CV	4.2				
$\bar{x}$	206.78				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 21. Análisis de varianza de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	36.2	18.1	110.3	<0.001
Error	69	11.3	0.16		
Total	71	47.6			
CV	9.3				
$\bar{x}$	2.29				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	11.7	5.8	93.4	<0.001
Temperatura	3	3.5	1.1	18.8	<0.001
VxT	6	1.8	0.3	4.8	<0.001
Error	36	2.2	0.06		
Total	47	19.4	0.4		
CV	7.9				
$\bar{x}$	0.90				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 22. Análisis de varianza de la peroxidación de lípidos en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	425.6	212.8	127.07	<0.001
Error	69	115.5	1.6		
Total	71	541.1			
CV	4.1				
$\bar{x}$	11.89				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	19.4	9.7	1.1	0.323
Temperatura	3	20.9	6.9	0.8	0.481
VxT	6	84.9	14.1	1.7	0.149
Error	36	299.3	8.3		
Total	47	424.5	9.03		
CV	6.2				
$\bar{x}$	11.3				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Anexo 23. Análisis de varianza de la actividad enzimática de la proteasa en el experimento 2.

Antes de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	2.4	1.21	11.8	<0.001
Error	69	7.08	0.10		
Total	71	9.5			
CV	3.2				
$\bar{x}$	4.79				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.

Después de tratamiento					
FV	GL	SC	CM	F	P
Variedad	2	2.1	1.07	0.88	0.422
Temperatura	3	1581.8	527.2	434.4	<0.001
VxT	6	5	0.83	0.68	0.662
Error	36	43.6	1.21		
Total	47	1632.6	34.7		
CV	5.1				
$\bar{x}$	10.78				

FV=Fuentes de variación, GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, CM=Cuadrado medio, F=F calculada, P=Probabilidad, CV=Coeficiente de variación.