

**POSGRADO EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**SUPERÓXIDO DISMUTASA EN PLANTAS DE HENEQUÉN
(*Agave fourcroydes* LEM.)**

**Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
presenta:**

Erika Betancourt Velázquez

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2003



Dedicatoria

La búsqueda y alcance de la realización personal no es un mérito individual, sino es el reflejo conjunto de todo el afecto y apoyo de una gran familia que siempre guía tu superación y éxito.

Porque tuve la fortuna de encontrar en ti amor, comprensión, paciencia... gracias Edward.

A ti Julieta, que llegaste a llenarnos de felicidad.

A mis padres, por los principios inculcados y por haberme brindado la mejor herencia.

A mis hermanos, Allison, Juan y especialmente a mi hermana Lorena, por ser siempre mi modelo a seguir.

A todos mis compañeros y amigos, que siempre me apoyaron brindándome el mejor de sus consejos, gracias.

A mi amiga Manuela, que juntas enfrentamos este reto, gracias por tu valiosa amistad.

Agradecimientos

Mi agradecimiento a la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, así como al Dr. Manuel L. Robert Díaz por la asesoría brindada durante la realización de esta tesis. De manera especial al Dr. Alfonso Gardea Bejar por sus sugerencias durante su participación en el Comité Tutorial.

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo brindado por la Unidad de Biología Experimental y la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, haciendo uso de sus instalaciones y equipos. Así también como a los laboratorios del Dr. Felipe A. Vázquez Flota y Dra. Teresa Hernández Sotomayor por permitir el uso de sus instalaciones durante la realización del trabajo experimental.

Un agradecimiento de manera especial a todas aquellas personas que contribuyeron a la finalización de esta tesis:

De manera muy especial a la Dra. Rosa María Escobedo Medrano y a la M.C. Lizbeth A. Castro Concha por el apoyo incondicional y por compartir su experiencia en la parte experimental. Agradezco al grupo de agaves, por el apoyo otorgado durante la recolección del material vegetal.

Agradezco al Consejo de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por la beca crédito otorgada con el No. 165180. Este trabajo recibió financiamiento parcial del Programa Integral para el fortalecimiento del Posgrado (PIFOP).

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de este Centro, bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Miranda Ham y el Dr. Manuel L. Robert Díaz.

Abreviaturas

APX	Ascorbato peroxidasa
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CAT	Catalasa
CTC	Cobre-tartrato-carbonato
EDTA	Sal disódica del ácido tetra-acético etilén diamino
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
KCN	Cianuro de potasio
KNO ₃	Nitrato de potasio
MDHA	Radical monodeshidroascorbato
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio
O ₂ ⁻	Radical superóxido
¹ O ₂	Oxígeno singulete
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PF	Peso fresco
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POX	Peroxidasas
p/p	Peso en peso
p/v	Peso en volumen
ROS	Especies reactivas de oxígeno
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SOD	Superóxido dismutasa
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
XO	Xantina oxidasa

Contenido

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Capítulo 1 Antecedentes	
Henequén	9
Zona henequenera	10
Características de la especie	10
Ciclo de vida.....	11
Problemática del cultivo de henequén	12
Micropropagación	
Selección y recolección del material vegetal	14
Fase de inducción de brotes	15
Fase de crecimiento y multiplicación	15
Fase de enraizamiento y preadaptación.....	15
Fase de vivero y plantación definitiva.....	16
Rejuvenecimiento y juvenilidad	17
El estrés oxidativo y los sistemas antioxidantes.....	18
Superóxido dismutasa	23
La superóxido dismutasa y el estrés ambiental	24
Justificación	26
Hipótesis y objetivos	27
Referencias	28
Capítulo 2 Materiales y Métodos	
Material biológico	33
Determinación de la actividad específica de	

la superóxido dismutasa	38
Zimografía	40
Determinación de proteína soluble	41
Esquema general de la metodología.....	43
Referencias	44
Capítulo 3 Resultados y Discusión	
Determinación de la actividad de la SOD en plántulas de Agave.....	45
Actividad específica de SOD en plantas en fase de vivero	48
Patrones zimográficos de SOD en plantas en fase de vivero..	51
Referencias	53
Capítulo 4 Conclusiones y Perspectivas.....	55
Referencias	57
Anexo	59

Resumen

El henequén, nativo de la Península de Yucatán, es de gran importancia económica a nivel mundial por la obtención y utilización de su fibra dura. La problemática que representa su ciclo de vida largo, una baja capacidad de reproducción sexual por la infertilidad o baja viabilidad de las semillas, un elevado nivel de ploídia y su poca variabilidad genética han provocado la disminución de la calidad de las plantaciones y la reducción en la productividad de la especie. La técnica de micropropagación se emplea exitosamente como una solución a su problemática, obteniéndose una rápida y eficiente multiplicación de plantas élite, individuos rejuvenecidos, más vigorosos, con una mayor fijación de CO₂ y resistencia a las enfermedades, una mayor productividad y tolerancia a las condiciones ambientales adversas, así como con ciclos de vida más homogéneos en comparación con las plantas cultivadas de manera tradicional.

Los procesos bioquímicos y moleculares implicados en el rejuvenecimiento inducido por el cultivo *in vitro*, resultan de mucho interés en el desarrollo de proyectos para la obtención de plantas con mejores rendimientos. Una mayor eficiencia de los sistemas antioxidantes parece estar implicada durante este proceso de rejuvenecimiento. Los resultados obtenidos de las determinaciones de la actividad total y del patrón isoenzimático de la superóxido dismutasa en las hojas de henequén propagado *in vitro* revelaron una baja actividad de SOD, pero una gran cantidad de isoenzimas, cuando se compararon con otras especies vegetales. Sin embargo, cuando las plantas se establecieron en el vivero, éstas presentaron niveles más altos

de actividad, empero no hubieron diferencias significativas en la actividad total, ni en el patrón de isoenzimas en las líneas clonales entre sí, y en comparación con las plantas provenientes de bulbillos que se utilizaron como testigos. Los resultados obtenidos en plantas durante dos fases diferentes del proceso de micropropagación, sientan las bases para estudios posteriores, donde las diferencias fenotípicas se presenten más claramente. Además, este trabajo constituyó la primera aproximación al análisis de la relación entre el rejuvenecimiento y la eficiencia de los sistemas antioxidantes.

Abstract

The henequén plant, native of the Yucatan Peninsula, has a marked economic importance worldwide due to its long, hard fibers. A long life cycle, a lowered ability for reproducing sexually, low viability of its scarce seeds, a high ploidy level and an apparent narrow genetic variability are some of the problems that have impacted in the quality of its plantations and hence, diminished its productivity. Micropropagation techniques have been successfully employed as a solution to some of the problems stated above. The resulting plants are the product of a rapid and efficient multiplication process of elite materials, which are rejuvenated, more vigorous, present higher CO₂ fixation rates and an enhanced resistance to diseases. They are also more productive, have more homogeneous life cycles and present higher degrees of tolerance to adverse environmental conditions when compared to plants which have been traditionally propagated.

The molecular and biochemical processes involved in the rejuvenation phenomenon induced by the *in vitro* culture result of fundamental importance in projects, whose aim is to produce plants with better yields. A heightened efficiency of their antioxidant systems seem to be implicated in rejuvenation. The results of the determination of the specific activity and isoenzymatic pattern of superoxide dismutase in *in vitro* propagated henequén plants revealed a low activity level, but a high number of isoenzymes, when compared to other plant species. Nevertheless, when plants were established in the nursery, they showed higher activity levels, but there were no significant differences in the total activity nor in the isoenzymes number among the clonal lines and the plants coming from bulbils, which were used as controls. These

studies constitute the basis for further research involving plants presenting extreme phenotypical characteristics, and also, the first approach to the analysis of the possible relationship between rejuvenation and the efficiency of the antioxidant systems.

Introducción

La micropropagación es una técnica que permite la obtención de un gran número de plantas de manera rápida y eficiente a través del cultivo *in vitro*. Esta metodología puede aplicarse a especies de interés comercial, así como de aquéllas que poseen un largo ciclo de vida o procesos de reproducción ineficientes. Además, permite obtener plantas libres de enfermedades, más vigorosas y de rápido crecimiento (Eastmond *et al.*, 2000). No obstante, el cultivo *in vitro* aún encierra muchos factores que se requieren investigar.

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) es un cultivo de importancia económica en Yucatán, ya que es la fuente principal de fibra dura para la industria cordelera del país, y aún representa un rentable producto de exportación. Esta planta es de ciclo de vida largo y tiene una reproducción sexual ineficiente, aunado a que durante su cultivo se presentan prácticas desfavorables que impiden una mejor explotación (Eastmond *et al.*, 2000). El Centro de Investigación Científica de Yucatán, dentro de su Programa de Mejoramiento Genético del Henequén, ha desarrollado exitosamente la técnica de su cultivo *in vitro*, la cual permite obtener, en unos cuantos meses, miles de individuos rejuvenecidos (Robert *et al.*, 1987).

En el proceso de rejuvenecimiento inducido por el cultivo *in vitro*, deben estar implicados mecanismos bioquímicos y moleculares que hacen a estos individuos, diferentes de las plantas cultivadas de manera tradicional. Las plantas rejuvenecidas poseen características ventajosas que las hacen capaces de tolerar mejor las condiciones ambientales adversas a las que están constantemente sometidas (López, 2001).

Es posible que las plantas micropropagadas de henequén, posean sistemas antioxidantes más eficientes que sus contrapartes propagadas de manera tradicional. Esto les permitiría contrarrestar los efectos lesivos de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, y podría explicar su adaptabilidad a las condiciones desfavorables del medio ambiente. Un análisis detallado de los sistemas antioxidantes en las plantas de henequén podría coadyuvar a definir estrategias para generar plantas con mayor capacidad para tolerar estas condiciones adversas.

La superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1.) es una metaloenzima que cataliza la dismutación del anión superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (Gil *et al.*, 1999). En la literatura, hay tan sólo un reporte que describe el comportamiento de esta enzima en el proceso de rejuvenecimiento de plantas de tabaco (Barna *et al.*, 1993). Aún más, no existen reportes sobre esta enzima, o de otras enzimas involucradas en los sistemas antioxidantes, en la familia Agavaceae.

Es por esto que como una primera aproximación al estudio de los sistemas antioxidantes en plantas micropropagadas de henequén, en el presente trabajo se describen los resultados obtenidos en el estudio de la actividad de la superóxido dismutasa en dichas plantas.

REFERENCIAS

- Barna B., Ádán L. and Király Z. 1993. Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* **80**: 420 – 422
- Eastmond A., Herrera J. y Robert M.L. 2000. La Biotecnología Aplicada al Henequén: Alternativas para el Futuro. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida. pp. 7 – 70

Gil L., Martínez G., González I. y Pérez J. 1999. Estrés oxidativo: Mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Bioquímica* **24**: 85 – 93

López E. 2001. Juvenilidad y rejuvenecimiento de plantas cultivadas *in vitro*. <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS27/27juvenil.html>

Robert M.L., Herrera, J.L., Contreras F. and Scorer K.N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequén). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **8**: 37-48

Capítulo 1

Antecedentes

HENEQUÉN

Nativa de la Península de Yucatán, la planta del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) es de gran importancia económica a nivel mundial por la obtención y utilización de su fibra dura (Colunga *et al.*, 1993). Este producto fue el sustento de una bonanza económica en la que se fincaron las esperanzas de progreso y bienestar de toda la sociedad yucateca, ya que fue precisamente Yucatán el lugar donde nació la industria henequenera. Actualmente la explotación del henequén no tiene el impacto económico ni social de antaño, pero aún hoy en día sigue siendo una de las fuentes de fibras largas naturales de mayor calidad y demanda mundial, además de constituir uno de los pocos cultivos productivos en áreas áridas y semiáridas (Programa Desarrollo Regional de la Zona Henequenera 1992-1994; Eastmond *et al.*, 2000).

El uso de la fibra del henequén se remonta a la época prehispánica, los mayas la utilizaban para elaborar cuerdas, sandalias, morrales, telas y para la construcción; hoy en día es usada para la fabricación de hilos agrícolas, cuerdas, sacos, canastos, material de relleno, alfombras y esteras. Durante el proceso de desfibración del henequén, se pueden obtener subproductos útiles, como jugos, esteroides, alcoholes, pulpa (parénquima) para alimentación de ganado, bagazo, etc. (Ramírez, 1985).

La forma más común de expresar el rendimiento de las hojas es en kilos de fibra por millar de hojas, y el rango va desde unos 16 kilos en plantas jóvenes o en malas condiciones, hasta 40 kilos por millar de hojas en plantas maduras y bien cuidadas.

ZONA HENEQUENERA

En Yucatán, la zona de cultivo del henequén se localiza en el centro y al noroeste del estado (Figura 1) (Peniche, 1985). Esta zona semiárida se caracteriza por la pobreza orgánica de sus suelos, los cuales son extremadamente someros, pedregosos y permeables. El henequén está adaptado fisiológica- y morfológicamente a la escasez de agua y a las altas temperaturas, crece en un clima cálido-subhúmedo, con precipitaciones pluviales de no más de 1100 mm anuales y con una temperatura media anual de 26°C (Eastmond *et al.*, 2000).

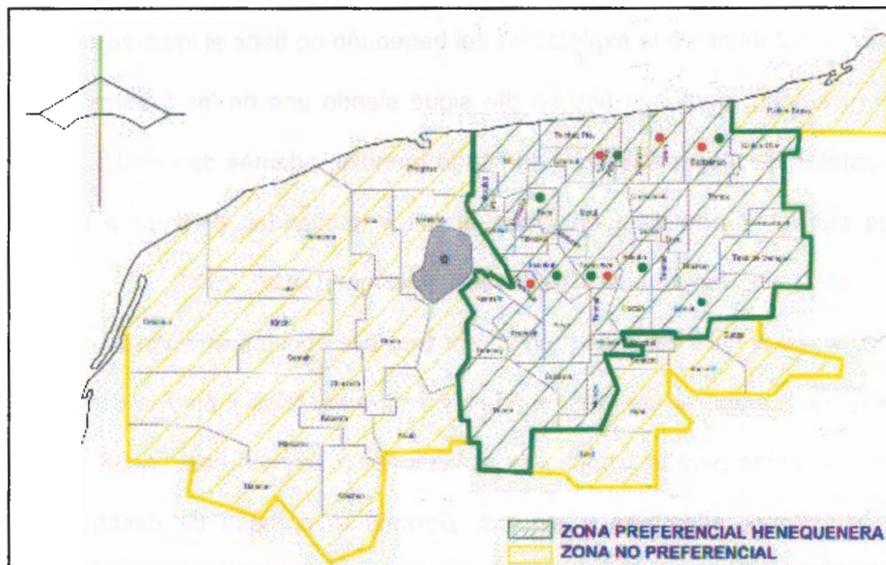


Figura 1. Zona henequenera en el estado de Yucatán (Eastmond *et al.*, 2000).

CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE

El henequén pertenece a la familia Agavaceae, es una planta monocotiledónea, con fijación de carbono tipo metabolismo ácido crasuláceo (CAM), pentaploide (Castorena-Sánchez *et al.*, 1991). Sus hojas o pencas se caracterizan por

ser de gran altura, verdes, gruesas, fibrosas, succulentas, con espinas laterales, terminadas en una púa muy dura y acerada, y están dispuestas en forma de roseta en torno a un tallo corto (Figura 2).

Sus raíces crecen en forma radial muy extendida (1.5 m), son duras, fibrosas y eficientes para la conservación de la tierra, evitando la erosión del suelo (Programa Desarrollo Regional de la Zona Henequenera 1992-1994; Eastmond *et al.*, 2000).



Figura 2. Planta de henequén (Programa Desarrollo Regional de la Zona Henequenera 1992-1994).

CICLO DE VIDA

El ciclo de vida del henequén fluctúa entre los 15 y los 25 años, pero su aprovechamiento comienza sólo después de 5 años de cultivo, por lo que se le considera una planta perenne (Peniche, 1985; Eastmond *et al.*, 2000). Esta especie se propaga en forma vegetativa a través de rizomas, que son tallos subterráneos modificados y en cuyo ápice se encuentra una yema, la cual al emerger produce una nueva planta conocida como hijuelo o vástago (uno o dos por año en promedio). Éste

se mantiene unido a la planta madre hasta que se cortan para su empleo en el establecimiento de nuevas plantaciones. Otra forma de reproducción vegetativa es por medio de bulbillos que se desarrollan a partir de yemas localizadas debajo del pedúnculo floral en el varejón, tras la caída de los frutos (Figura 3). El varejón puede alcanzar una altura de 3 a 8 m y producir entre 800 y 1000 bulbillos (Eastmond *et al.*, 2000; Piven *et al.*, 2001). No obstante, en la práctica agrícola se acostumbra cortar el escapo floral para evitar la desecación de las últimas hojas y aumentar así el tiempo de explotación. Dicha práctica ha limitado la variabilidad natural de la especie (Robert y García, 1985). Existe una fuerte resistencia al empleo de bulbillos, de los que se dice presentan poca homogeneidad genética, baja productividad y floración temprana; sin embargo, no se conocen datos experimentales que respalden estas aseveraciones (Eastmond *et al.*, 2000). La reproducción sexual ocurre solamente una vez en la vida de la planta, y da lugar a semillas que se producen en la parte superior de la inflorescencia. Las pocas semillas que logran madurar muestran una baja capacidad de germinación y se desconoce la calidad de las plantas derivadas de ellas (Piven *et al.*, 2001).

PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO DEL HENEQUÉN

La larga duración de su ciclo de vida y el mal manejo del cultivo han provocado la disminución de la calidad de las plantaciones y la reducción en la productividad de la especie.

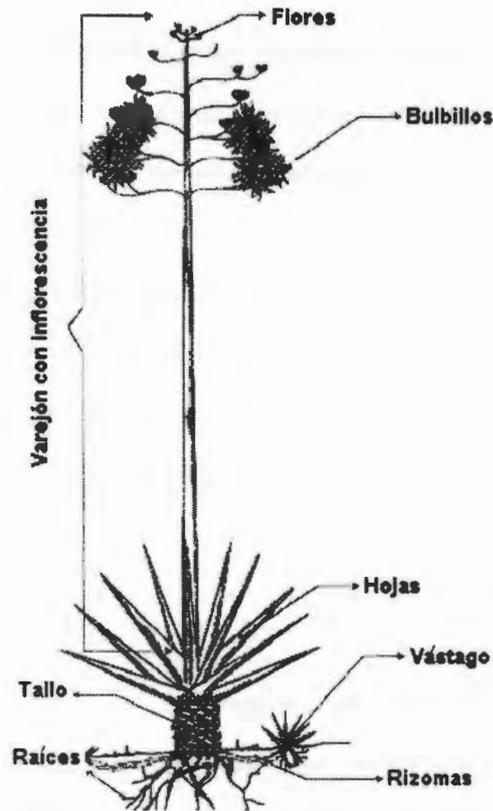


Figura 3. Esquema de la planta de henequén (Eastmond *et al.*, 2000).

Las plagas contribuyen también de manera importante a la disminución de la cantidad y la calidad de la fibra. El coleóptero conocido como “max” (*Scryphophorus interstitialis*), junto con la mosquita del henequén, representan los principales problemas de plagas en la zona henequenera (Reyes *et al.*, 1985). Los cultivos se ven severamente afectados por la bacteria *Enterobacter cloacaceae*, agente causal de la enfermedad conocida como “punta seca de la hoja”, que provoca la reducción en el rendimiento de la fibra extraída (Quijano *et al.*, 2002).

MICROPROPAGACIÓN

Como una estrategia para resolver los problemas que representan un ciclo de vida largo, una baja capacidad de reproducción sexual debido a la infertilidad o baja viabilidad de las semillas, un elevado nivel de ploidía y su teóricamente poca variabilidad genética, se emplea con éxito la técnica de micropropagación *in vitro* para una rápida y eficiente multiplicación de plantas élite, con individuos rejuvenecidos.

Entre las principales características de las plantas micropropagadas están un mayor vigor, que se refleja en la producción de un mayor número de vástagos por año en promedio, mayor tolerancia a las enfermedades, mayor número de hojas y ciclos de vida más homogéneos, en comparación con las plantas cultivadas de manera tradicional (Eastmond *et al.*, 2000).

Selección y recolección del material vegetal

Para la micropropagación, se emplea el cultivo de meristemas seguido de la inducción de brotes adventicios (Robert *et al.*, 1987). El proceso (Figura 4) se inicia con la selección de la planta madre en plantaciones con una alta productividad. Se recomienda emplear plantas de 50 a 70 cm de altura, medida desde la superficie del suelo hasta la punta de la hoja central. La planta seleccionada se deshoja totalmente evitando dañar el tallo, el cual se lava con jabón. Se eliminan las partes fibrosas hasta obtener un cubo de tejido meristemático, que se desinfecta y divide en tres niveles. Cada nivel se secciona a su vez en nueve cubos más pequeños, de aproximadamente 0.8 cm por lado. Los niveles superiores son los que dan mejores resultados, ya que tienen mayor cantidad de tejido meristemático. El medio de cultivo que se utiliza en todas las fases es el Murashige y Skoog (MS, 1962), modificado en su fuente de

nitrógeno por NH_4NO_3 5 mM y KNO_3 18 mM (Robert *et al.*, 1987). Para cada fase se utilizan diferentes concentraciones de hormonas y gelificantes, así como tipos de contenedores.

Fase de inducción de brotes

Los explantes se colocan en frascos de vidrio de 120 ml, a razón de cuatro por frasco y se incuban en luz continua ($230 \mu\text{E}/\text{seg}/\text{m}^2$) a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante seis semanas. Posteriormente se transfieren a condiciones de fotoperíodo, manteniendo una humedad relativa del 60% para la fase siguiente (Figura 4A).

Fase de crecimiento y multiplicación

Los cultivos se cosechan cada seis semanas, sacando las plantas que han alcanzado una altura entre 6 y 8 cm, y resemebrando los nuevos brotes (de aproximadamente de 1 a 2 cm) en 16 grupos de dos a tres brotes por frasco (Figuras 4B y 4C).

Fase de enraizamiento y preadaptación

Las plantas cosechadas en la fase anterior se transfieren al medio de enraizamiento, en donde después de dos semanas formarán las raíces que les permitirán sobrevivir al ser transplantadas a tierra. Estas plantas deben realizar la fotosíntesis eficientemente, por lo que se eliminan los azúcares del medio de cultivo. Así mismo, se reduce la humedad dentro del frasco del cultivo y se incrementa la intensidad luminosa, incubando en cuartos con ventanas que permiten la entrada de luz natural. Las plantas preadaptadas son colocadas en charolas de poliestireno de

200 celdas, que contienen una mezcla de tierra:turba (3:1), previamente pasteurizada. Las charolas de poliestireno, conteniendo las plantas preadaptadas, se saturan de agua y se mantienen en áreas sombreadas por un periodo de cuatro a seis semanas, antes de ser transferidas al vivero (Figura 4D).

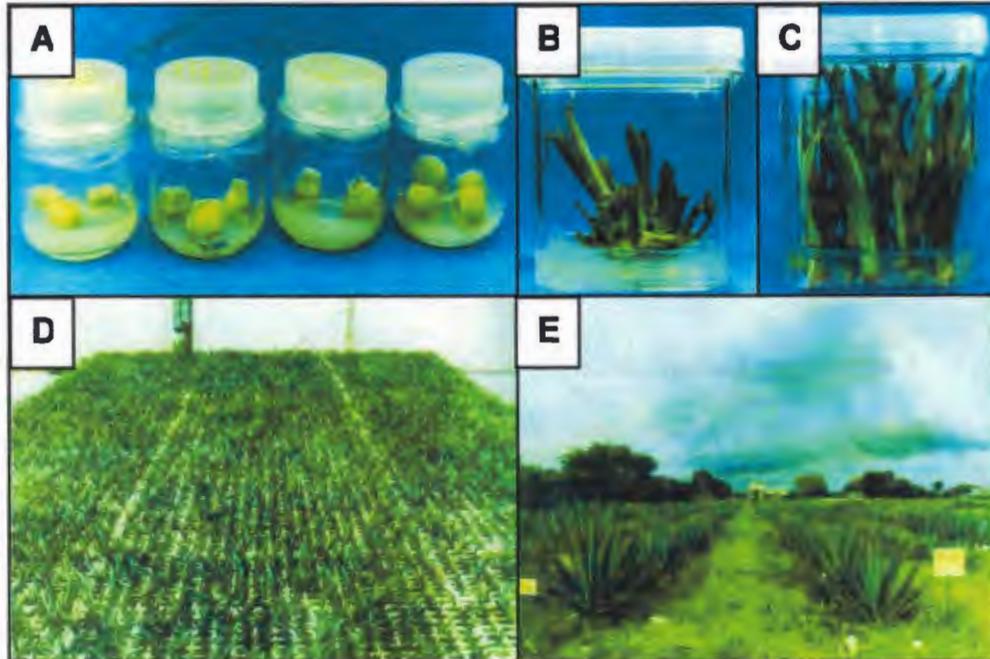


Figura 4. Fases del proceso de multiplicación masiva de henequén. A, inducción del tejido; B y C, multiplicación *in vitro*; D, aclimatación de las plantas micropropagadas; E, plantación experimental (Eastmond *et al.*, 2000).

Fase de vivero y plantación definitiva

En los viveros, las plantas se siembran a una distancia de 20 x 30 cm sobre una cama de bagazo (subproducto de la desfibración del henequén), previamente fermentado, de 20 cm de profundidad. Los hijuelos producidos en el vivero, que han alcanzado una talla de 50 cm, se cortan y transfieren a plantaciones experimentales (Figura 4E).

REJUVENECIMIENTO Y JUVENILIDAD EN PLANTAS

La juvenilidad se define como la condición de una planta previa a la floración o gametogénesis. Esta condición presenta una serie de parámetros asociados, tanto morfológicos como fisiológicos, como son: aumento en la capacidad de formación de raíces adventicias, cambios en la forma, el área, el volumen y la distribución de estomas, así como en el volumen del meristemo apical y en la forma del tallo, respuestas diferenciales a los fitorreguladores, en la lignificación de las paredes celulares y en el color y la formación de espinas, mejor tolerancia a condiciones ambientales adversas, mayor capacidad fotosintética y mayor vigor. La capacidad organogénica también es mayor en las plantas juveniles en comparación con las plantas adultas (López, 2001).

Algunos métodos que han sido usados para obtener rejuvenecimiento *in vivo* son: la poda, el uso de brotes de raíces, el asperjado con citocininas y el injerto. Se han desarrollado métodos *in vitro* en adición a las técnicas *in vivo*, tales como el cultivo de explantes seleccionados, el subcultivo repetido de brotes, la microinjertación sobre patrones juveniles, el cultivo de meristemos, la formación de yemas adventicias y la embriogénesis somática (Miguélez y Debergh, 2003).

Barna y colaboradores (1993) reportaron que en plantas de tabaco tolerantes a paraquat seleccionadas *in vitro* se presentaron: incrementos en la actividad de la superóxido dismutasa, asociados a bajos contenidos de radicales libres de oxígeno, disminución en la velocidad de la peroxidación de lípidos, así como concentraciones crecientes de clorofila, galactolípidos y fosfolípidos. Estas características no las presentaron las plantas de tabaco sensibles a paraquat.

La causa del rejuvenecimiento inducido por el cultivo *in vitro* es desconocida. Estas plantas presentan características propias de juvenilidad; sin embargo, hay que aclarar que estas plantas no son verdaderamente juveniles, pues el tejido del cual se derivaron no era juvenil (López, 2001). Un análisis profundo de los factores involucrados en el rejuvenecimiento resulta de gran utilidad en plantas de interés comercial, sobre todo en aquellas que están sujetas a condiciones ambientales adversas.

En el caso del henequén, su cultivo *in vitro* ha conducido a la obtención de individuos más vigorosos, que produce un promedio de 5.6 vástagos por año en comparación con el 1.5 producidos por las plantas de campo. Las líneas clonales muestran un mayor crecimiento, con hojas de mayor tamaño y una sincronización del crecimiento, de tal manera que casi todas las plantas llegan a la etapa productiva al mismo tiempo (Eastmond *et al.* 2000). Investigaciones recientes han demostrado que las plantas micropropagadas a nivel de plantaciones muestran mayores tasas fotosintéticas que sus contrapartes cultivadas de manera tradicional (Robert M.L., comunicación personal). Estos datos sugieren que como resultado de su cultivo *in vitro*, en las plantas se ha dado un proceso de rejuvenecimiento.

EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Una de las paradojas de la vida en este planeta es que el oxígeno, la molécula que hizo posible la vida, no sólo es fundamental para el metabolismo y la respiración, sino que también está implicada en muchas enfermedades y condiciones degenerativas (Scandalios, 1993). La toxicidad del oxígeno es consecuencia de su

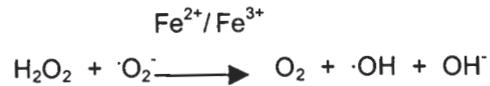
transformación en las llamadas “especies reactivas de oxígeno” (ROS, por sus siglas en inglés) (Simontacchi *et al.*, 2001).

La producción de ROS es una consecuencia inevitable del metabolismo aeróbico. Se generan como productos de la reducción incompleta del oxígeno o de la oxidación del agua durante el metabolismo primario. En plantas, las ROS se generan en cantidades importantes durante la fotosíntesis, la fotorespiración, la fosforilación oxidativa, la β -oxidación de los ácidos grasos, y por la acción de un sinnúmero de oxidasas (Alscher *et al.*, 1997).

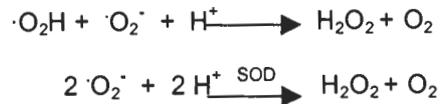
Las ROS participan ampliamente en el metabolismo vegetal, como por ejemplo, en la biosíntesis de pared celular, y también tienen funciones en la señalización como mensajeros secundarios que regulan el crecimiento y el desarrollo, así como en las respuestas a condiciones ambientales adversas y al ataque de patógenos (Foyer *et al.*, 1997). Sin embargo, la mayoría de las ROS de interés biológico suelen ser extremadamente reactivas e inestables. Cuando un radical libre reacciona con un compuesto electrónicamente estable puede dar lugar a otros radicales libres, de manera que se propagan en reacciones en cadena y dan lugar a efectos biológicos muy diferentes del sistema que originó el primer radical (Gameley y Kluybin, 1999; Bestwick *et al.*, 2001).

Cuando el oxígeno molecular acepta un electrón proveniente de un agente reductor, el producto primario generado es un radical libre con carga eléctrica negativa, llamado anión superóxido (O_2^-), que se caracteriza por poseer un electrón no apareado y cuya vida media es extremadamente corta (Bowler *et al.*, 1992; Burritt y Mackenzie, 2003). Bajo condiciones de sobreproducción y agotamiento de sus secuestradores, el O_2^- reacciona con el peróxido de hidrógeno en presencia de iones

metálicos produciéndose el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), especie altamente reactiva. Esta reacción es conocida como de Haber-Weiss (Bowler *et al.*, 1992):



La adición de otro electrón al anión superóxido conduce a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta reacción ocurre, ya sea espontáneamente o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (Gebicki y Bielski, 1981).



Si este peróxido no es eliminado puede entonces reaccionar en presencia de metales, generando también al radical hidroxilo, reacción conocida como de Fenton (Bowler *et al.*, 1992):



El radical hidroxilo tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas. Puede atacar un átomo de hidrógeno de un ácido graso y formar un radical lipídico, dejando un electrón desapareado, el cual sufre un reordenamiento molecular que produce un dieno conjugado, que a su vez reacciona con el oxígeno molecular para dar lugar al radical hidroperoxilo, el cual al extraer un átomo de hidrógeno del carbono del ácido graso polinsaturado adyacente forma otro radical lipídico, que podría combinarse entonces con otra molécula de oxígeno (reacción en cadena). Este proceso es conocido como peroxidación lipídica.

Otra especie reactiva derivada del oxígeno, que se encuentra en los sistemas biológicos, es el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), que se forma por absorción directa de radiación, por fotólisis del ozono en el aire contaminado o por irradiación de aniones $\cdot\text{O}_2^-$ (Simontacchi *et al.*, 2001).

Los continuos cambios ambientales, como la sequía y las temperaturas extremas, los procesos naturales de envejecimiento, el ataque de patógenos, las deficiencias o excesos de minerales y de otros nutrientes, las acciones del ser humano que exponen a las plantas a herbicidas y a los contaminantes o a la radiación ultravioleta, pueden generar un incremento en la producción de las ROS (Scandalios, 1993; Abarca *et al.*, 1999).

Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son blancos de las ROS. Las especies reactivas pueden provocar la desnaturalización de enzimas al oxidar los grupos $-\text{SH}$ de las proteínas, la destrucción de las membranas celulares por peroxidación lipídica, y modificar, tanto carbohidratos como proteínas estructurales. Además pueden actuar sobre las cadenas del ADN, produciendo mutaciones que al acumularse pueden conducir a la muerte celular (Martínez-Cayuela, 1998; Yu y Rengel, 1999).

Las células han desarrollado sistemas antioxidantes para contrarrestar el efecto lesivo de estas especies; pero, en casos de producción masiva o continua de ROS, aún estos sistemas celulares pueden ser superados, lo que conduce a la situación conocida como "estrés oxidativo" (Shalata *et al.*, 2001).

Se conocen dos tipos de sistemas antioxidantes: los enzimáticos, que incluyen a la familia de las superóxido dismutasas, la catalasa y las diferentes clases de peroxidasas (Bowler *et al.*, 1992), y los no enzimáticos, tales como el ácido ascórbico,

el glutatión reducido, los α -tocoferoles y los carotenoides. Los antioxidantes transforman a las ROS en moléculas menos perjudiciales antes de que reaccionen con estructuras vitales, o evitan su producción en exceso (Gil *et al.*, 1999; Shalata *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de los sistemas antioxidantes más importantes se resume en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Sistemas antioxidantes para la depuración de ROS (Bowler *et al.*, 1992).

SISTEMA ANTIOXIDANTE	MECANISMO
ENZIMÁTICOS Superóxido dismutasa (SOD) Catalasa (CAT) Peroxidasas (POX) Ascorbato peroxidasa (APX)	$\cdot O_2^- + \cdot O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ $H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$ $H_2O_2 + RH_2 \xrightarrow{POX} 2H_2O + R$ $H_2O_2 + 2Ascorbato \xrightarrow{APX} H_2O + 2MDHA$
NO ENZIMÁTICOS Ascorbato Glutatión	<p>Actúan como sustratos en las reacciones enzimáticas que constituyen el ciclo de Halliwell-Asada:</p>

SUPEROXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1.), es una metaloenzima que cataliza la dismutación del anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (Gil *et al.*, 1999).



La SOD determina las concentraciones celulares de O_2 y H_2O_2 , al eliminar los radicales superóxido presentes. Se conocen tres grupos de isoenzimas, que se clasifican según el cofactor metálico presente en su sitio activo y su localización subcelular: la Cu/ZnSOD, que se localiza en cloroplasto y citosol, la MnSOD en la matriz mitocondrial y peroxisomas, la FeSOD en el cloroplasto (Barna *et al.*, 1993; Del Río *et al.*, 2003). Cada una de ellas está codificada por un gen diferente, y regulada independientemente (Fridovich, 1995). Estas isoenzimas pueden separarse por medio de electroforesis nativa en geles de poliacrilamida y sus actividades pueden detectarse por medio de una tinción negativa. Pueden ser identificadas con base en su sensibilidad al KCN y H_2O_2 . La MnSOD resiste ambos inhibidores, la Cu/ZnSOD es sensible a ambos, mientras que la FeSOD es resistente a KCN, pero sensible a H_2O_2 (Spsychalla y Desborough, 1990).

El grupo de la FeSOD es probablemente el más antiguo. Se encuentra tanto en procariotes como en eucariotes; sin embargo la ausencia de SOD en animales ha dado lugar a proponer que el gene de la FeSOD se originó en los plástidos y se trasladó al genoma nuclear durante la evolución. La isoenzima FeSOD más comúnmente descrita en plantas superiores es un tetrámero de subunidades iguales

con una masa molecular de 80-90 kDa. Los miembros de este grupo contienen de 2 a 4 átomos gramos de fierro en su sitio activo (Alscher *et al.*, 2002).

La Cu/ZnSOD se encuentra en todos los compartimentos de la célula. Hay dos grupos diferentes de esta isoenzima. El primero incluye las formas citosólica y periplásmica, que son homodiméricas. En el segundo, se encuentran las formas cloroplástica y extracelular, ambas de naturaleza tetramérica (Alscher *et al.*, 2002). Los sitios activos de cada subunidad funcionan de manera independiente. Cada subunidad tiene unido un átomo de Cu^{2+} , esencial para su acción catalítica, y otro de Zn^{2+} que desempeña un papel estructural; éstos se sitúan en el extremo de un largo canal entre 2 asas de la cadena polipeptídica, de forma tal que el cobre queda parcialmente expuesto al disolvente (García *et al.*, 1995).

La MnSOD se encuentra en las mitocondrias y los peroxisomas. Contienen un sólo átomo de manganeso por subunidad. Estas enzimas no funcionan en ausencia de su cofactor metálico. Aunque la MnSOD y la FeSOD tienen una gran similitud a nivel de su estructura primaria, secundaria y terciara, estas enzimas divergen lo suficiente como para que el Fe (II) no pueda restaurar la actividad de la MnSOD y viceversa (Fridovich, 1986). La MnSOD puede ser una enzima homodimérica u homotetramérica con un átomo de Mn(III) por subunidad. Las enzimas vegetales tienen una similitud a nivel de secuencia del 65% entre sí, y también presentan gran similitud con las bacterianas (Bowler *et al.*, 1994).

LA SUPERÓXIDO DISMUTASA Y EL ESTRÉS AMBIENTAL

Distintas condiciones de estrés inducen la expresión de los genes que codifican las isoenzimas de SOD necesarias para proteger un compartimento

particular (Inzé y Van Montagu, 1995). La actividad de SOD en la respuesta a sequía varía entre las diferentes especies; por ejemplo, se observó un aumento en la actividad de SOD en plántulas de maíz (C₄) en comparación con las de trigo, cuya fijación de carbono es de tipo C₃ (Zhang y Kirkham, 1996).

La expresión de los transcritos de las Cu/ZnSOD cloroplástica y citosólica en *Conyza bonariensis* se incrementa después de un tratamiento con paraquat (herbicida) (Ye y Gressel, 2000). En tomate, la expresión de estas mismas isoenzimas es inducida por paraquat en presencia de luz, mientras que la sequía sólo induce a la citosólica (Perl-Treves y Galun, 1991). La actividad de esta misma isoenzima se incrementa cuando se somete a *Nicotiana plumbaginifolia* a altas temperaturas (Tsang *et al.*, 1991). Un incremento de la actividad de FeSOD se observa durante los períodos iniciales de exposición de *M. crystallinum* (C₃-CAM) a condiciones salinas, sugiriendo que las primeras manifestaciones lesivas de este estrés se presenten en el cloroplasto (Slesak *et al.*, 2002).

Por su parte, la expresión del transcrito para la MnSOD en plantas de trigo se incrementa por efecto de la falta de agua, mientras que la Cu/ZnSOD no parece ser inducida por sequía (Wu *et al.*, 1999). Se ha observado una mayor tolerancia al aluminio en plantas de *Brassica napus* que sobreexpresan la MnSOD (Basu *et al.*, 2001). Las líneas transgénicas de alfalfa con mayor actividad de MnSOD en los cloroplastos presentaron una recuperación más rápida del crecimiento después de un estrés de congelación, en comparación con las plantas control (McKersie *et al.*, 2000).

La sobreexpresión de una isoenzima de SOD está relacionada con una mayor tolerancia al estrés y mayor vigor de la planta, observándose un incremento en la

formación de raíces y hojas que se refleja como una mayor cantidad de carbohidratos y proteínas disponibles (McKersie *et al.*, 1999, 2000; Samis *et al.*, 2002).

La regulación de los genes SOD parece ser muy sensible al estrés ambiental, pues se han podido detectar diferentes niveles de los mRNAs de SOD en respuesta a una condición ambiental específica (Tsang *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1992).

Existen evidencias que sugieren que la manipulación de las capacidades antioxidantes de las plantas representa un enfoque valioso para la obtención de plantas tolerantes al estrés. Se ha propuesto que la sobreproducción de enzimas depuradoras de ROS en plantas transgénicas, podría tener un efecto protector contra el daño por estrés oxidativo (Inzé y Van Montagu, 1995).

Justificación

Aunque las bases moleculares y fisiológicas del rejuvenecimiento producido por el cultivo de tejidos no han sido estudiadas a profundidad, es lógico pensar que en dicho proceso deben estar implicados mecanismos de expresión diferencial del genoma.

Las plantas de henequén provenientes del cultivo *in vitro* muestran, a nivel de las plantaciones experimentales, características propias de plantas rejuvenecidas, como son: mayor vigor, mayor fijación de CO₂, una mejor productividad y tolerancia a condiciones ambientales adversas, por lo que podría suponerse que existan diferencias en cuanto a la eficiencia en el funcionamiento de sus sistemas antioxidantes. El estudio de la SOD constituye la primera aproximación al análisis de la eficiencia de los sistemas antioxidantes en las condiciones ambientales adversas a las que están sometidas las plantas de henequén. Si se demuestra que existe una

correlación entre la actividad de SOD y la mejoría en el desempeño de estas plantas, entonces se podría utilizar este parámetro para la selección de plantas con mejores rendimientos.

Hipótesis

Las plantas micropropagadas presentan diferencias metabólicas que las hacen más vigorosas, productivas y resistentes a condiciones ambientales adversas con respecto a las plantas que se propagan de manera tradicional; por lo tanto, una eficiente depuración de especies reactivas de oxígeno en estas plantas podría representar un posible mecanismo que explique su rejuvenecimiento.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de actividad y patrones isoenzimáticos de la superóxido dismutasa en plantas de *Agave fourcroydes* Lem., tanto en líneas clonales obtenidas a través de cultivo *in vitro*, como en las cultivadas de manera tradicional.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la actividad total de la superóxido dismutasa en hojas de plantas de *Agave fourcroydes* Lem., provenientes de líneas clonales obtenidas por cultivo *in vitro* y de aquéllas cultivadas de manera tradicional.
2. Determinar el patrón de las isoenzimas de la superóxido dismutasa en estas mismas plantas.

REFERENCIAS

- Abarca D., Martín M. y Sabater B. 1999. Respuestas de defensa en hojas jóvenes y senescentes de *Arabidopsis thaliana*. XIII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal, VI Congreso Hispano-luso de Fisiología Vegetal. <http://www.cartuja.csic.es/SEFV99/abstracts/senescencia/p.4-3.htm>
- Alscher R.G., Donahue J.L. and Cramer C.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plantarum* **100**: 224-233.
- Alscher R., Erturk N. and Heath L. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **53**: 1331 – 1341
- Barna B., Ádán L. and Király Z. 1993. Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* **80**: 420 – 422
- Basu U., Good A.G. and Taylor G.J. 2001. Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminum. *Plant Cell Environ.* **24**: 1269 – 1278
- Bestwick Ch.S., Adam A.L., Puri N. and Mansfield J.W. 2001. Characterization of changes to pro- and antioxidant enzyme activities during the hypersensitive reaction in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Sci.* **161**: 497-506
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M. and Inzé D. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci* **13**: 199 – 218
- Bowler C., Van Montagu M. and Inzé D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 83 – 116
- Burritt D. and Mackenzie S. 2003. Antioxidant metabolism during acclimation of *Begonia X erythrophylla* to high light levels. *Ann. Bot.* **91**: 1 – 12
- Castoreña-Sánchez I., Escobedo R.M. and Quiroz A. 1991. New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisalanae*. *Can. J. Bot.* **69**: 1257 – 1264
- Colunga P., Coello J., Espejo L. and Fuente L. 1993. Agave studies in Yucatán, México. II. Nutritional value of the inflorescence, peduncle and incipient domestication. *Econ. Bot.* **47**: 328 – 334
- Del Río L., Sandalio L., Altomare D. and Zilinskas B. 2003. Mitochondrial and peroxysomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **54**: 923 – 933

Eastmond A., Herrera J. y Robert M.L. 2000. La Biotecnología Aplicada al Henequén: Alternativas para el Futuro. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida. pp. 7 – 70

Foyer C., López-Delgado H., Dat J. and Scott I. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plantarum* **100**: 241 – 254

Fridovich I. 1986. Superoxide dismutases. In: *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Meister A. (Ed.). **58**: 61 – 97

Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 97 – 112

Gameley I.A. and Kluybin I.V. 1999. Roles of oxygen species: Signaling and regulation of cellular functions. *Int. Rev. Cytol.* **188**: 203 – 255

García T., García M., Clapes H., Rodes F. y García P. 1995. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **14**: 21-28

Gebicki J.M. and Bielski B.H. 1981. Comparison of the capacities of the perhydroxyl and superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 7020 – 7022

Gil L., Martínez G., González I. y Pérez J. 1999. Estrés oxidativo: Mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Bioquímica* **24**: 85 – 93

Inzé D. and Van Montagu M. 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 153 - 158

López E. 2001. Juvenilidad y rejuvenecimiento de plantas cultivadas *in vitro*. <http://www.ciencias.urna.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS27/27juvenil.html>

Martínez-Cayuela, M. 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharmaceutica* **39**: 5 - 18

McKersie B.D., Bowley S. and Jones K. 1999. Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **119**: 839 – 848

McKersie B.D., Murnaghan J., Jones K. and Bowley S. 2000. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival. A detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol.* **22**: 1427 – 1437

Miguélez Y. y Debergh P. 2003. Influencia de los métodos de rejuvenecimiento en el cultivo *in vitro* de plantas leñosas.

<http://www.bioplantas.cu/bioinformatica/Proceedings/INCA%20XIII/ponenecias/talleres/taller04/resumen4c/BV-P.20.pdf>

Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **15**: 473 - 497

Peniche P. 1985. Evolución histórica de la producción de henequén en Yucatán. En: *Biología y Aprovechamiento Integral del Henequén y Otros Agaves*. Cruz C, Del Castillo L., Robert M.L. y R.N. Ondarza (Eds.), Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida. pp 1 -15

Perl-Treves R. and Galun E. 1991. The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* **17**: 745 – 760

Piven N., Barredo F., Borges I., Herrera M., Mayo A., Herrera J. and Robert M. 2001. Reproductive biology of henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I. Gametophyte development. *Am. J. Bot.* **88**: 1966 – 1976

Programa Nacional de Solidaridad 1992-1994. Programa de desarrollo regional de la zona henequenera de Yucatán. Solidaridad, México. pp. 3 - 28

Quijano R.A., Herrera-Herrera J.L., Canul-Salazar M. and Robert M.L. 2002. Microbial disease affecting henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) plantations in México. *Revista Mexicana de Fitopatología* **20**

Ramírez J.L. 1985. Objetivos de la investigación agrícola en el cultivo del henequén. En: *Biología y Aprovechamiento Integral del Henequén y Otros Agaves*. Cruz C, Del Castillo L., Robert M.L. y R.N. Ondarza (Eds.), Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida. pp 121-126

Reyes J., Blanco A., Valdéz S. y Ramírez L. 1985. Interacción planta-insecto. En: *Biología y Aprovechamiento Integral del Henequén y Otros Agaves*. Cruz C, Del Castillo L., Robert M.L. y R.N. Ondarza (Eds.), Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida. pp 67-71

Robert M.L. y García A. 1985. El cultivo de tejidos vegetales y su posible aplicación en el mejoramiento genético de las Agavaceas. En: *Biología y Aprovechamiento Integral del Henequén y Otros Agaves*. Cruz C, Del Castillo L., Robert M.L. y R.N. Ondarza (Eds.), Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida. pp 83-89

Robert M.L., Herrera, J.L., Contreras F. and Scorer K.N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **8**: 37-48

Samis K., Bowley S. and McKersie B. 2002. Pyramiding Mn-superoxide dismutase transgenes to improve persistence and biomass production in alfalfa. *J. Exp. Bot.* **53**: 1343 – 1350

Scandalios G. J. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* **101**: 7-12

Shalata A., Mittova V., Volokita M., Guy M. and Tal M. 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol. Plantarum* **112**: 487 - 494

Simontacchi M., Galatro A. y Puntarulo S. 2001. El estrés oxidativo en las plantas. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy.* **10**: 60
<http://www.cienciahoy.org/hoy60/oxigeno.htm>

Slesak I., Miszalski Z., Karpinska B., Niewiadomska E., Ratajczak R. and Karpinski S. 2002. Redox control of oxidative stress responses in the C₃-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 669 - 677

Spychalla J. and Desborough S. 1990. Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiol.* **94**: 1214 - 1218

Tsang E.W., Bowler C., Hérouart D., Camp Van W., Villarroel R., Genetello C., Van Montagu M. and Inzé D. 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* **3**: 783 - 792.

Wu G., Wilen R., Robertson A. and Gusta L. 1999. Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiol.* **120**: 513 - 520

Ye B. and Gressel J. 2000. Transient, oxidant-induced antioxidant transcript and enzyme levels correlate with greater oxidant-resistance in paraquat-resistant *Coryza bonariensis*. *Planta* **211**: 50 - 61

Yu Q. and Rengel Z. 1999. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. *Plant Sci.* **142**: 1- 11

Zhang J. and Kirkham M. 1996. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytol.* **132**: 361 - 373

Capítulo 2

Materiales y Métodos

MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon plantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) seleccionadas en fase de vivero, provenientes de la localidad de Baca, Yucatán, ubicada a 42 km de la ciudad de Mérida. El muestreo se realizó en los meses de mayo (temperatura promedio de 36°C y sin precipitación pluvial), y julio del año 2002 (temperatura promedio de 34°C).

Este vivero fue establecido en el mes de junio de 2001, con la siembra de 5 líneas clonales micropropagadas (P17, P28, P34, P37, P46); cada línea clonal consistió de aproximadamente 200 plantas, distribuidas en tres hileras a una distancia de 20 x 30 cm (Figura 5).



Figura 5. Distribución de las líneas clonales localizadas en el vivero de Baca, Yuc.

Se sembraron también 1300 bulbillos provenientes de un mismo varejón de una planta del campo, los cuales están distribuidos de manera irregular sobre una superficie designada; éstas fueron utilizadas como plantas testigo (Figura 6).

Tanto las plantas testigo como las líneas clonales están sembradas sobre una mezcla de tierra y bagazo (subproducto de la desfibración de las hojas de henequén).

Se realizan evaluaciones mensuales de 30 plantas de cada línea clonal, a las que se midió la altura de la planta, número de hojas emitidas por mes y número total de hijuelos desarrollados. En el caso del cultivo de bulbillos no se hicieron estas mediciones. La selección de los individuos experimentales se realizó con base en su altura (para las líneas clonales y testigos) y el número total de hijuelos desarrollados (sólo para las líneas clonales, ya que en las plantas testigo no hay producción de hijuelos).

En el muestreo realizado durante el mes de mayo, se seleccionaron 3 líneas clonales: P28, P34 y P46, que presentaron la altura menor, intermedia y mayor, respectivamente. De cada línea clonal, se escogieron 3 plantas, de las que se tomó una hoja de la segunda roseta (Cuadro 2). En el caso de los bulbillos, se escogieron 5 plantas en zig-zag, que tuvieran una altura aproximada de 25 cm (Figura 6).

Durante el muestreo realizado en el mes de julio, se seleccionaron 6 plantas de cada una de las 5 líneas clonales: P17, P28, P34, P37, P46; incluidas las mismas plantas de las líneas clonales empleadas en el muestreo anterior (Cuadro 3). En el caso de los bulbillos, se utilizaron las mismas plantas muestreadas en el mes de mayo y se incluyeron 2 más, que tuvieran una altura aproximada de 32 cm (Figura 6). De cada planta se tomó una hoja de la segunda roseta. Es importante señalar que las plantas habían alcanzado una mayor altura.

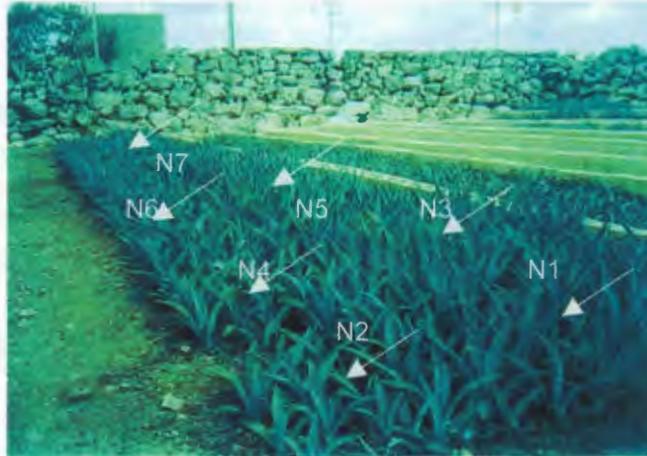


Figura 6. Distribución de los bulbillos. N1, N2, N4, N5, N6 fueron muestreados en mayo y julio; N3, y N7 sólo en julio.

Las hojas se transportaron al laboratorio en una nevera con hielo. Se cortaron y dividieron en muestras de 1 g, teniendo cuidado de separar la base, la parte media y la punta de la hoja. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C .

De cada hoja, se obtuvieron extractos para la determinación de la proteína soluble, así como de la actividad total y el patrón zimográfico de la superóxido dismutasa. Tanto las plantas testigo, como las líneas clonales, se procesaron simultáneamente.

Cuadro 2. Datos morfométricos de las plantas colectadas en mayo del 2002.

PLANTA	ALTURA DE LA PLANTA (cm)					NÚMERO DE HOJAS (hojas/mes)					NÚMERO DE VÁSTAGOS (vástagos/planta)				
	P17	P28	P34	P37	P46	P17	P28	P34	P37	P46	P17	P28	P34	P37	P46
	1	29	29.3	22.3	27.5	27.5	3	3	2	3	3	2	1	0	0
2	30	31.5	27.2	27.3	28.2	3	2	3	3	3	2	1	1	0	1
3	29	25	27	27	27	3	2	3	3	2	2	1	1	0	1
4	16.5	18.5	29	26	21	2	2	3	3	2	0	0	0	2	1
5	23.5	22.5	22.5	20.2	28.5	3	2	2	2	2	1	1	1	0	0
6	23.5	22.5	25.5	24	25.5	3	2	2	2	2	2	0	0	0	1
7	31.5	18	28.3	19	18	3	2	3	1	2	1	0	0	0	0
8	22	17.2	22.5	30	24.2	3	2	2	3	2	0	0	0	1	0
9	20.5	21.5	24	28	24	2	2	2	3	3	0	0	1	1	1
10	23	17	25.6	21.3	23.4	2	2	3	3	3	1	0	0	1	0
11	26	17.5	29	25	20.5	3	3	3	2	2	1	0	0	0	0
12	21	10.2	32	28	22.5	2	1	3	3	3	0	0	2	2	0
13	26	23.2	25	27.5	25.5	3	2	2	3	3	1	1	1	1	1
14	32	16	27.2	31.5	40	3	2	3	3	3	1	1	2	0	5
15	29.5	18.3	27.5	29	34	4	2	3	3	3	2	1	1	0	2
16	23	23	25.5	29.5	17.5	2	3	2	3	2	0	0	0	2	0
17	24	32	26.5	26.5	28	3	3	2	3	2	0	0	1	1	2
18	24	26.5	19.5	25	25	2	3	2	3	2	1	1	0	1	3
19	29	21.5	20	40	29.5	3	2	2	3	2	2	0	0	4	2
20	30.5	16.5	22	19	30.5	3	2	2	2	3	1	0	0	1	2
21	16.5	26	27	22	37	2	2	3	2	3	0	1	1	0	2
22	23.5	23.5	21.5	28.5	32	2	3	2	3	3	0	1	0	1	2
23	18.5	24.5	23	17.2	25.2	2	3	2	2	2	0	0	0	0	4
24	30	26	22.5	30	27	3	3	3	3	3	0	0	0	1	2
25	22.5	24	27.5	23	31	2	3	3	2	3	0	2	0	0	0
26	30	27	23.5	17	18	3	3	3	2	2	4	0	1	0	0
27	30.5	30.5	22.5	20.5	21.5	3	3	3	2	2	0	1	1	0	2
28	31	19.5	29	25.5	25.5	3	3	3	3	3	2	1	0	0	1
29	28.5	22.5	22.5	20.5	20.5	3	2	3	2	2	0	1	1	1	0
30	30	23	28	19	21.5	3	3	3	2	2	5	1	2	0	1
ALTURA PROMEDIO	25.82	21.79	25.44	25.15	25.91										

Las celdas sombreadas indican las plantas muestreadas

Cuadro 3. Datos morfométricos de las plantas colectadas en julio del 2002.

PLANTA	ALTURA DE LA PLANTA (cm)					NÚMERO DE HOJAS (hojas/mes)					NÚMERO DE VÁSTAGOS (vástagos/planta)				
	P17	P28	P34	P37	P46	P17	P28	P34	P37	P46	P17	P28	P34	P37	P46
1	37	37	28	37	38	3	3	2	3	3	2	2	1	1	2
2	36	27	32	37	36	4	2	3	2	2	3	1	3	0	2
3	37	29	34	37	35	4	3	2	1	3	2	2	2	1	3
4	22	23	40	32	27	2	2	2	3	2	0	1	1	3	1
5	29	33	30	26	36	3	3	3	1	3	1	1	1	0	1
6	22	29	33	31	22	4	2	3	1	2	2	1	0	3	0
7	38	23	37	26	22	1	1	3	2	1	4	0	1	1	2
8	26	22	32	37	30	2	1	2	3	3	0	1	3	2	1
9	26	28	28	36	32	2	3	3	3	3	0	0	3	1	2
10	29	25	33	37	30	2	2	2	3	3	1	0	0	2	0
11	33	27	36	31	25	3	3	3	2	2	3	1	0	0	2
12	27	16	44	34	30	3	2	2	3	3	0	0	7	4	5
13	31	27	30	39	32	3	2	0	2	2	2	1	3	2	1
14	39	24	35	40	52	4	1	3	3	4	1	1	3	0	5
15	38	25	37	39	45	2	3	3	2	2	3	1	1	0	4
16	30	29	33	41	25	5	5	5	5	4	1	0	0	1	2
17	32	41	34	35	36	4	5	5	5	4	2	2	3	3	2
18	31	37	26	33	34	4	5	4	5	5	2	2	1	2	4
19	40	27	26	51	36	5	4	4	5	5	2	1	1	4	4
20	40	21	32	25	35	6	4	5	4	5	0	1	1	2	3
21	23	33	32	30	46	3	5	5	4	5	0	1	2	3	0
22	28	32	27	37	40	4	5	4	5	5	0	2	0	3	3
23	23	30	30	23	31	4	5	4	4	5	0	0	0	1	5
24	37	33	28	35	35	5	4	5	5	5	1	0	0	1	1
25	27	32	36	35	40	4	5	5	5	5	0	2	2	2	1
26	42	32	29	21	23	5	5	4	4	4	4	2	0	1	0
27	38	27	32	30	28	5	4	5	4	4	1	0	2	1	1
28	40	28	35	33	32	5	4	5	5	5	4	2	0	0	3
29	38	31	32	26	28	5	4	4	4	4	3	1	1	1	0
30	38	25	34	25	26	5	4	5	4	4	7	1	2	1	1
ALTURA PROMEDIO	33	28	32	33	33										

Las celdas sombreadas indican las plantas muestreadas

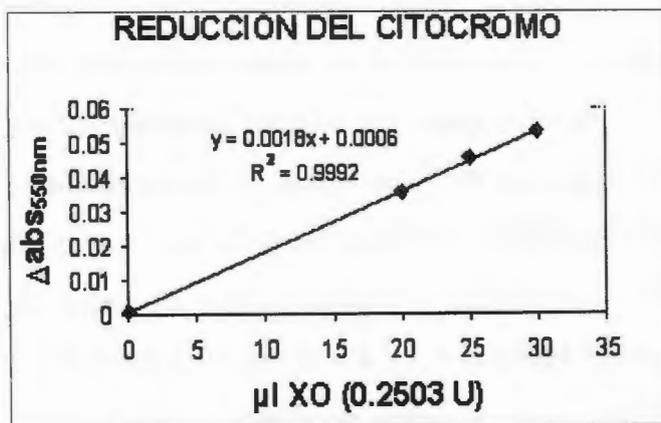
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA SUPERÓXIDO DIMUTASA

Los extractos se obtuvieron a partir de la parte media de la hoja. Un gramo de material congelado se trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, al que se agregó 1 ml de buffer de fosfatos 100 mM, pH 7; EDTA, 1.5 mM; polivinilpolipirrolidona, 5% (p/p), y se homogeneizó con un politrón durante 1 minuto a velocidad máxima (relación 1:1 p/v). El homogeneizado se centrifugó a 18,000xg durante 15 minutos. El sobrenadante se separó y filtró a través de papel Whatmann #1, el filtrado se desaló empleando una columna de Sephadex-G25, previamente equilibrada con buffer de carbonatos 50 mM, pH 10.2; EDTA, 0.1 mM. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C.

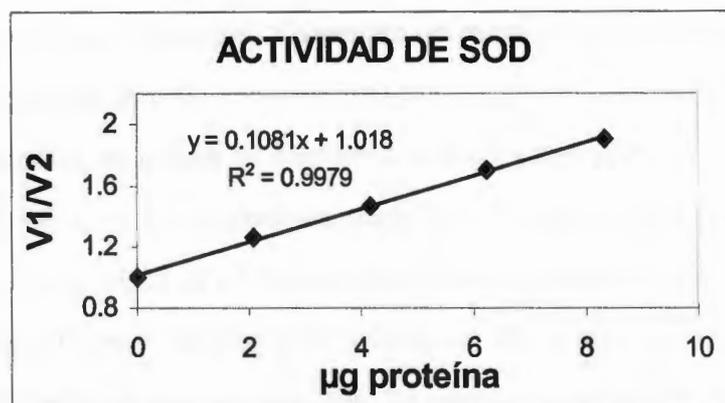
Para determinar la actividad específica de la SOD, se utilizó la técnica de Sychalla y Desborough (1990), la cual se basa en el acoplamiento de dos reacciones: la primera es la reacción xantina/xantina oxidasa (XO), que actúa como fuente de radicales superóxido y la segunda, es la reducción del citocromo C, como indicador de la producción del superóxido. La superóxido dismutasa presente en el extracto compite por el radical superóxido inhibiendo la reducción del citocromo C.



Una unidad de SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la reducción del citocromo C, bajo condiciones óptimas de medida. La mezcla de reacción contenía buffer de carbonatos 50 mM, pH 10.2; EDTA, 0.1 mM; citocromo C, 0.039 mM y xantina, 0.197 mM. El ensayo se inició con la adición de suficiente xantina oxidasa para producir una velocidad de reducción del citocromo C, que se manifiesta como un cambio de absorbancia de 0.035 unidades/minuto (V1), a una longitud de onda de 550 nm (Gráfica 1). La actividad específica de SOD se obtuvo dividiendo la V1 entre la velocidad V2, que corresponde a la rapidez de la inhibición de la reducción del citocromo. La V2 se calculó midiendo la misma reacción en presencia de la SOD del extracto de henequén. Cuando $V1/V2=2$, la reducción del citocromo C está inhibida en un 50% y el resultado se reportó como Unidades/mg de proteína (Gráfica 2).



Gráfica 1. Reducción del citocromo C; 20 μl de XO (0.005 U) son suficientes para producir un cambio de absorbancia de 0.035 unidades/min (V1).



Gráfica 2. Actividad total de SOD, se observa la inhibición de la reducción del citocromo C en presencia de la enzima en el extracto de henequén (V2).

ZIMOGRAFÍA

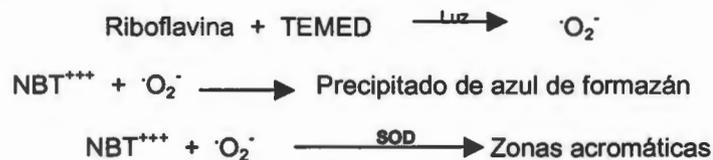
Para determinar el patrón isoenzimático de la superóxido dismutasa, el material congelado (1 g) se trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, al que se le agregó 1 ml de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7; EDTA, 1.5 mM; polivinilpirrolidona, 5% (p/p); fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 0.5 mM; glicerol, 10% (p/v), y se homogeneizó con un politrón durante 1 minuto a velocidad máxima. El homogeneizado se centrifugó a 18,000xg durante 15 minutos. El sobrenadante se separó y concentró añadiendo 5 mg de Sephadex-G25 sin hidratar y centrifugando 30 segundos. En caso de ser necesario, se procedió a reconcentrar la muestra. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

La separación de las proteínas se realizó a través de electroforesis en minigeles del sistema mini Protean II de Biorad: 3 ml de gel separador al 10% de acrilamida (stock 29.2%:0.8%, acrilamida-bis-acrilamida) en Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, y

1.5 ml de gel concentrador al 4 % en Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8. Los geles fueron de 0.75 mm de espesor, y se cargaron con 70 µg de proteína por carril. La separación electroforética se llevó a cabo con amortiguador Tris-glicina 0.33 M, pH 8.3, durante aproximadamente 3.5 horas o hasta que el frente del colorante indicador (azul de bromofenol) llegó al borde del gel.

Tras la electroforesis, la actividad de SOD se reveló por tinción negativa. Para ello, el gel se incubó durante 30 min en obscuridad a 4°C en una mezcla de solución A, que contenía riboflavina, 0.06 M; TEMED, 0.651%; buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.8 y solución B (nitroazul de tetrazolio, 2.5 mM; buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.8) en una relación 1:1. Posteriormente, se sustituyó la solución de tinción por agua destilada y se iluminó el gel con un transiluminador de luz visible durante 15 min a 4°C.

El anión superóxido producido por la riboflavina, el TEMED y la luz provocan la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), formándose las sales insolubles de formazán que colorean el gel. La superóxido dismutasa presente en el extracto inhibe esta reducción, por lo que su actividad se observó como zonas acromáticas (Beauchamp y Fridovich, 1971).

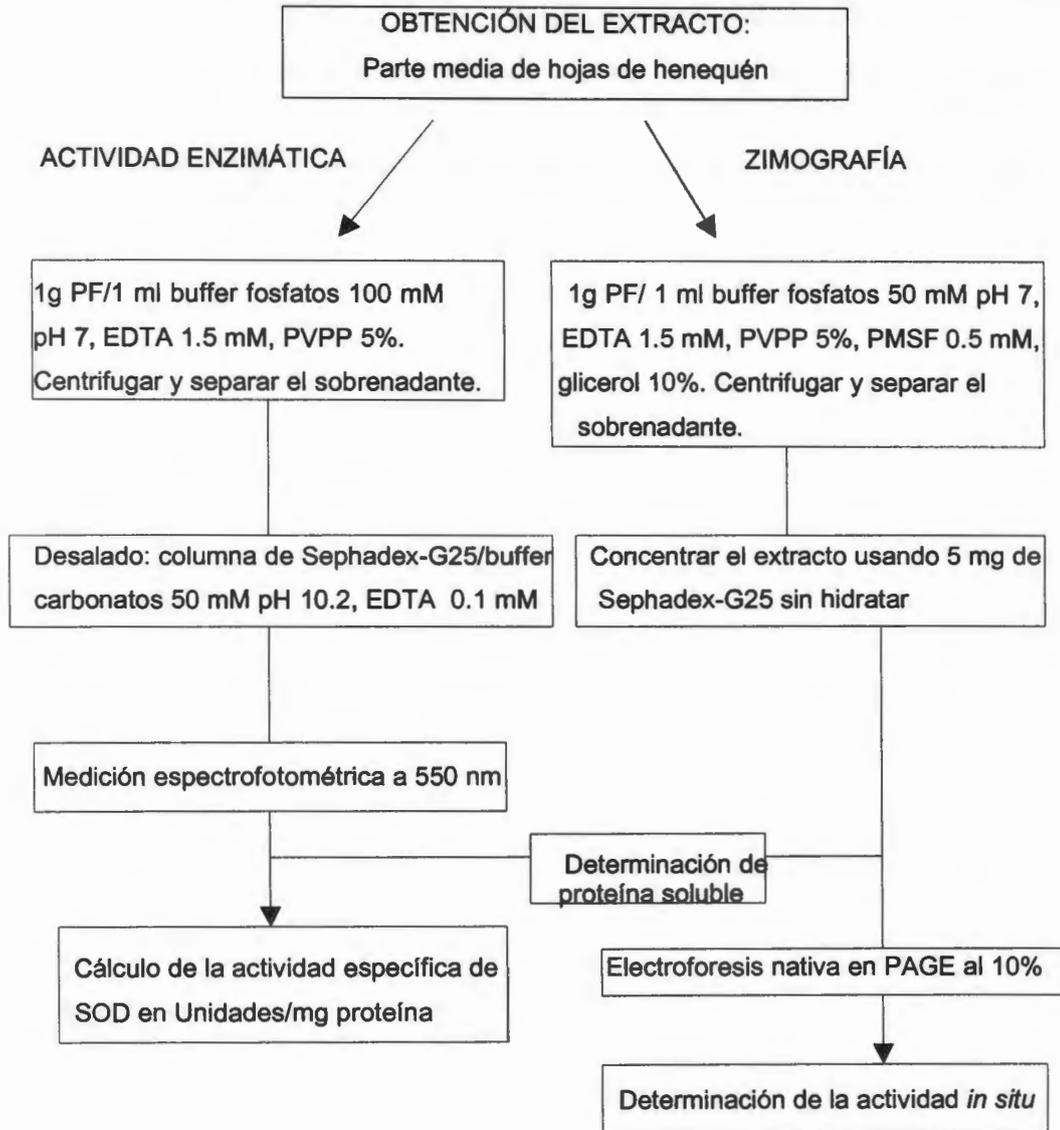


DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

La proteína total se determinó por el método de Peterson (1977), tomando como estándar albúmina sérica bovina fracción V. Para este procedimiento, un

volumen dado de la muestra se incubó con 100 μ l de desoxicolato de sodio 0.15% durante 10 min a temperatura ambiente y luego, 15 min a 4°C. La proteína se precipitó agregando 100 μ l de ácido tricloroacético 72% frío y dejando incubar durante 20 min. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en un 1 ml de agua destilada y se le añadió una mezcla de partes iguales de CTC (carbonato de sodio, 10%; sulfato de cobre, 0.1%; tartrato de sodio-potasio, 0.2%) SDS 10%, NaOH 0.8 N y agua destilada en ese mismo orden. La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y finalmente, se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu (1:6). Las muestras se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbencia de las muestras a una longitud de onda de 750 nm. La cantidad de proteína se reportó como μ g/ μ l.

ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA



REFERENCIAS

Beauchamp C. and Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**: 276 – 287

Peterson L.G. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346 - 356

Spychalla J. and Desborough S. 1990. Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiol.* **94**: 1214 – 1218

Capítulo 3

Resultados y Discusión

Dado que las plantas micropropagadas de *Agave fourcroydes* L. presentan características propias de plantas rejuvenecidas, tales como mayor vigor, tasas fotosintéticas aumentadas, mayor productividad y tolerancia a condiciones ambientales adversas (Eastmond *et al.*, 2000; Robert M.L., comunicación personal), se podría suponer que también existen diferencias en la eficiencia del funcionamiento de los sistemas antioxidantes. El hecho de que haya una mayor fijación de CO₂ y altas tasas fotosintéticas apunta hacia una producción aumentada de ROS, en específico del anión superóxido, por lo que la determinación de la actividad total y el patron isoenzimático de la superóxido dismutasa constituye una primera aproximación en el estudio de los sistemas encargados de depurar estas especies reactivas en las células vegetales.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SOD EN PLÁNTULAS DE AGAVE

En primera instancia, se procedió a determinar la actividad de la superóxido dismutasa en plántulas en fase de multiplicación *in vitro* con el fin de estandarizar la medición. Dado que las hojas de los agaves son suculentas, existe el problema de que los extractos proteicos que se obtienen están diluidos, por lo que, fue necesario concentrar las muestras adicionando Sephadex G-25. Este método permite la eliminación del agua sin alterar o modificar las proteínas presentes en el extracto.

La actividad específica de SOD en hojas de plántulas de henequén en fase de multiplicación fue de 10.47 U/mg proteína.

Una vez detectada esta actividad, se procedió a realizar la separación de las isoenzimas, lo cual se llevó a cabo mediante un análisis electroforético no desnaturizante. En la figura 7 se presentan los patrones obtenidos con diferentes concentraciones de proteína, lo que permitió establecer que se necesitaban alrededor de 70 μg de proteína por carril para obtener una buena resolución de las bandas. Es notable el hecho de que en las hojas de plántulas de agave se encuentren 9 bandas de actividad, cuando en otros sistemas, por lo general, solamente se encuentran entre 3 y 5 bandas. En *Lycopersicon esculentum* Mill. se han determinado solamente tres bandas (Escobedo y Miranda-Ham, en preparación).

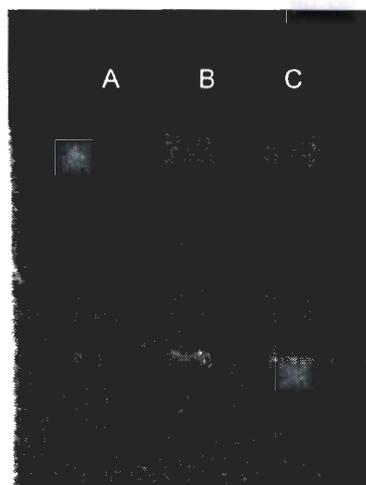


Figura 7. Determinación del patrón isoenzimático presente en plántulas de henequén en fase de multiplicación *in vitro*. A. Extracto crudo (28 μg de proteína), B. 54 μg de proteína, C. 68 μg de proteína.

Para cumplir con los objetivos establecidos, se muestrearon hojas de henequén en fase de vivero de diferentes líneas clonales y de bulbillos provenientes de un mismo varejón de una planta de campo, los cuales fueron utilizados como testigos. El muestreo se realizó durante el mes de mayo, que en el estado de Yucatán corresponde a la temporada de secas.

Las líneas clonales muestreadas fueron la P28, la P34 y la P46, de las cuales se tomaron hojas de la segunda roseta de cuando menos tres plantas diferentes (Ver cuadro 2, capítulo II). Tanto en las líneas clonales como en las plantas testigo muestreadas, las actividades específicas calculadas variaron entre 91.44 hasta 114.6, con un promedio de 100 ± 4 Unidades/mg de proteína. Estos resultados indican que no existe una diferencia significativa con respecto a la actividad total de SOD entre dichas plantas. La actividad específica de cada muestra, así como el número de réplicas por determinación, el promedio y la desviación estándar, se encuentran enlistados en el Anexo 1.

En la figura 8 se muestran los patrones zimográficos representativos de plantas testigos y de cada una de las líneas clonales. Para realizar este estudio, se aumentó la cantidad de muestra a 2 g de peso fresco para hacer más conspicuas las bandas. En todos los casos se observaron alrededor de 7 bandas, siendo la primera y la última, las de mayor intensidad.

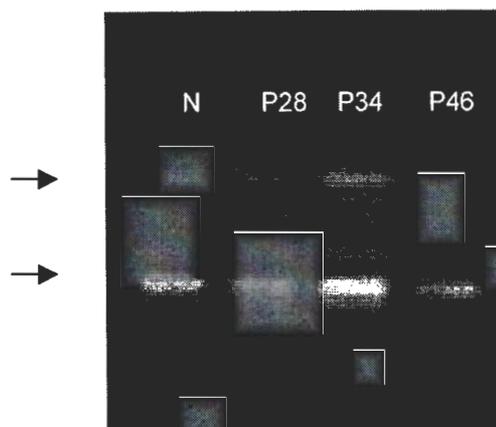


Figura 8. Patrón zimográfico comparativo entre hojas de plantas de henequén en fase de vivero. N, planta testigo (bulbillo); P28, P34 y P46, líneas clonales. La cantidad de proteína cargada fue de 70 μ g.

ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE SOD EN PLANTAS EN FASE DE VIVERO

Una vez estandarizadas las condiciones para la medición de la SOD en hojas de plantas de hojas de *Agave fourcroydes* L. en fase de vivero, se procedió a realizar un muestreo más representativo y homogéneo que comprendiera a todas las clonas existentes en el vivero de Baca, por lo que se aumentó el número de plantas muestreadas por línea clonal, así como de las plantas testigos. Los detalles del muestreo se pueden consultar en el cuadro 3 del capítulo II. Esta colecta de muestras se realizó en el mes de julio de 2002, en el cual se inicia la temporada de mayor precipitación pluvial.

En la figura 9 se muestra la comparación de las actividades específicas determinadas en las plantas testigo y las diferentes líneas clonales. Cada barra representa el promedio de todas las determinaciones realizadas en cada una de las

plantas, tanto las testigos como las diferentes líneas clonales. Los detalles sobre las determinaciones de la actividad total de SOD en cada muestra, así como su análisis estadístico se presentan en el anexo 2.

Los resultados observados indican que no existen diferencias significativas en las actividades específicas de SOD encontradas en las plantas testigo y las de las diferentes líneas clonales; aún más, puede detectarse que existe homogeneidad en los resultados obtenidos para las plantas micropropagadas.

Es importante hacer notar que existe un aumento de un orden de magnitud en los datos obtenidos para la actividad total de SOD en las plántulas en fase de multiplicación *in vitro* y las plantas de las líneas clonales en fase de vivero (10 y 100 Unidades/mg de proteína, respectivamente). En general, en las plántulas *in vitro* no se desarrolla la capacidad fotosintética por completo, dado que el medio de cultivo contiene sacarosa disponible como fuente de carbono. Las hojas de estas plántulas tienen un aspecto blando y fino, y sus células de palizada son pequeñas y se encuentran en número menor que en las plántulas crecidas *ex vitro*. Además, los estomas no son funcionales y permanecen abiertos la mayor parte del tiempo, y la cutícula está escasamente desarrollada (Castro Concha, 1989; Salisbury y Ross, 1994; Payton *et al.* 2001). Al estar en un ambiente que induce la heterotrofia, se esperaría una producción de ROS muy baja y por lo tanto, no se requerirían elevadas actividades de las enzimas antioxidantes, en este caso, de SOD.

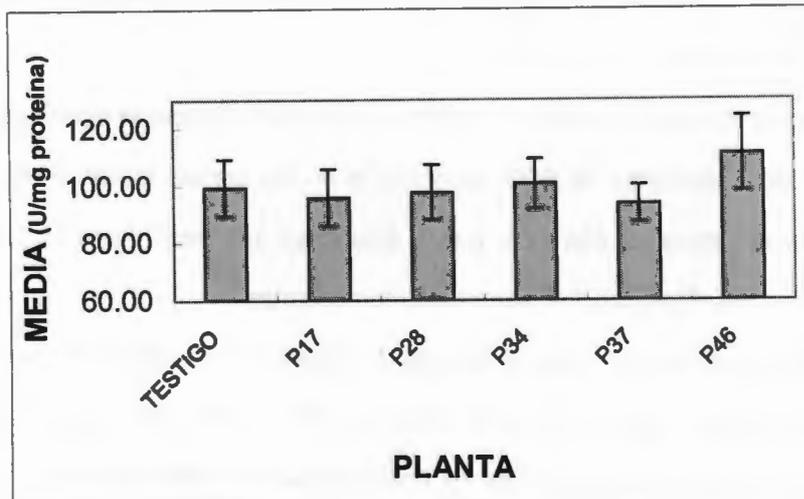


Figura 9. Determinación de la actividad total de SOD en las plantas testigo y las diferentes líneas clonales. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar.

Resulta interesante el hecho de que las plantas de henequén presenten una elevada actividad de SOD, en comparación con las reportadas para otras especies de plantas que poseen fijación de carbono de tipo C3 y C3-CAM (cuadro 4); sin embargo, están en el mismo orden que presentan plantas como *Mesembryanthemum crystallinum* L., que tiene una fijación de carbono del tipo CAM. Poseer una fijación de carbono tipo CAM, con hojas gruesas, cutícula gruesa y bajas tasas de transpiración, característica de las plantas suculentas; confiere a esta especie, ventajas para tolerar las condiciones de sequía y un flujo de fotones intenso. (Salisbury y Ross, 1994).

Cuadro 4. Diferentes actividades específicas de SOD calculadas en extracto de hojas de diversas especies de plantas.

PLANTA	FIJACIÓN DE CARBONO	ACTIVIDAD DE SOD U/mg proteína	REFERENCIA
<i>Begonia x erythrophylla</i>	C3	10	Burritt y Mackenzie, 2003
<i>Phaseolus aureus</i>	C3	19.5	Kumar <i>et al.</i> , 2002
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	C3	8.2	Escobedo, 2002
<i>Najas gramenia</i>	C3	12	Rout y Shaw, 2001
<i>Helianthus annuus</i>	C3	35	Zhang y Kirkham, 1996
<i>Oryza sativa</i> L.	C3	40	Hee D. <i>et al.</i> , 2001
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> L.	C3-CAM	300	Miszalski <i>et al.</i> , 1998
<i>Agave fourcroydes</i> Lem.	CAM	100	Betancourt <i>et al.</i> , en preparación.

PATRONES ZIMOGRÁFICOS DE SOD EN PLANTAS EN FASE DE VIVERO

Se determinaron los patrones isoenzimáticos de las diferentes líneas clonales, así como de las plantas testigo. La figura 10 muestra algunos de los patrones zimográficos, en donde la actividad de SOD se observa como bandas acromáticas.

Este sistema revela la presencia de alrededor de 7 bandas de actividad de SOD en los extractos proteicos de hojas de *Agave fourcroydes* L., tanto en las plantas testigo como en las micropropagadas. Se puede observar, que ambos tipos de plantas presentan, en general, un mismo patrón isoenzimático, en el que sobresalen dos bandas más conspicuas, una de muy lenta movilidad y la de más rápida migración.

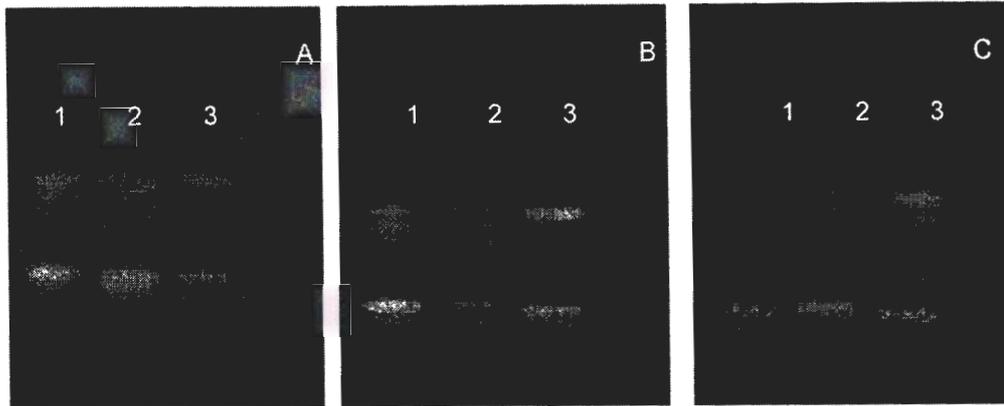


Figura 10. Patrón zimográfico de hojas de henequén en fase de vivero. Los carriles A1, B1 y C1 corresponden a los patrones zimográficos de las plantas testigo N2, N3 y N4, respectivamente. El carril B2 corresponde a una planta de la clona P17; el carril C2 corresponde a una planta de la clona P28; los carriles A2 y C3 corresponden a dos plantas diferentes de la clona P34; el carril A3 corresponde a una planta de la clona P37; el carril B3 corresponde a una planta de la clona P46. En todos los casos se cargaron 70 μ g proteína

Cuando se identificaron las isoenzimas, con base en su sensibilidad a los inhibidores KCN y H_2O_2 (Spychalla y Desborough, 1990), se demostró que la MnSOD (resistente a ambos inhibidores) migra con menor movilidad, mostrando mayor masa molecular; mientras que la Cu/ZnSOD (sensible a ambos inhibidores) aparece con la menor masa molecular. Al parecer esta última isoenzima, la Cu/ZnSOD, se ha visto más comunmente ligada a la tolerancia al estrés provocado por sequía, donde la producción de ROS en los cloroplastos se presenta de forma activa.

La identificación de las diferentes isoenzimas en los extractos de hojas de henequén no estaba contemplada como uno de los objetivos de esta tesis; sin embargo, el patrón zimográfico obtenido nos podría permitir especular que la banda de más lenta movilidad podría tratarse de la isoenzima mitocondrial (MnSOD),

mientras que las de más rápida movilidad podrían ser las isoenzimas de Cu/ZnSOD citosólica y cloroplástica (Miszalski *et al.*, 1998).

Con base a lo anterior, sería interesante profundizar el estudio de las isoenzimas ligadas a la depuración de ROS en el cloroplasto y la mitocondria, pues podrían resultar los marcadores genéticos que permitan seleccionar plantas más aptas para enfrentar condiciones ambientales adversas.

REFERENCIAS

Burritt D. and Mackenzie S. 2003. Antioxidant metabolism during acclimation of *Begonia X erythrophylla* to high light levels. *Ann. Bot.* **91**: 1 – 12

Castro Concha L.A. 1989. Estudio comparativo de las enzimas relacionadas con el metabolismo nitrogenado en plantas normales y vitrificadas de *Agave* spp. Tesis de Maestría en Biotecnología (Procesos Vegetales). Instituto Tecnológico de Mérida/CICY.

Escobedo Gracia-Medrano R.M. 2002. Estudios sobre el estrés oxidativo en células de *Lycopersicon esculentum* Mill. Tesis de doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. CICY

Hee D., Sang Y. and Bum C. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* **158**: 737 - 745

Kumar R., Kumar P., Nand P. and Singh S. 2002. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Sci.* **162**: 381 – 388

Miszalski Z., Slesak I., Niewiadomska E., Baczek-Kwinta R., Lüttge U. and Ratajczak R. 1998. Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C3-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Environm.* **21**: 169 – 179

Payton P., Webb R., Kornyejev D., Allen R. and Holaday S. 2001. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *J. Exp. Bot.* **52**: 2345 - 2354

Rout N.P. and Shaw B.P. 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidant enzymes. *Plant Sci.* **160**: 415 – 423

Salisbury F. y Ross C. 1994. Fisiología Vegetal. Cuarta edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D. F. pp. 249 – 291

Spychalla J. and Desborough S. 1990. Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiol.* **94**: 1214 – 1218

Zhang J. and Kirkham M. 1996. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytol.* **132**: 361 – 373

Capítulo 4

Conclusiones y Perspectivas

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo permite formular las siguientes conclusiones:

- La actividad total de SOD determinada en hojas de plántulas de henequén en fase de multiplicación *in vitro* es de 10.47 U/mg de proteína, mientras que para las plantas en fase de vivero corresponde a 100 ± 4 U/mg de proteína. Es importante hacer notar que existe una diferencia de 10 veces más en las plantas que están en el vivero. Cabe recordar que las plantas en fase de vivero han pasado por una fase de aclimatación previa a su traslado al campo; la aclimatación de las plantas *in vitro* a condiciones *ex vitro* resulta crucial para el desarrollo de estructuras autotróficas, y posiblemente capacidades antioxidantes que les permitan hacer frente al medio ambiente a las que estarán sometidas (Carvalho y Amancio, 2002).
- No se encontraron diferencias a nivel de actividad total, ni en el patrón isoenzimático de la SOD en las plantas cultivadas de manera tradicional y las provenientes de un cultivo *in vitro* en fase de vivero. Es posible que durante esta fase no se presenten diferencias en la actividad de SOD, debido a que ambos tipos de plantas se encuentran sembradas sobre una cama de bagazo, la cual promueve la conservación y disponibilidad de agua. Incluso, no se observan diferencias a nivel fenotípico entre ambos tipos de plantas.

- El análisis de los patrones isoenzimáticos demostró la presencia de más de una isoenzima, lo que podría dar a esta especie una amplia versatilidad a las plantas de henequén para enfrentar los cambios ambientales (Salisbury y Ross, 1994).
- Al comparar las actividades específicas observadas en diferentes especies de plantas, es claro que las plantas de henequén en fase de vivero se encuentran en niveles parecidos a los de otras plantas con fijación de carbono tipo CAM, como *Mesembryanthemum crystallinum* L. El hecho de que estas plantas posean actividades elevadas de SOD podría indicar que éstas requieren depurar una mayor cantidad de ROS, con el fin de mantener la homeostasis de los sistemas redox, dados los ambientes donde comúnmente se desarrollan.

Las futuras investigaciones relacionadas con el proceso de rejuvenecimiento y sistemas antioxidantes en las plantas de henequén, deberán enfocarse hacia las diferentes fases de cultivo de esta planta, sobre todo en aquellas en donde las características fenotípicas entre un cultivo tradicional y el de plantas micropropagadas se hacen evidentes. El análisis zimográfico nos sugiere la importancia de realizar pruebas de inhibición para así identificar las diferentes isoenzimas y poder asignarles un papel en la tolerancia a las condiciones de estrés en estas plantas. Así mismo, resultaría interesante observar la eficiencia de los sistemas antioxidantes bajo la inducción de diferentes tipos de estrés en ambos tipos de plantas.

La realización de nuevas investigaciones surgidas a partir de los resultados obtenidos en esta tesis ayudarán al entendimiento del proceso de rejuvenecimiento de

las plantas inducido por el cultivo *in vitro*; así como al planteamiento de un procedimiento para la obtención de plantas de henequén con mejores rendimientos enfrentando los retos de la industria henequenera, que demanda la sociedad yucateca involucrada en su cultivo, y favorecer así, el desarrollo de nuestro país.

REFERENCIAS

Carvalho L. and Amancio S. 2002. Antioxidant defence system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. *Plant Sci.* **162**: 33 – 40

Salisbury F. y Ross C. 1994. Fisiología vegetal. Cuarta edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México. pp. 249 – 291

Anexo 1

Actividad específica de SOD en cada una de las plantas muestreadas durante el mes de mayo de 2002 en la localidad de Baca, Yucatán.

PLANTA (CLONA)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)		
	REPLICAS	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
N1	3	95.95	4.54
N2	3	94.30	3.54
N4	4	104.85	2.66
N5	3	106.28	3.98
N6	3	112.29	0.66
P28(2)	3	97.90	4.21
P28(5)	3	93.32	1.29
P28(27)	3	91.44	6.94
P34(5)	3	92.77	4.50
P34(8)	5	99.67	3.97
P34(29)	3	110.31	4.56
P46(3)	2	107.31	3.75
P46(6)	3	91.65	0.76
P46(28)	2	114.56	2.25

Cálculo de la media y la desviación estándar de las determinaciones de la actividad de SOD de todas las plantas testigo y las diferentes líneas clonales. Los datos corresponden al muestreo realizado durante el mes de mayo de 2002.

PLANTA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)	
	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
N	102.75	7.52
P28	94.22	3.32
P34	100.91	8.83
P46	104.52	11.73

Anexo 2

Actividad específica de SOD en cada una de las plantas muestreadas durante el mes de julio de 2002 en la localidad de Baca, Yucatán.

PLANTA (CLONA)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)		
	RÉPLICAS	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR
N1	6	94.27	3.94
N2	3	107.53	4.53
N3	6	93.04	2.92
N4	4	94.95	1.71
N5	6	88.35	4.46
N6	4	116.99	2.67
N7	4	101.25	1.02
P17(6)	3	86.74	3.24
P17(11)	3	85.33	3.12
P17(13)	3	102.73	3.04
P17(16)	3	107.70	0.43
P17(17)	3	103.62	5.99
P17(18)	3	89.40	2.18
P28(2)	3	92.99	2.21
P28(5)	3	85.37	2.09
P28(13)	3	107.68	2.92
P28(19)	4	105.63	2.36
P28(27)	3	89.05	4.23
P28(30)	3	104.95	4.34
P34(2)	3	107.97	1.71
P34(5)	4	84.48	3.83
P34(8)	3	107.00	5.97
P34(21)	4	103.89	2.13
P34(27)	3	98.64	1.43
P34(29)	3	102.09	3.01
P37(4)	3	86.54	2.54
P37(6)	3	93.07	4.19
P37(10)	3	92.77	2.98
P37(18)	3	104.64	3.31
P37(21)	3	88.77	2.36
P37(25)	3	96.47	2.96
P46(3)	2	121.14	0.95
P46(6)	3	117.22	4.94
P46(18)	3	103.30	4.09
P46(20)	3	92.04	5.19
P46(28)	3	122.35	0.95

Cálculo de la media y la desviación estándar de las determinaciones de la actividad de SOD de todas las plantas testigo y las diferentes líneas clonales. Los datos corresponden al muestreo realizado durante el mes de julio de 2002.

PLANTA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg proteína)	
	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
N	99.48	9.89
P17	95.92	9.83
P28	97.61	9.63
P34	100.68	8.62
P37	93.71	6.39
P46	111.21	13.12

