

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
UNIVERSIDAD DE LA HABANA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**LOS BRASINOESTEROIDES Y SU RELACIÓN CON LA TOLERANCIA DE
PLÁNTULAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) ANTE EL CHOQUE
POR TEMPERATURA ALTA.**

Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: M.Sc. LUIS MIGUEL MAZORRA MORALES

Tutores: Inv. Tit. Lic. Miriam Núñez Vázquez, Dr. C.

Prof. Lic. Gerard James Bishop, PhD

La Habana, 2008

Citación adecuada

Mazorra, L.M. Los brasinoesteroides y su relación con la tolerancia de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ante el choque por temperatura alta. [Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias] La Habana: Universidad de la Habana, 2008. 99 p.

SÍNTESIS

El trabajo tuvo como objetivo fundamental demostrar el papel del contenido y el reconocimiento de los BRs en la termotolerancia de plántulas de tomate y su vínculo con la regulación de la enzima peroxidasa y el estrés oxidativo inducido por la temperatura alta. Para ello se determinó la termotolerancia, el estrés oxidativo y la actividad de esta enzima en plántulas de tomate de genotipos con diferente contenido del brasinoesteroide castasterona (CS) tratadas o no con la 24-epibrasinólida (EBL). Se demostró que al incrementar el contenido de los BRs (exógeno ó endógeno) se promueve el crecimiento a través de la inducción de estrés oxidativo y de la actividad peroxidasa. Se demostró que las respuestas de los brasinoesteroides dependen de la concentración y que el crecimiento es más sensible a la hormona que la termotolerancia. Además, el reconocimiento de los brasinoesteroides puede desencadenarse por vías dependientes e independientes de la activación del dominio quinasa del receptor tBRI1. Se demostró que la promoción de la termotolerancia puede ser mediada por la activación de la enzima peroxidasa y la inhibición del estrés oxidativo inducido por el choque térmico.

También se examinó si dos análogos espiroestánicos de la castasterona pueden inducir la termotolerancia y regular el estrés oxidativo en plántulas de tomate var. Amalia, demostrándose la capacidad superior del análogo A (25(R) 2 α ,3 α ,5 α trihidroxi-espirostan-6-ona) respecto al B (25(R) 2 α ,3 α dihidroxi 5 α espirostan-6-ona) de inducir la termotolerancia, efecto que dependió poco de la protección contra la oxidación en las plántulas de este genotipo.

1. INTRODUCCIÓN

Los efectos de las temperaturas altas se traducen en diferentes tipos de daños al vegetal (Wheeler *et al.*, 1997; Leithold *et al.*, 1997; Crafts-Brandner y Salvucci, 2000). Entre los efectos de la temperatura alta se encuentra la generación del estrés oxidativo (Larkindale y Knight, 2002). En condiciones de estrés por temperaturas elevadas y luz, se acelera la producción de especies activas de oxígeno (ROS), debido fundamentalmente al incremento de los flujos de electrones hacia el oxígeno (Dat *et al.*, 2000).

Para mantener el crecimiento en condiciones de temperatura alta y proteger sus tejidos ante el estrés oxidativo, las plantas expresan una diversidad de mecanismos en que participan las proteínas de choque térmico (HSPs), metabolitos antioxidantes y las enzimas secuestradoras de ROS (Burke, 2001; Sato *et al.*, 2001; Vacca *et al.*, 2004), entre estas últimas se destacan la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la ascorbato peroxidasa (APX). En las plantas sometidas al estrés por temperatura alta puede inhibirse la actividad de las enzimas SOD, APX y CAT, responsables de catalizar la reducción del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En tales condiciones, del balance entre el nivel de generación de ROS y la capacidad secuestradora antioxidante del tejido dependerá la habilidad de la planta de sobrevivir la situación adversa (Scandalios *et al.*, 1997).

Por otra parte, la actividad peroxidasa ha sido implicada en el crecimiento y en las respuestas de las plantas al estrés, incluyendo las temperaturas altas (Rivero *et al.*, 2001, 2003, 2004). Esta enzima antioxidante puede actuar como secuestradora del H₂O₂, y en ciertas ocasiones también participa en la generación de las ROS y la peroxidación lipídica (Passardi *et al.*, 2004). Estas acciones de las peroxidasas se sustentan en dos posibles ciclos catalíticos, el peroxidativo y el hidroxílico (Hiraga *et al.*, 2001; Liskay *et al.*, 2003; Passardi *et al.*, 2004).

Los brasinoesteroides (BRs) son considerados hormonas esenciales para el crecimiento de las plantas. En la promoción del crecimiento en condiciones normales los BRs actúan a muy bajas concentraciones (Clouse y Sasse, 1998); sin embargo, se ha observado que ellos inducen la termotolerancia de las plantas a concentraciones relativamente elevadas (Wilén *et al.*, 1995; Dhaubhadel *et al.*, 1999; Singh y Shono, 2005). Los BRs induce la expresión de genes POX en la estimulación del crecimiento (Goda *et al.*, 2004); sin embargo, no se conoce si promueven esta enzima en el proceso de la termotolerancia.

Las respuestas inducidas por los BRs requieren del reconocimiento de estos compuestos a nivel de receptores de membrana específicos y la posterior transducción de señales hacia el interior celular (Li y Jin, 2007). BRI1 es una proteína quinasa con dominios ricos en leucina, considerada el receptor principal de los BRs en la superficie de la membrana (Oh *et al.*, 2000). El reconocimiento de los BRs depende del contenido y el nivel de biosíntesis de estas hormonas esteroidales (Noguchi *et al.*, 1999; Montoya *et al.*, 2002), de manera que los tejidos con cantidades elevadas de BRs pueden mostrar una represión del receptor y resultar menos sensibles a estos compuestos y viceversa (Montoya *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2007). No obstante, se desconoce el papel del contenido y el reconocimiento de los BRs en la termotolerancia, la actividad POX y el estrés oxidativo inducido por las temperaturas altas.

En tomate (*Solanum lycopersicum* L.), los mutantes deficientes de BRs, el d^x y el *dpy* (Bishop *et al.*, 1999; Koka *et al.*, 2000) e insensibles a los BRs, el *cu3* y el *abs1* (Koka *et al.*, 2000; Montoya *et al.*, 2002) presentan alteraciones en la homeostasis de BRs y han constituido modelos biológicos en la dilucidación de las funciones de estas hormonas en el crecimiento y desarrollo (Bishop *et al.*, 1999; Montoya *et al.*, 2002). En particular, los mutantes d^x y *abs1* resultan atractivos ya que poseen alteraciones en el paso limitante de la biosíntesis y en la actividad quinasa intracelular del receptor BRI1 en tomate, respectivamente (Bishop *et al.*, 1999; Montoya *et al.*, 2002). Sin embargo, estos mutantes pudieran utilizarse para conocer la relación entre el contenido y el reconocimiento de los BRs con la termotolerancia, la actividad peroxidasa y el estrés oxidativo inducido por la temperatura alta.

No obstante la importancia del uso de la 24-epibrasinólida, la castasterona y otros BRs naturales en los estudios teóricos, su aplicación práctica no es factible por lo costoso de su empleo. De ahí que se hayan sintetizado análogos espirostánicos de BRs que presentan actividad promotora del crecimiento (Núñez *et al.*, 2003) y que pudieran utilizarse para incrementar la tolerancia de plantas de tomate a las temperaturas altas, dado que en Cuba la producción de esta hortaliza se afecta significativamente, en período no óptimo (“período lluvioso”), por la temperatura y la humedad relativa alta. Es conocido que estos son factores importantes que inciden en la baja producción del tomate en ambientes tropicales (Abdelmageed *et al.*, 2004).

Dentro de los distintos tipos de BRs sintéticos, los análogos espirostánicos de la castasterona (CS) se caracterizan por la presencia de un anillo espirocetálico en lugar de la cadena lateral

clásica de los BRs naturales. Sin embargo, no se conoce si estos análogos estructurales pueden inducir la tolerancia de las plantas a las temperaturas altas. Por tanto el empleo de análogos espiroestánicos de la CS, además del interés práctico, puede servir como herramienta de análisis teórico de la relación entre la estructura química de estos compuestos y la termotolerancia de las plantas de tomate.

Por todo lo anterior, el presente trabajo propone la siguiente hipótesis: “Los brasinoesteroides desencadenan la activación de la enzima peroxidasa, la protección contra el estrés oxidativo y la termotolerancia de plántulas de tomate”

El objetivo general y los específicos fueron los siguientes:

Objetivo General: Demostrar el papel del contenido y el reconocimiento de los BRs en la termotolerancia de plántulas de tomate y su vínculo con la regulación de la enzima peroxidasa y el estrés oxidativo inducido por la temperatura alta.

Objetivos específicos:

1. Determinar la relación entre el crecimiento mediado por los BRs, el estrés oxidativo y la actividad peroxidasa.
2. Determinar el papel del contenido y el reconocimiento de los BRs por el receptor tBRI1 en la termotolerancia de plántulas de tomate.
3. Determinar la asociación entre la termotolerancia promovida por los brasinoesteroides y el estrés oxidativo inducido por la temperatura alta.
4. Demostrar la inducción de la termotolerancia y la regulación del estrés oxidativo por dos análogos espiroestánicos de la castasterona en plántulas de tomate var. Amalia.

Novedades de la tesis

Es la única caracterización del crecimiento en relación con la peroxidación lipídica y la actividad peroxidasa de los genotipos AC, *d^x*, 35SD y *abs1*. Se demuestra la participación del estrés oxidativo en las respuestas de crecimiento y termotolerancia inducida por los BRs.

Se demuestra por primera vez que, en cuanto a la acción de los brasinoesteroides, la respuesta del crecimiento es más sensible que la de termotolerancia y depende de la actividad del dominio quinasa del receptor tBRI1.

Se estudia la relación entre la estructura química de análogos espirostánicos de castasterona (sintetizados en Cuba), únicos de su tipo a nivel internacional, la tolerancia y el estrés oxidativo bajo condiciones de choque por temperatura alta.

Importancia teórica

Se contribuye a la comprensión mejor del papel del estrés oxidativo en la inducción del crecimiento y la termotolerancia por los brasinoesteroides. Con la presente tesis se aporta a la propuesta de un modelo teórico del posible papel de la homeostasis de los brasinoesteroides en el estrés oxidativo y la tolerancia a la temperatura alta.

Importancia práctica

El conocimiento de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos del crecimiento y la termotolerancia inducidos por los brasinoesteroides puede contribuir a la mejora de la eficiencia del uso de estos compuestos y sus análogos espirostánicos en la biotecnología y en el incremento de los rendimientos agrícolas. La obtención de genotipos con alteraciones de la biosíntesis y el reconocimiento de los brasinoesteroides pueden servir para obtener variedades tolerantes a diferentes tipos de estrés.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Efectos de las temperaturas altas en las plantas.

2.1.1 Generalidades

Las plantas se afectan profundamente por los cambios de la temperatura ambiente y el efecto de las temperaturas altas en las plantas superiores ocurre primariamente en las funciones fotosintéticas (Crafts-Brandner y Salvucci, 2000). Los límites de tolerancia al calor están determinados por la sensibilidad térmica de las reacciones fotoquímicas primarias presentes en el sistema de membrana de los tilacoides (Vani *et al.*, 2001).

Los efectos de las temperaturas altas en el crecimiento y la sobrevivencia dependen de la intensidad y la duración del estrés. Un período prolongado a una temperatura moderadamente alta es tan dañino como la exposición breve a las temperaturas extremas (Georgieva, 1999). Del balance entre las afectaciones de la fotosíntesis (Georgieva *et al.*, 2000; Mohanty, 2003) y la respiración depende la disponibilidad de asimilados que se destinan al crecimiento. Muchos de sus efectos en el crecimiento han sido causados por el desbalance en esos procesos fisiológicos.

También, las temperaturas altas tienen efectos inhibitorios en el crecimiento y el desarrollo del polen (Sakata *et al.*, 2000; Karni y Aloni, 2002), y en el metabolismo de los azúcares (Chaitanya *et al.*, 2001).

La intensidad con que transcurre cualquier proceso fisiológico o bioquímico ante un rango de temperaturas se representa por una curva asimétrica (Verwijst y Von Firks, 1994), en la cual se pueden destacar tres temperaturas fundamentales: la mínima y la máxima, cuando el proceso cesa completamente, y la temperatura óptima, donde se logra la intensidad mayor del proceso. Algunos autores señalan la existencia del rango óptimo de temperatura, en la que la intensidad del proceso fisiológico o bioquímico se encuentra dentro del 90 % de la intensidad máxima.

Levitt (1980) señala cuatro efectos fundamentales que produce el aumento de la temperatura por encima del rango óptimo (estrés por temperaturas altas), estos son:

- La respuesta diferenciada de las velocidades de reacción, debido a las diferencias en la energía de activación de las mismas.
- La desnaturalización y la agregación de las proteínas.
- La hiperfluidez de los lípidos de las membranas.

- La descomposición química directa.

Todos ellos se traducen en daños al vegetal en dependencia de la rapidez de su aparición, entre los que se encuentran: la inhibición del crecimiento (Leithold *et al.*, 1997; Wheeler *et al.*, 1997), el agotamiento de las reservas, la acumulación de elementos tóxicos (Asada, 1999), lesiones bioquímicas, descomposición de las proteínas, el eflujo de iones y la pérdida de la semipermeabilidad de la membrana (Gong *et al.*, 1998a).

En los mecanismos de sobrevivencia de las plantas ante las temperaturas altas se incluyen las adaptaciones evolutivas a través de los años y los cambios morfológicos y mecanismos de aclimatación a corto plazo, por ejemplo, la orientación foliar, el enfriamiento transpiracional y las alteraciones en la composición de la membrana lipídica (Radin *et al.*, 1994). Las plantas pueden adquirir tolerancia muy rápidamente, en pocas horas, a temperaturas que normalmente habrían sido letales. Además, la adquisición de la termotolerancia refleja un mecanismo de homeostasis metabólica, debido a que las plantas están expuestas a fluctuaciones en la temperatura diurna. Sin embargo, solamente se ha definido un limitado número de factores responsables del desarrollo de la termotolerancia de las plantas (Hong *et al.*, 2003), debido a que la termotolerancia es un carácter multigénico muy complejo.

Se plantea que el desarrollo de la termotolerancia debe moderar los diferentes tipos de daños y efectos tóxicos que provocan las temperaturas altas, a través de la inducción de factores protectores que limitan la magnitud del daño ó por medio de la activación de procesos de recuperación de la planta ante el daño, aunque no necesariamente son mecanismos mutuamente excluyentes (Larkindale y Knight, 2002).

2.1.2 Influencia de las temperaturas altas en las membranas.

Las membranas muestran el ordenamiento molecular capaz de captar selectivamente unas sustancias respecto a otras, de recibir, transducir y amplificar señales, de regular vectorialmente el flujo y las concentraciones de diversas sustancias por medio de las bombas y transportadores, de disponer de canales iónicos específicos y mantener los potenciales de membranas. En este sentido, se conoce que muchos agentes estresantes, entre los que están las temperaturas altas, ocasionan alteraciones en la integridad de la misma (Chengkun *et al.*, 1996).

De las respuestas rápidas inducidas por las temperaturas altas, las disfunciones de las membranas son de los principales procesos distorsionados en las células, ya que cuando las membranas se dañan por la exposición a las temperaturas altas, su permeabilidad se incrementa y con ella, la difusión de los electrolitos fuera de la célula (Nguyen y Joshi, 1992).

Las temperaturas altas ejercen sus efectos en las membranas por modificaciones de la fase de transición de los lípidos o por reorientación de los componentes de las membranas, lo cual produce variaciones en su fluidez. Esos cambios en las membranas son necesarios para ajustar la "fluidez" y la "micro viscosidad" de las mismas.

A nivel fisiológico, el mantenimiento de la estabilidad de las membranas celulares se considera el principal componente de la termotolerancia celular, siendo indicador de tolerancia tanto a las temperaturas altas como a otros estímulos ambientales, de modo que es ampliamente utilizado para evaluar la conducta de las plantas sometidas al estrés por temperaturas altas. Lin *et al.* (1985) informan que el eflujo de los electrolitos inducido ante choque por temperatura alta puede protegerse por un tratamiento térmico previo de plantas de soya (*Glycine max*). Por medio de recientes evidencias genéticas se ha confirmado que la modulación de las propiedades de las membranas es un aspecto esencial en el desarrollo de la tolerancia a las temperaturas altas (Hong *et al.*, 2003), aunque los defectos en la difusión de los electrolitos no sean necesariamente los causantes primarios de la pérdida de la termotolerancia.

En relación a el reconocimiento del choque por temperatura alta, se ha planteado la hipótesis de que la membrana celular actúa como el "sensor primario" de la respuesta de choque por temperatura alta, la cual estaría involucrada en el reconocimiento de cambios rápidos de temperatura, provocándose la transducción de una señal (Horváth *et al.*, 1997).

2.1.3 Efecto de las temperaturas altas en la generación de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es inducido por tratamientos con temperaturas altas (Foyer *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 1998a; 1998b) y por la mayoría de los estímulos ambientales adversos (Hamilton *et al.*, 2001), como consecuencia fundamental de la producción en exceso de las especies activas de oxígeno (ROS), tales como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). Por

ejemplo, pulsos muy cortos de choque por temperatura alta pueden inducir explosiones oxidativas de radicales superóxido y/o peróxido de hidrógeno (Vallelian-Bindscheller *et al.*, 1998). Las especies activas de oxígeno pueden causar la reducción de la fotosíntesis y la transpiración, acelerar la senescencia, aumentar la respiración y provocar el eflujo de los electrolitos y las mutaciones genéticas en las plantas (Scandalios, 1990).

El radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) son extremadamente tóxicos y sus acciones conducen a la oxidación no selectiva de las moléculas (las proteínas, los lípidos y el ADN) en la vecindad inmediata de su sitio de producción (Scandalios, 1990).

El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son menos dañinos que el $^1\text{O}_2$ y el $\text{OH}\cdot$ debido a que son comparativamente más estables (tiempo de vida media mayor que 1ms). Estas dos especies causan la oxidación inespecífica de los lípidos y las proteínas, pero es la conversión al $\text{OH}\cdot$, catalizada por los metales de transición Fe ó Cu (la reacción de Haber-Weiss) la que conlleva a la toxicidad mayor. El O_2^- y el H_2O_2 se toleran en las células vegetales hasta concentraciones de aproximadamente 1nM y 500 nM, respectivamente (Asada, 1994).

A pesar de la inestabilidad de los radicales libres, se ha determinado directamente su formación, aunque no siempre se ha identificado la naturaleza de los radicales (Mehlhorn *et al.*, 1990). Por otra parte, la detección de la acumulación de los productos relativamente estables de la degradación oxidativa de los lípidos (malondialdehído), así como la formación de proteínas carboniladas que se generan debido al ataque de los radicales libres han sido empleadas para indicar el daño oxidativo (Rao *et al.*, 1995).

En cuanto a los sitios de producción, fuentes importantes de especies activas de oxígeno son los procesos del transporte de los electrones en los cloroplastos y el estrés foto-oxidativo en los peroxisomas (Noctor y Foyer, 1998; Dat *et al.*, 2000). En los cloroplastos y los peroxisomas, la disipación del exceso de la energía así como las transferencias de los electrones durante la foto-respiración y en la reacción de Mehler incrementan los flujos de los electrones hacia el oxígeno y como consecuencia la producción de las especies activas del oxígeno potencialmente tóxicas (Gilmore y Yamamoto, 1993; Foyer y Harbinson, 1994). Sin embargo, las ROS pueden producirse en otros organelos celulares. La generación del H_2O_2 puede ocurrir a partir de la NADPH oxidasa que se localiza en la membrana citoplasmática, las peroxidasas de la pared celular y las amino-oxidadas

(Desikan *et al.*, 1998). En las mitocondrias también se encuentran posibles sitios de generación de las especies activas del oxígeno (Richter y Kass, 1991; Torres y Dangl, 2005).

A nivel genético, Desikan *et al.* (2001) detectan que la mayoría de los genes inducidos en respuesta al estrés oxidativo tienen una relación obvia con varios procesos de desarrollo y con otros estrés bióticos y abióticos. Por ejemplo, la mayor parte de los genes de respuesta al peróxido de hidrógeno se relacionan con las defensas de las células, la transcripción y transducción de señales, así como con el metabolismo celular. Aunque las evidencias son escasas, se cree que los radicales libres poseen efectos beneficiosos como señales del estrés, incluyéndose la inducción de la termotolerancia (Dat *et al.*, 1998).

2.2 Tolerancia de las plantas a las temperaturas altas.

Como se señaló en el acápite de generalidades, las temperaturas altas tienen efectos múltiples que resultan en el retardo del crecimiento y el desarrollo de la planta. Sin embargo, la exposición de las plantas a tratamientos moderados de calor induce la protección de sus células a daños severos, posibilitándose la sobrevivencia de las mismas (Konigshofer y Lechner, 2002). A este fenómeno de aclimatación a corto plazo, también llamado termotolerancia adquirida ó inducida (Burke, 2001) contribuyen las proteínas del choque térmico, los antioxidantes, los lípidos de la membrana, los solutos compatibles y otros (Iba, 2002). Por otro lado, la termotolerancia también puede ser inducida por sustancias diversas, incluyendo compuestos que desencadenan la explosión oxidativa (Dat *et al.*, 1998).

Hong *et al.* (2003) ofrecen evidencias genéticas directas sobre la existencia de funciones ó rutas distintas a la clásica respuesta de síntesis de HSPs que también son necesarias para la adquisición de termotolerancia, como por ejemplo, la protección de la integridad de la membrana y la recuperación de la síntesis de proteínas. La destrucción de una de estas funciones sería suficiente para eliminar la habilidad de las plantas para aclimatarse a las temperaturas altas.

Los lípidos son otras moléculas que afectan la sensibilidad de las plantas a las variaciones de temperatura. La tolerancia a las temperaturas altas también se confiere por incrementos en las membranas de los ácidos grasos con altos grados de saturación. Por ejemplo, la

saturación de los lípidos de las membranas de los tilacoides incrementa la estabilidad térmica de las mismas. Las características físico – químicas de la bicapa lipídica a diferentes temperaturas también dependen del grupo presente en el extremo polar y de la naturaleza de sus ácidos grasos esterificados (Alfonso *et al.*, 2001).

Las poliaminas como la espermidina, la espermina y la putrescina también han sido implicadas en las respuestas a las temperaturas altas (Bouchereau *et al.*, 1999). Dada su naturaleza catiónica a pH fisiológico, que posibilita su interacción con los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y ciertas proteínas, las poliaminas participan en el mantenimiento del balance catiónico – aniónico en la célula (Roy y Gosh, 1996).

De lo anteriormente mencionado, se constata la multiplicidad de procesos afectados por las temperaturas altas y por tanto la necesidad de las plantas de disponer de mecanismos de tolerancia para prevenir o reparar sus efectos tóxicos. Por lo mismo, es necesario enfatizar que dada la naturaleza multigénica del carácter termotolerancia, cada mecanismo protector por si solo es incapaz de conferirle a los tejidos una protección considerable. La caracterización de los genes *hot* y sus defectos en la adquisición de termotolerancia demostró la diversidad de mecanismos implicados en este proceso (Queitsch *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2003).

Se han descrito varios métodos de evaluación de la termotolerancia asociados con distintas características de las respuestas de las plantas al estrés por temperaturas altas. Entre los más empleados se destacan el procedimiento de medida de la fluorescencia de la clorofila " in vivo" (Smillie y Hetherington, 1983); la reducción del cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (Wu y Wallner, 1983) y la evaluación del eflujo de iones como medida de la estabilidad de membrana (Blum y Ebercon, 1981). Los métodos de la evaluación del crecimiento post choque por temperatura alta han demostrado alta sensibilidad. En este sentido, investigadores de varios grupos han observado en ocasiones actividad de los meristemos apicales de plántulas al recuperarse después de ser sometidas a choque por temperatura alta, aún cuando las mismas muestran daños considerables. Ellos señalan que, en condiciones específicas de estrés, los meristemos pueden ser más termotolerantes (Vierling E, 2007; Krishna P, 2007, comunicación personal). En general, la sensibilidad de los diferentes métodos varía con la edad de la planta (Mullarkey y Jones, 2000) y las condiciones experimentales (Vierling E, 2007, comunicación personal).

2.3 Las proteínas de choque térmico en la termotolerancia de las plantas.

La síntesis de las proteínas de choque térmico (HSPs, siglas en Inglés) es la respuesta clásica al choque por temperatura alta. La inducción de estas proteínas incrementa la termotolerancia de las células o las plantas, permitiendo que los tejidos puedan soportar las exposiciones a las temperaturas que previamente resultaban letales; sin embargo, el papel preciso de muchas de las HSPs en la termotolerancia permanece incierto (Queitsch *et al.*, 2000). La expresión de las HSPs se ha observado al exponer las plantas a temperaturas de al menos 5 °C por encima de las condiciones de temperatura óptima (Bray *et al.*, 2000).

Las HSPs se involucran en el plegamiento de proteínas, por ejemplo, la recuperación de proteínas agregadas o plegadas incorrectamente, actividad que explica su papel en el estrés térmico (Vierling, 1991). Las HSPs también pueden jugar un papel en el crecimiento y el desarrollo en las condiciones ambientales normales (Vierling, 1991).

Las plantas sintetizan proteínas de choque térmico de peso molecular alto (entre 60 y 110 KDa) y de peso molecular bajo (entre 15 y 45KDa) (Jinn *et al.*, 1995).

Se han identificado al menos 6 clases de las proteínas de choque térmico de peso molecular bajo, y se conoce que muchas poseen actividad chaperona (Sun *et al.*, 2002). Estas proteínas de choque térmico se han asociado a la termotolerancia de organelos tales como las mitocondrias (Downs y Heckathorn, 1998).

Por otra parte, las proteínas de peso molecular alto incluyen la HSP100, la HSP90, la HSP70 y la HSP60; aunque son menos abundantes en la respuesta al choque por temperatura alta que las HSPs de peso molecular bajo (Konigshofer y Lechner, 2002). Algunas han sido encontradas en los diferentes organelos de las plantas como son: el núcleo, las mitocondrias, los ribosomas, el retículo endoplasmático y los cloroplastos. La HSP100 está implicada en posibles mecanismos de termotolerancia (Queitsch *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2002).

Los factores de choque térmico (HSF, siglas en Inglés) (Nover *et al.*, 2001; Busch *et al.*, 2005) regulan la transcripción de los genes *hsp* y otros genes relacionados con las adaptaciones de las plantas al estrés (Panikulangara *et al.*, 2004; Busch *et al.*, 2005). Se ha determinado que, en ocasiones, la expresión constitutiva de HSFs incrementa la termotolerancia basal sin afectar la termotolerancia adquirida o inducida (Lee *et al.*, 1995).

Algunas de las HSPs no son únicas del estrés por temperaturas altas, ellas se han inducido ante diferentes estímulos, entre los que se destacan, la deficiencia hídrica, el tratamiento con el ácido abscísico (ABA), las heridas y la salinidad (Vierling, 1991). Debe señalarse que no todas las hormonas o reguladores están implicados en los diferentes aspectos de la termotolerancia; demostrándose esta afirmación en, por ejemplo, la producción de HSPs (Larkindale y Knight, 2002).

En relación al estrés oxidativo, el mismo induce rutas que conducen a la acumulación de algunas HSPs (Storozhenko *et al.*, 1998). Por otro lado, los genes de las proteínas de choque térmico (hsp17, hsp83, hsp101, entre otras) pueden inducirse por la ROS, H₂O₂ (Desikan *et al.*, 2001). Además, las HSPs incrementan la sobrevivencia al estrés oxidativo (Banzet *et al.*, 1998). Se sugiere la existencia de una comunicación entre la expresión de HSPs y el estímulo oxidativo, lo cual puede constituir la base de la tolerancia cruzada entre estos tipos de estrés.

2.4 La protección antioxidante en las respuestas de las plantas al estrés

Para minimizar los efectos tóxicos de las especies activas de oxígeno, las plantas han desarrollado mecanismos bien regulados de protección enzimáticos y no enzimáticos. Estos mecanismos atrapan e inactivan eficientemente los radicales libres de oxígeno, lográndose el balance entre la producción y la destrucción de los mismos (Polle, 1997). La habilidad de las plantas de sobreponerse al asalto oxidativo depende de sus capacidades de desencadenar tales mecanismos de respuesta de manera eficaz, en los diferentes organelos celulares.

En general, los sistemas antioxidantes se distribuyen por los distintos sitios y los organelos de la célula. Los antioxidantes intracelulares se han caracterizado mejor que los localizados en el apoplasto. Por otra parte, en la mayoría de las especies la capacidad de los sistemas antioxidantes declina con la edad (Polle, 1997).

Los niveles de los antioxidantes se incrementan después de la exposición de las plantas al estrés ambiental biótico o abiótico, incluyéndose las temperaturas altas (Chaitanya *et al.*, 2002). Sin embargo, en ocasiones se han informado resultados contradictorios u opuestos. La variabilidad de las respuestas podría deberse a las diversas especies de plantas y los cultivares que se han utilizado, al estadio del desarrollo del tejido, las enzimas o las iso-enzimas específicas que se examinan, la duración y la intensidad del estrés.

Las plantas genéticamente modificadas a partir de la expresión de las enzimas antioxidantes son más termotolerantes (Rennenberg y Polle, 1994). Sin embargo, en algunos casos los resultados son contradictorios y la expresión de los antioxidantes como la superóxido dismutasa o la glutatióna reductasa no mejora la tolerancia de las plantas al estrés (Aono *et al.*, 1993). Las evidencias contradictorias a partir de las plantas transgénicas indican claramente que la expresión individual de una enzima no tiene por qué aumentar la tolerancia sistémica al estrés oxidativo, y los enfoques futuros deberán centrarse en la expresión coordinada y balanceada de varias de las enzimas antioxidantes claves en organelos celulares distintos.

Las hormonas clásicas del estrés, el etileno (Vahala *et al.*, 2003a, b) y el ácido abscísico (Kovtun *et al.*, 2000), así como reguladores vegetales como el ácido salicílico (Metwally *et al.*, 2003; Vahala *et al.*, 2003b) se han asociado en la modulación de las respuestas de las plantas al estrés oxidativo.

2.4.1 Defensas antioxidantes no enzimáticas

Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser metabolitos lipofílicos entre los que se destacan los tocoferoles, los carotenoides, los polifenoles y los alcaloides. También, pueden ser hidrofílicos como la glutatióna, el ascorbato, las poliaminas y la cisteína, que pueden secuestrar directamente las ROS o servir como sustratos para los sistemas de protección enzimáticos (Foyer, 1993).

Los carotenoides están asociados a las membranas (Joyard *et al.*, 1998), y actúan como pigmentos accesorios colectores de luz; sin embargo, han sido implicados en la protección contra el daño foto-oxidativo, debido fundamentalmente a que desactivan el $^1\text{O}_2$ y la ^1Chl (clorofila) por transferencia del exceso de energía. También protegen las células contra el radical superóxido e hidroxilo (Edge *et al.*, 1997), y participan en la terminación de las reacciones de peroxidación lipídica y en la regeneración del antioxidante tocoferol (vitamina E) (Baroli y Niyogi, 2000).

Por otra parte, los tocoferoles, a diferencia de los carotenoides que forman complejos con las proteínas, se encuentran libres en la matriz lipídica de las membranas y aparentemente juegan un papel en el control de la fluidez y la estabilidad de las membranas. El α -Tocoferol, que es el tocoferol más abundante de los cloroplastos, inactiva o secuestra las

especies, el $^1\text{O}_2$, el O_2^- y el $\text{OH}\cdot$ en la membrana para inhibir la peroxidación lipídica (Foyer *et al.*, 1994).

El antioxidante soluble ascorbato, abundante en los cloroplastos, ha tenido un papel central en la prevención del daño oxidativo mediante la inactivación directa de las especies, el $^1\text{O}_2$, el O_2^- y el $\text{OH}\cdot$, en la regeneración del α -tocoferol a partir del radical α -tocoferoxilo y como sustrato de las enzimas ascorbato peroxidasa y la violaxantina desepoxidasa (Noctor y Foyer, 1998).

Otro antioxidante hidrofílico es la glutatona, que inactiva el $^1\text{O}_2$ y el $\text{OH}\cdot$. La glutatona (GSH) protege los grupos tiol de las enzimas del estroma de los cloroplastos, y también se asocia a la regeneración del α -tocoferol y del ascorbato a través del ciclo glutatona-ascorbato (Asada, 1994; Foyer *et al.*, 1994).

2.4.2 Defensas antioxidantes enzimáticas

Por otra parte, entre los principales antioxidantes enzimáticos se encuentran las enzimas que remueven oxidantes tóxicos como las superóxido dismutasas, las peroxidasas, las catalasas y otras enzimas que mantienen los niveles de antioxidantes en sus estados reducidos como son la deshidroascorbato reductasa, la monodeshidroascorbato reductasa, y la glutatona reductasa (Foyer, 1997).

Actualmente son poco comprendidos los mecanismos específicos que modulan la expresión de los genes antioxidantes en el estrés de oxidación, especialmente de los genes que codifican las varias iso-enzimas de una misma proteína. En general, los resultados han mostrado que las múltiples formas de las enzimas antioxidantes tienen un patrón de expresión diferencial, su regulación es compleja y se localizan en varios tejidos, tipos celulares y organelos (Scandalios *et al.*, 1997).

Las superóxido dismutasas (SOD) son metaloenzimas que eliminan los radicales O_2^- y producen el oxígeno molecular y el peróxido de hidrógeno. Se han detectado varias isoformas de esta metaloenzima, que se distinguen por su cofactor metálico. En general, las plantas contienen la MnSOD mitocondrial, así como las Cu/ZnSOD citosólicas y cloroplásticas y se sabe que en los cloroplastos de algunas especies se ha encontrado, además, la FeSOD (Scandalios *et al.*, 1997). En general, la existencia de múltiples formas

de la SOD, su localización dentro de los tejidos, las células, y los organelos implica funciones múltiples para estas enzimas en las plantas.

La expresión de la enzima SOD en plantas transgénicas de tomate no aumenta la tolerancia al estrés oxidativo, posiblemente a que su acción beneficiosa necesita del incremento coordinado de otros antioxidantes. La actividad de la SOD responde a diferentes condiciones de estrés (Scandalios *et al.*, 1997), y ante el estrés de temperaturas altas se han constatado efectos inhibitorios (Matters, 1996).

La enzima catalasa (CAT) es un tetrámero que contiene el grupo Fe-porfirina y cataliza la dismutación del H_2O_2 a agua y oxígeno molecular. Junto con las peroxidasas (POXs) y las superóxido dismutasas, participa en el secuestro de las ROS, previniendo el daño celular. No se ha encontrado en los cloroplastos y por lo tanto, no participan en la eliminación de H_2O_2 en ese organelo. Además, la enzima está involucrada en las respuestas al estrés ambiental y su expresión es influida por los factores como la luz, las hormonas vegetales, el ozono, la temperatura y los xenobióticos (Scandalios, 1990).

En relación con la temperatura, Scandalios (1994) reporta isoenzimas de la catalasa con estabilidades térmicas diferentes, aspecto que también se ha relacionado con la regulación del peróxido de hidrógeno en condiciones del choque por temperatura alta (Anderson, 2002). Por otra parte, Scandalios (1994) plantea que las catalasas y las superóxido dismutasas son las enzimas antioxidantes más eficientes ya que su acción combinada no sólo convierte el O_2^- y el H_2O_2 en agua y oxígeno, sino que también evita la formación del $OH\cdot$, el oxidante más tóxico.

Se consideran a las ascorbato peroxidasas (APXs) como las atrapadoras de peróxido de hidrógeno más importantes que operan tanto en el citosol como en los cloroplastos (Asada, 1992). Las distintas iso-enzimas de las APXs se distribuyen en diferentes compartimentos celulares como son la membrana de los tilacoides, el estroma, los cloroplastos, los microcuerpos, y el citosol (Ishikawa *et al.*, 1998). Las APXs han manifestado afinidad alta por el ascorbato y el H_2O_2 a concentraciones saturantes de $2,0-4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ y $2,0-3,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente (Ishikawa *et al.*, 1998).

Estas enzimas, especialmente las iso-formas de los cloroplastos, son lábiles en ausencia del ascorbato y se distinguen de las peroxidasas de guayacol por la inhibición con el p-cloromercuribenzoato (Asada, 1992). Existen evidencias de que las APXs son reguladas

por el estrés ambiental, incluyendo la inducción del gen *apx1* directamente por choque térmico (Storozhenko *et al.*, 1998). Por ejemplo, se ha evidenciado la disminución marcada de esta peroxidasa en respuesta al choque por temperatura alta (Panchuck *et al.*, 2002).

Otras enzimas que participan en la regulación de los niveles de glutatióna y ascorbato son las monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) (Hossain *et al.*, 1991), la deshidroascorbato reductasa (DHAR) (Foyer y Halliwell, 1976), y la glutatióna reductasa (GR) (Noctor y Foyer, 1998). También se localizan fundamentalmente en los cloroplastos y sus funciones están muy interconectadas con el resto de las enzimas (Noctor y Foyer, 1998).

2.5 Las peroxidasas de la clase III y sus funciones en las plantas.

Las hemo-peroxidasas son glicoproteínas que contienen el grupo hemo en su centro catalítico. Hiraga *et al.* (2001) las han clasificado en tres clases diferentes de enzimas peroxidasas (POXs), de acuerdo a las diferencias en la estructura primaria de las mismas y sus propiedades catalíticas. Así, se describen las peroxidasas de la clase I intracelulares (EC 1.11.1.15/.6/.11), las de la clase II liberadas por los hongos (EC 1.11.1.13/.14), y las peroxidasas de la clase III secretadas por las plantas (EC 1.11.1.7). Esta última clase se encuentra presente en todas las plantas terrestres. Las POXs están codificadas por una familia multigénica, encontrándose, en *Arabidopsis*, más de 100 secuencias expresadas que codifican para iso-enzimas diferentes (Tognolli *et al.*, 2002; Duroux y Welinder 2003; Passardi *et al.*, 2005). Son proteínas altamente conservadas, sin embargo, a pesar de su conservación, sus puntos isoeléctricos difieren marcadamente (las formas catiónicas y aniónicas). Hasta la fecha no se ha establecido correlación entre sus puntos isoeléctricos y las posibles funciones enzimáticas de la misma.

La comparación de la estructura primaria entre peroxidasas indica que ellas son altamente variables dentro de una especie. Sin embargo, cerca del 90% de los residuos aminoácidos son idénticos entre POXs de diferentes especies vegetales.

En la tercera clase se incluyen las enzimas que se describieron originalmente como las peroxidasas. La citocromo C peroxidasa y la ascorbato peroxidasa muestran especificidad alta por los reductores citocromo C y ácido ascórbico, respectivamente. Las POXs oxidan varias sustancias desde pequeñas moléculas hasta macromoléculas. La diversidad de

reacciones que catalizan las POXs explican la implicación de estas enzimas en diversos procesos fisiológicos (Hiraga *et al.*, 2001). Varios autores sugieren que las peroxidasas son enzimas polifuncionales, que pueden catalizar la generación del peróxido de hidrógeno y también su consumo a partir de la oxidación de los compuestos fenólicos (Pedreño *et al.*, 1995).

En su ciclo hidroxílico, la acción de la POX forma varios radicales libres de oxígeno, sin embargo, el mecanismo enzimático no ha sido dilucidado (Liskay *et al.*, 2003). Así, las POXs tienen la capacidad de generar peróxido de hidrógeno y subsiguientemente radicales hidroxilo en el ciclo hidroxílico, y debido a esa habilidad, las POXs pueden implicarse en la producción de radicales que provocarán, por ejemplo, la ruptura no-enzimática de pectinas y xiloglucanos que ocurre durante la elongación celular (Chen y Schopfer, 1999), ó estas enzimas pueden relacionarse con la generación de radicales libres que requeriría la transducción de las señales del estrés (Liskay *et al.*, 2003; Passardi *et al.*, 2004).

De las dos familias de peroxidasas (POX) mas importantes de las plantas se encuentran unas que oxidan preferiblemente los sustratos fenólicos como el compuesto artificial guayacol y otras que tienen especificidad por el sustrato ascorbato (Asada, 1992). Las “fenol” peroxidasas se encuentran con elevada actividad específica en las paredes celulares, donde sus productos de oxidación, los radicales fenoxi-monolignol, se incorporan espontáneamente a la lignina y promueven la rigidez de las paredes (López-Serrano *et al.*, 2004). También las POXs están involucradas en la formación de la lignina a través de un proceso similar (Keren-Keiserman *et al.*, 2004).

De esta manera, las POXs están implicadas en el proceso de entrecruzamiento de los compuestos de la pared celular, con el fin de crear una barrera física durante el crecimiento normal de la planta y en respuesta a estímulos tales como: heridas, patógenos y agresiones climáticas. La implicación de las POXs en el entrecruzamiento está asociado con la capacidad oxidativa del ciclo peroxidativo (Passardi *et al.*, 2004).

Se cree que las peroxidasas de la pared, que se encuentran solubles en el apoplasto o enlazadas covalentemente a la pared, juegan un papel importante en la lignificación, suberización y las defensas contra los patógenos y los contaminantes (Castillo *et al.*, 1987). Las iso-enzimas POXs se han identificado en extractos crudos mediante la tinción específica después de la separación de las mismas por electroforesis en gel (Lagrimini y

Rothstein, 1987). Varias de las iso-enzimas de las peroxidasas del guayacol están presentes en los diferentes organelos como las vacuolas, el citosol y la pared celular (Asada, 1992).

Tanto el sustrato como los productos de la reacción de las iso-enzimas POX son importantes en sus funciones específicas. La determinación de las reacciones individuales de cada isoforma se dificulta debido a que las preparaciones purificadas de la enzima generalmente catalizan la oxidación de un amplio rango de reductores *in vitro* (Quiroga *et al.*, 2000). Por lo tanto, la definición de funciones específicas de las POXs debe basarse en la combinación de características diferentes (por ejemplo, las propiedades catalíticas, la localización celular y los perfiles de expresión génica) (Hiraga *et al.*, 2001).

En cuanto al estrés y las enzimas POXs los resultados son variables. Por un lado, se ha observado que la exposición de las plantas a diferentes tipos de estrés induce la actividad de la peroxidasa. La expresión de esta enzima conduce a la defensa a través de dos mecanismos (pasivamente, por la creación de paredes más potentes; o activamente, por la producción masiva de radicales libres) (Passardi *et al.*, 2005). Sin embargo, en condiciones de estrés por temperatura alta se han encontrado aumentos y en otras ocasiones disminuciones de la actividad de la enzima peroxidasa (Rivero *et al.*, 2001; 2003; 2004). Se desconoce el papel de esta enzima en el metabolismo de radicales libres asociado a la tolerancia a las temperaturas altas.

2.6 Los brasinosteroides como hormonas de las plantas.

2.6.1 Aspectos generales

Los brasinoesteroides (BRs) son considerados una nueva clase de hormona vegetal que actúan a concentraciones muy bajas y juegan un papel importante durante todo el ciclo de vida de la planta. Entre las respuestas a los brasinoesteroides se incluyen, además del efecto clásico del alargamiento de tallos, efectos sobre las raíces, la foto-morfogénesis, la elongación floral, la senescencia, la división celular, el desarrollo vascular y reproductivo, la polarización de la membrana y el bombeo de protones, las relaciones fuente/sitio de consumo y la modulación del estrés (Clouse y Sasse, 1998; Clouse, 2002).

En los sistemas vegetales, los brasinoesteroides constituyen una gran diversidad de estructuras. Hasta el presente han sido aislados y caracterizados, en forma libre o conjugada, más de 50 BRs en todas las especies vegetales (Bajguz y Tretyn, 2003).

Dado que estos compuestos esteroidales pueden regular una diversidad de funciones fisiológicas de las plantas, cuyo manejo indudablemente tendría efectos prácticos y económicos favorables en la producción vegetal, existe un gran potencial de aplicaciones de los BRs que aún no se ha explotado. Por tanto, estos compuestos ofrecen nuevos enfoques para el mejoramiento de la productividad de los cultivos (Bishop, 2003)

2.6.2 Biosíntesis de brasinoesteroides

En 1997, Fujioka y Sakurai proponen dos rutas biosintéticas para los brasinoesteroides, denominadas ruta de oxidación temprana del C₆ y ruta de oxidación tardía del C₆ (Figura 1), las que coexisten en varias especies vegetales.

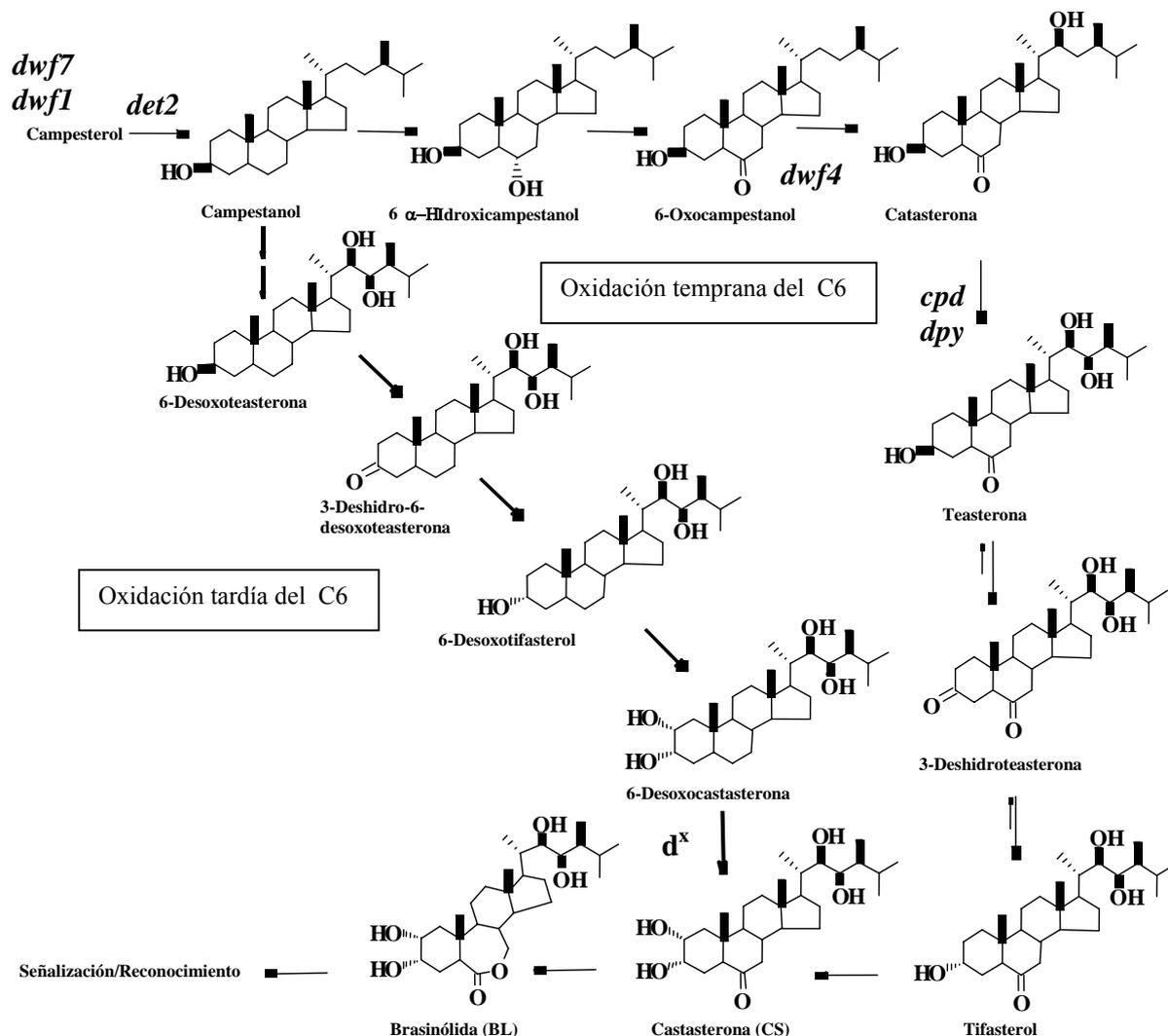


Figura 1. Rutas de biosíntesis de los BRs (Tomado de Fujioka y Sakurai (1997))

Como puede constatarse en la figura 1, la última etapa de la biosíntesis corresponde a la producción de la brasinólida (BL), el brasinoesteroide más activo que se conoce, la cual ocurre a través de la oxidación de su precursor intermediario castasterona (CS).

Después de la propuesta de estas dos rutas de biosíntesis de BRs por los autores antes mencionados, se han acumulado nuevas evidencias que le permiten a Fujioka y Yokota (2003) postular la interconexión de estas rutas de oxidación temprana y tardía del C-6 a

través de múltiples pasos de hidroxilación a nivel del carbono 22 de la cadena lateral, entre el campesterol y el campestanol. Así, Fujioka *et al.* (2002) encuentran varios compuestos producidos por la hidroxilación del carbono 22 de la cadena lateral de la (24R)-24-metil-colestano-4-en-3-ona, la (24R)-24-metil-5 α -colestano-3-ona, el campesterol y el campestanol, demostrando una nueva rama de hidroxilación del C-22 que opera en los tejidos, además de la clásica conversión de 6-oxo-campestanol a catasterona.

En tomate, la ruta de oxidación tardía del C-6 que incluye a los intermediarios 6-desoxoteasterona, 3-deshidro-6-desoxoteasterona, 6-desoxotifasterol y la 6-desoxocasterona es la predominante para la síntesis de los BRs activos (Figura 1). En tejidos vegetativos del tomate la castasterona debe actuar como el principal brasinoesteroide activo (Nomura *et al.*, 2005).

Kim *et al.* (2005) y Nomura *et al.* (2005) caracterizan la oxidación de la castasterona a brasinólida en *Arabidopsis*, demostrando que este paso es catalizado por una citP450 (cyp85a2). Nomura *et al.* (2005) demuestran la existencia de la enzima homóloga en tomate, la citP450 (cyp85a3), la cual desempeña un papel similar en esta última especie, durante el desarrollo reproductivo.

La biosíntesis de BRs ocurre en todos los órganos de la planta; sin embargo, se sintetizan más activamente en tejidos jóvenes y está limitada en órganos maduros (Shimada *et al.*, 2003). Este hecho es consistente con las observaciones de que los BRs tienen efectos marcados en tejidos jóvenes en fase de crecimiento activo (Clouse y Sasse, 1998).

La luz es un factor decisivo en el control de la biosíntesis de BRs. Se ha observado una oscilación durante el día de la expresión de genes de biosíntesis de BRs (por ejemplo, el gen cpd de *Arabidopsis*), detectándose un incremento sustancial en el contenido de la hormona a la mitad del día, mientras que la represión del gen cpd se mantiene durante la noche (Bancos *et al.*, 2006).

En relación al control de la biosíntesis debe decirse que los pasos de hidroxilación del C-22 (reacción de 6-oxo-campestanol a catasterona), y del C-23 (reacción de catasterona a teasterona) de la cadena lateral, ambos controlados por los genes cyp90b1/dwf4 y cyp90a/cpd de *Arabidopsis* respectivamente, así como la oxidación en el C-6 (6-desoxocasterona a castasterona) regulada por el gen d (cyp85a1) del tomate parecen ser las principales reacciones limitantes de la biosíntesis de los BRs (Nomura *et al.*, 2001).

Otra característica de la regulación de la expresión génica por los BRs es que estas hormonas regulan directamente algunos genes que codifican para su propia biosíntesis (Goda *et al.*, 2002). Se ha visto que en condiciones de desarrollo normal, la producción de los BRs es controlada por retroalimentación de los genes de la biosíntesis debido a que la expresión es parcialmente reprimida a concentraciones fisiológicas de estas hormonas (Choe *et al.*, 2001).

Sin embargo, un nivel alto de hormona activa resulta en la represión de genes biosintéticos y en la inducción de *bas1*, gen relacionado con el catabolismo de los BRs (Choe *et al.*, 2001). Varios estudios han probado que los genes *dwf4* y *cpd* se reprimen significativamente por la aplicación de brasinólida (Goda *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002). La acumulación de genes biosintéticos es fuerte y fluctuante en las primeras etapas del desarrollo de la plántula (Nomura *et al.*, 2005).

2.6.3 Reconocimiento y transducción de señales mediadas por los BRs

La proteína BRI1 se considera el receptor de los BRs en plantas (Friedrichsen *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000). Esta muestra una fuerte homología de secuencia con un tipo de proteínas receptoras quinasas (RLK, siglas en Inglés) y presenta dominios ricos en leucina (LRR, siglas en inglés) hacia el lado extracelular, los que pueden funcionar en la superficie celular para reconocer señales extracelulares. He *et al.* (2000) demuestran la importancia del dominio extracelular de BRI1 en el reconocimiento de la brasinólida y en la unión, directa ó indirecta, del BR para la transducción de la señal (Wang *et al.*, 2001). Este receptor presenta un dominio citoplasmático que tiene actividad quinasa y sitios con residuos de serina y treonina potenciales de fosforilación, indispensables para transmitir la señal hacia el interior celular (Li y Chory, 1997; Wang *et al.*, 2005a). La expresión del gen *bri1* es constitutiva en *Arabidopsis*, y no se altera en respuesta a la luz (Li y Chory, 1997), sin embargo, se han identificado otras proteínas receptoras (BRL1 y BRL3), homólogas a BRI1 que poseen alta afinidad por la brasinólida y funcionan en la diferenciación vascular (Caño-Delgado *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha clarificado la relevancia de estos otros receptores en la transmisión de señales por los BRs durante la respuesta de las plantas al estrés. Hasta fecha se ha demostrado que hay respuestas a los BRs (por ejemplo, expresión del gen *dwf4*) que aunque son mediadas por el receptor, en ella pueden participar otros

mecanismos no necesariamente dependientes de BRI1 (Tanaka *et al.*, 2005).

El gen homólogo de *bri1* en tomate se ha designado como *tbr1*. El mismo posee la región extracelular LRR, seguida de la región de transmembrana del receptor y el dominio quinasa intracelular hacia el C terminal (Montoya *et al.*, 2002). La proteína tBRI1 ha sido previamente caracterizada como un posible receptor de la sistemina, un regulador peptídico de solanáceas relacionado con la respuesta al ácido jasmónico, lo cual sugiere un papel dual para este receptor (Montoya *et al.*, 2002; 2005).

En el caso de los BRs, el reconocimiento de estas hormonas esteroidales por el receptor BRI1 regula la biosíntesis de la hormona y la posterior conexión a las rutas subsiguientes de regulación transcripcional de los genes de respuesta a los BRs. Noguchi *et al.* (1999) observan que la acumulación de BL y sus precursores, así como, la activación de los genes *dwf4* y *cpd* es dependiente de BRI1, sugiriéndose un papel del receptor en la regulación de la biosíntesis de BRs.

Sobre la transducción de señales por los BRs se conoce poco. En este aspecto, se han identificado nuevos componentes claves de las rutas de señalización a los BRs (Vert y Chory, 2006). Entre ellos, la proteína BAK1, una quinasa receptora con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK, siglas en inglés), que interactúa directamente con el receptor BRI1 de BRs (Li *et al.*, 2002; Nam y Li, 2002). Ambas quinasas muestran un patrón de expresión similar en todos los tejidos de la planta (Li *et al.*, 2002; Nam y Li, 2002; Russinova *et al.*, 2004). Posteriormente, Wang *et al.* (2005a) demuestran que esta heterodimerización se asocia con la señalización a la hormona, detectándose que la fosforilación *in vivo* de BRI1 y BAK1 se incrementa en respuesta a la brasinólida y se inhibe cuando se reduce el contenido de hormona endógena por tratamiento de un inhibidor biosintético. Wang *et al.* (2005b) sugieren que los monómeros de BRI1 interactúan para formar homo-dímeros, y que BAK1 no se requiere para que BRI1 reconozca al ligando.

También, se ha identificado la proteína BIN2, quinasa Serina-Treonina citoplasmática, involucrada en la regulación negativa de las señales de BRs (Li y Nam, 2002; Pérez-Pérez *et al.*, 2002), y la proteína BKI1 que interactúa con BRI1 y que pudiera funcionar como un regulador negativo de la señalización por los BRs (Wang y Chory, 2006); los genes homólogos BES1 y BZR1 (Yin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002), los cuales codifican para proteínas del núcleo implicadas en la señalización por BRs, demostrándose, *in vivo* e *in*

in vitro, que BIN2 fosforila estas proteínas (He *et al.* 2002; Yin *et al.*, 2002). Además, los estados de fosforilación y des-fosforilación de estas proteínas se afectan rápidamente por tratamientos con BR (Wang *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002). BES1 y BZR1 son capaces de unirse directamente a secuencias reguladoras de genes de respuesta a los BRs (Yin *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005). En presencia de BRs, el regulador positivo BES1 determina predominantemente la expresión de genes inducidos por estos compuestos; mientras que el regulador negativo BZR1 debe mantener la represión de genes inhibidos por los BRs (Deng *et al.*, 2007). La proteína EXO puede ser otro componente de la señalización de los BRs que puede estar relacionado con la regulación de genes del crecimiento (Coll, 2005).

2.6.4 Mutantes deficientes e insensibles a los brasinoesteroides. Interés de su estudio en el tomate.

Los mutantes deficientes de la hormona constituyen herramientas valiosas para la identificación de los pasos de la biosíntesis de los BRs. Se han obtenido mutantes en *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum* y en otras especies, los cuales muestran características de plantas crecidas a la luz aún cuando crecen en la oscuridad. En particular, los mutantes de *Arabidopsis* cuando crecen en la luz tienen un fenotipo extremadamente enano con hojas de color verde intenso, reducción de la fertilidad masculina, dominancia apical y retardo de la floración (Clouse y Sasse, 1998).

Dentro de estos mutantes, se han caracterizado, entre otros: *det2*, *cpd*, *dwf1*, *dwf4* y *dwf7* como deficientes en la biosíntesis de brasinoesteroides, en la especie *Arabidopsis* (Nomura *et al.*, 2001). El fenotipo de los mutantes con afectaciones en etapas tempranas relacionadas con la síntesis de esteroides, entre los que se encuentran *dwf7* y *dwf1* (Figura 1), presentan defectos más moderados que el resto de los mutantes, aunque las razones de este comportamiento son desconocidas. El fenotipo enano de todos estos mutantes puede restablecerse, total ó parcialmente por las aplicaciones exógenas de BRs, pero no por el uso de otras hormonas, lo cual indica que sus defectos se deben a la deficiencia de BRs (Clouse y Sasse, 1998).

En tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ocurre la ruta de oxidación tardía del C-6 que incluye a los intermediarios 6-desoxoteasterona, 3-deshidro-6-desoxoteasterona, 6-desoxotifasterol y la 6-desoxocastasterona. En esta especie se han caracterizado dos mutantes deficientes de

BRs, el alelo mutante nulo con enanismo extremo d^x (Bishop *et al.*, 1999) y el mutante *dpy* (Koka *et al.*, 2000).

El mutante *dpy* es defectuoso en la hidroxilación del C-23 de la cadena lateral, en la síntesis de 6-desoxo-teasterona a partir de la 6-desoxo-catasterona (Koka *et al.*, 2000), similar al paso que cataliza el gen *cpd* en *Arabidopsis* (Figura 1). Las plantas de este mutante exhiben una estatura corta, reducción de las ramas laterales, y alteraciones de la morfología foliar y mantuvieron su respuesta a hormonas como el etileno, las giberelinas y las auxinas (Koka *et al.*, 2000).

Las plantas d^x (enanas extremas) manifiestan un fenotipo característico con reducción severa del crecimiento del tallo, alteraciones en la morfología foliar y deficiencias en sus tejidos vegetativos del BR activo, castasterona, aunque estas plantas producen frutos durante el desarrollo reproductivo. El fenotipo normal de este mutante se restablece parcialmente por la aplicación exógena de la CS (Bishop *et al.*, 1999).

El gen *d*, de las plantas enanas d^x , codifica la enzima CYP85A1 que cataliza la síntesis de la castasterona a partir de la 6-desoxo-castasterona (Figura 1). El gen se expresa en tejidos vegetativos y en frutos, y se considera clave en la fase de activación final de la biosíntesis de los BRs (Bishop *et al.*, 1999); no solamente en tomate sino también en *Arabidopsis* y guisante (Nomura *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que la expresión del gen *d* se localiza, fundamentalmente, en los meristemas apicales de las plántulas (Pien *et al.*, 2001; Castle *et al.*, 2005; Montoya *et al.*, 2005).

La sobreexpresión del gen *d* (CYP85A1) en las plantas deficientes d^x restaura el fenotipo salvaje de las plantas, generándose las plantas transgénicas (35SD) que crecen más rápidamente y contienen niveles elevados de la castasterona, observándose que las mismas acumulan el doble de la castasterona que se encuentra en las plantas de tomate del genotipo silvestre (Bishop *et al.*, 1999).

En el crecimiento vegetativo de esta especie se encuentra la castasterona, mientras que la brasinólida está ausente, y aparece luego durante el desarrollo del fruto. Esto sugiere que, en tejidos vegetativos del tomate, la castasterona debe actuar como el principal brasinoesteroide activo, mientras que la brasinólida parece jugar un papel durante el desarrollo reproductivo (Nomura *et al.*, 2005).

Sin embargo, en contraste a los rápidos progresos en el estudio de los BRs en dicotiledóneas, los avances en monocotiledóneas han sido más discretos. En años recientes, se han aislado tres mutantes de arroz deficientes de BRs, el *d11*, *d2 brd1* y *brd2* (Hong *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2005; Tanabe *et al.*, 2005). El análisis fenotípico de los mutantes de arroz ha confirmado que los BRs son importantes para la elongación del segundo entrenudo, la inclinación de la lámina del arroz y la foto-morfogénesis.

Los mutantes deficientes de BRs han sido útiles no solamente para los estudios de genes de la biosíntesis de la hormona, sino también en el análisis de otros genes y efectos de estos compuestos. Así, con la ayuda de mutantes deficientes se ha demostrado la regulación por BRs de diferentes genes del metabolismo del carbono, genes de estrés como las HSPs, las POX, entre otros (Goda *et al.*, 2002). En *Arabidopsis*, se han utilizado mutantes deficientes para caracterizar procesos como el estrés oxidativo inducido por sustancias químicas oxidantes y el papel de las HSPs en la termotolerancia (Cao *et al.*, 2005; Kagale *et al.*, 2007). Sin embargo, los mutantes de tomate no se han caracterizados en relación a las respuestas del estrés en esta especie vegetal.

Por otro lado, el valor de los mutantes hormona-insensibles en desenredar las rutas de transducción de señales en las plantas se ha demostrado para el etileno (Ecker, 1995) y el ácido abscísico (Finkelstein y Zeevart, 1994). Este enfoque también ha resultado exitoso en el estudio de los brasinoesteroides.

Clouse *et al.* (1996) identifican un mutante BR-insensible en *Arabidopsis* por la capacidad de las plantas mutantes de alargar sus raíces en la presencia de concentraciones inhibitorias de BR con respecto al tipo silvestre. En *Arabidopsis*, ese mutante denominado *bri1* muestra los defectos pleiotrópicos severos en el desarrollo como el enanismo, la des-etiolación, la esterilidad masculina y la morfología foliar alterada; sin embargo, a diferencia de los mutantes biosintéticos, *bri1* no restablece su fenotipo por la aplicación de la hormona exógena (Clouse *et al.*, 1996). Este mutante retiene, no obstante, su sensibilidad a las auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Yamamuro *et al.* (2000) caracterizan el primer mutante insensible a BRs en arroz (d61) y clonan el gen responsable de la mutación (*osbri1*), el cual codifica para una posible proteína quinasa receptora (RLK), similar al gen *bri1* de *Arabidopsis*.

En tomate, Koka *et al.* (2000) identifican un mutante insensible (*cu3*) por la capacidad de las plantas de alargar sus raíces en presencia de 24-epibrasinólida. Las plantas de este mutante presenta enanismo extremo, alteración de la morfología foliar, defecto en la fotomorfogénesis, y reducción de la fertilidad, características similares a las encontradas en el mutante *bri1* (Koka *et al.*, 2000). Montoya *et al.* (2002) caracterizan el mutante *cu3*, demostrándose que determina la proteína homóloga en tomate de BRI1, denominada tBRI1. También en tomate se identificó el mutante parcialmente insensible a los BRs, *abs1* (mutante 1 con sensibilidad a la brasinólida alterada), el cual corresponde a un alelo recesivo débil del mutante insensible *cu3*. El mutante *abs1* contiene una mutación sin sentido en el dominio quinasa del receptor (LRR-RLK), la cual es responsable de la actividad receptora y el alelo débil en el mismo (Montoya *et al.*, 2002). El contenido de los BRs y la expresión de genes biosintéticos son elevados en este mutante insensible (Montoya *et al.*, 2002).

Por otro lado, el tomate es una planta C3 de interés económico que se ha utilizado como modelo en los estudios fisiológicos y bioquímicos con relación al choque por temperatura alta y en la búsqueda de mecanismos de aclimatación a las temperaturas altas (Cuartero *et al.*, 1995; Camejo *et al.*, 2006). La disponibilidad de mutantes de tomate, deficientes e insensibles a los BRs, permite el estudio del papel de la homeostasis de la hormona endógena en la termotolerancia.

En Cuba, el cultivo del tomate, al igual que en la mayoría de los países tropicales, se limita generalmente al período de invierno, debido a los bajos rendimientos y la baja calidad de los frutos en las siembras fuera de ese período. Las temperaturas altas constituye uno de los factores más importantes que inciden en la baja producción de tomate en ambientes tropicales (Abdelmageed *et al.*, 2004). Este efecto se multiplica debido al calentamiento global que se incrementará en los próximos años (Sato y Peet, 2005). De ahí que resulte de gran interés práctico la búsqueda de estrategias de aplicación de brasinoesteroides para incrementar la termotolerancia y por ende, el rendimiento y la calidad de los frutos de este cultivo en período no óptimo de producción.

2.6.5 Los brasinoesteroides y las respuestas de las plantas al estrés oxidativo y por temperaturas altas

Como se mencionó anteriormente, estos compuestos se han implicado en las respuestas de las plantas a varios tipos de estrés bióticos, abióticos, y estímulos durante el desarrollo. Estas hormonas esteroidales no solamente están asociadas a procesos de crecimiento y desarrollo (Clouse y Sasse, 1998) sino también a la inducción de la termotolerancia y a la regulación de sistemas de defensas en las plantas (Schnabl *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que los BRs modulan el metabolismo oxidativo asociado a diferentes tipos de estrés, generados por oxidantes químicos, temperaturas altas, salinidad, senescencia, entre otros. Así, Cao *et al.* (2005) demuestran que la inducción de estrés oxidativo por paraquat, menadiona y peróxido de hidrógeno fue menor en plántulas de *Arabidopsis det2-9*, las cuales son deficientes de BRs endógenos. Ellos demuestran que la protección correlaciona con los incrementos de la actividad SOD y CAT, mientras que solamente genes CAT se inducen por la acción de estos inductores de la oxidación. Sin embargo, Cao *et al.* (2005) no estudian la actividad y la expresión de la enzima POX, la cual, sin embargo, muestra una expresión pronunciada en el mutante deficiente de BR tratado con la brasinólida (Goda *et al.*, 2002).

Con relación a la temperatura alta, la 24-epibrasinólida y la 22S,23S-homobrasinólida activan la síntesis de proteínas totales e inducen la síntesis de novo de polipéptidos tanto a temperaturas altas como normales en trigo. La 22S,23S-homobrasinólida también estimula la formación de gránulos de choque por temperatura alta en el citoplasma e incrementa la síntesis de las proteínas totales en condiciones de temperaturas altas (Kulaeva *et al.*, 1991).

En China, otros autores (Zhu *et al.*, 1996) encuentran que las dosis de $10^{-2} - 10 \text{ mg.L}^{-1}$ de la EBL incrementa la termotolerancia, reduce el eflujo de los electrolitos y el contenido de malondialdehído (MDA), así como aumenta la actividad de algunos sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa en posturas de pepino. Por su parte, Wilen *et al.* (1995) demuestran el efecto termoprotector de la 24-epibrasinólida (EBL) en cultivo de células de *Bromus inermis*.

En Canadá, Dhaubhadel *et al.* (1999) demuestran que las posturas de *Brassica napus* y de tomate crecidas en un medio de cultivo que contenía $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de la EBL fueron

significativamente más tolerantes a un tratamiento de calor letal que las posturas control crecidas en ausencia de ese compuesto. Por su parte, Singh y Shono (2005) también confirman la inducción de la termotolerancia por aplicaciones exógenas de la EBL en plantas de tomate. En general, todos los estudios han demostrado que la inducción de la termotolerancia por los BRs se refleja en una mayor actividad fotosintética, crecimiento y sobrevivencia de las plantas bajo condiciones de estrés por temperatura alta moderada ó intensa.

Hasta la fecha, los mecanismos moleculares de inducción de la termotolerancia se han estudiado fundamentalmente en cuanto al papel de las HSPs en tomate y *Arabidopsis* (Kagale *et al.*, 2007); sin embargo, el papel de estas proteínas puede variar entre ambas especies. Así, se constata que después del estrés por temperaturas elevadas ocurre la acumulación mayor de algunos tipos de proteínas de choque térmico (HSPs) en las plantas de tomate tratadas con la EBL (Dhaubhadel *et al.*, 1999; Singh y Shono., 2005). Dentro de los genes hsp se incluyen algunos tan importantes como la HSP101 (esencial para la termotolerancia adquirida), la HSP90 (que colabora en el plegamiento del complejo receptor de los BRs) y la HSP de peso molecular bajo HSP17.6. Dhaubhadel *et al.*, 2002 demuestran que tal acumulación de HSPs se asocia a la protección mayor de la maquinaria de traducción de proteínas de las plántulas tratadas con el compuesto. Sin embargo, la expresión significativa de HSPs en respuesta a la EBL y al estrés en tejidos de tomate no se observa en *Arabidopsis*, excepto al final del período de recuperación del choque por temperatura alta.

Como se indicó anteriormente, los mutantes deficientes también han constituido una herramienta para explorar los mecanismos de acción de los BRs. Recientemente, Kagale *et al.*, 2007 en *Arabidopsis* prueban que las plántulas del mutante *det2-1* y *dwf4* expresan niveles elevados de proteínas y genes hsp durante el tratamiento térmico y en la recuperación post choque por temperatura alta. Las HSPs de las plántulas mutantes deficientes de BRs responden a la EBL, lo cual indica que los BRs endógenos no son necesarios para la inducción de HSPs por la EBL (Kagale *et al.*, 2007). Inclusive, en ausencia de estrés, los mutantes *det2-1* y *cpd* tienen un nivel elevado de genes hsp (Szekeres y Koncz, 1998; Kagale *et al.*, 2007). No se han publicado estudios de expresión de hsp en mutantes deficientes e insensibles de tomate.

Se sabe que los BRs interactúan con otras hormonas en los efectos del crecimiento (Clouse y Sasse, 1998) y ellos también regulan la expresión de genes de la biosíntesis/metabolismo de auxinas, las giberelinas y el etileno (Goda *et al.*, 2002; Yi *et al.*, 1999). Se han obtenido evidencias de expresión génica relacionadas con la síntesis del etileno, la interacción con otras fitohormonas (Bishop y Koncz, 2002). Así, en el frijol mungo (*Vigna radiata*), se encuentra que los BRs inducen genes de la ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico sintasa (ACC sintasa), enzima responsable de la síntesis del etileno (Yi *et al.*, 1999). En *Arabidopsis*, Mussig *et al.* (2000) detectan la expresión del gen *opr3*, relacionado con la síntesis de ácido jasmónico. La brasinólida induce la expresión de los genes *ga20ox1* y *cycd3*, relacionados con el metabolismo de giberelinas (Bouquin *et al.*, 2001) y la regulación de la división celular (Hu *et al.*, 2000), respectivamente.

Puede decirse que a pesar de los numerosos estudios sobre las interacciones entre los BRs y el resto de las hormonas (Clouse y Sasse, 1998; Coll, 2005), se han examinado poco sus interconexiones en relación a mecanismos de la tolerancia a las altas temperaturas (Krishna, 2003). En este sentido, se conoce que la EBL y el ácido absícico modulan diferencialmente los niveles de los transcritos de la HSP90 (Wilen *et al.*, 1995) ante choque por temperatura alta. Por otra parte, no se han encontrado estudios publicados que analicen la influencia del estrés oxidativo y de temperaturas altas en la expresión de genes *cit P450* de la biosíntesis y el metabolismo de BRs y en cambios del contenido de hormona endógena.

2.6.6 Análogos espirostánicos de brasinoesteroides

Los BRs generaron desde muy temprano interés práctico en la agricultura, inicialmente en la aplicación de compuestos naturales como promotores de los rendimientos de los cultivos (Ikekawa y Zhao, 1991), y más adelante, debido a problemas de las aplicaciones de los BRs naturales en condiciones de campo, la introducción de análogos de BRs, cuyos efectos tenían una duración más prolongada en el tiempo en esas condiciones y a la vez, su obtención era mucho más económica, atrajo la atención de diversos investigadores (Khripach *et al.*, 1999).

A pesar de sus características estructurales similares a los BRs naturales, no se sabe si los análogos de BRs poseen actividad brasinoesteroide *per se* ó si ellos interactúan con los BRs endógenos para ejercer su acción (Núñez *et al.*, 2003).

De manera general, los análogos de BRs pueden ser divididos en tres grandes grupos: los análogos de la cadena lateral, análogos del núcleo esteroidal y análogos con modificaciones tanto en el núcleo esteroidal como en la cadena lateral. Por ejemplo, los análogos espirostánicos de brasinoesteroides presentan el anillo espirocetálico en lugar de la cadena lateral típica de los brasinoesteroides naturales y se ha demostrado que algunos presentan actividad promotora del crecimiento (Coll *et al.*, 1995; Khripach *et al.*, 1999; Núñez *et al.*, 2003). Dentro de esta clase de análogos resulta atractivo el estudio de los que poseen el núcleo esteroidal similar a la castasterona (CS).

En Cuba se han realizado numerosos estudios de las respuestas fisiológicas de las plantas a los análogos espirostánicos de castasterona en múltiples especies (González *et al.*, 1998; Núñez *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2003). En cuanto al efecto de estos compuestos en el estrés, García *et al.* (2005) demuestran el efecto del análogo MH5 en la estimulación de la tolerancia de las plántulas de arroz crecidas *in vitro*, ante un estrés por déficit hídrico durante 24 horas. También, González *et al.* (2005) encuentran un efecto positivo de este compuesto en la tolerancia de vitroplantas de banano a un estrés por temperatura baja.

Específicamente en el estrés por temperatura alta, se ha reportado que la incubación de tejido foliar de tomate con $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ del BB-6 (formulación que tiene como ingrediente activo un análogo espirostánico de castasterona) propicia la granulación en el núcleo, nucleolo y citoplasma, así como más desarrollo del retículo endoplasmático, cuando éste se somete a una temperatura de 40°C por 1.5 horas, aunque no se demuestra si hubo protección ó no (Sam *et al.*, 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que un BR sintético con un grupo hidroxilo en la posición 5 con estereoquímica α manifiesta actividad promotora del crecimiento (Brosa *et al.*, 1998), sin embargo esta función OH no aparece en los compuestos naturales.

No hay antecedentes de la utilización de análogos espirostánicos de brasinoesteroides para incrementar la tolerancia de las plantas al estrés por altas temperaturas, por lo que resulta de gran interés científico-técnico y práctico conocer las potencialidades de algunos de estos compuestos de actuar como inductores de la termotolerancia en plantas de tomate.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales vegetales

Los experimentos se ejecutaron en instalaciones de la División de Biología del Imperial College-London (Wye Campus), Reino Unido y del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Para ello se emplearon plantas de distintos genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), caracterizados por cambios genéticos que originan niveles endógenos diferentes de la castasterona (CS) (Tabla 1). Así, se utilizaron plantas de tomate del mutante enano d^x (LA3615) con el gen biosintético d bloqueado y que resulta deficiente de castasterona, (ver la estructura de la CS en la figura 2B). Este mutante fue obtenido por J. Maxon Smith (Genética Práctica de Plantas, Littlehampton, Reino Unido). También se emplearon plantas del mutante enano (*abs1*), que resultó de una mutación del dominio quinasa del receptor tBRI1 de los BRs. Las plantas de este mutante tienen alterada la sensibilidad a los BRs y poseen un nivel endógeno elevado de la CS. Este mutante procede de una colección de mutaciones mantenida por el Rick Stock Center, Universidad de California, Davis (Estados Unidos). Se utilizaron plantas transgénicas (35SD), que se caracterizan por la acumulación de CS y la reversión del enanismo del mutante d^x ya que sobreexpresan constitutivamente el gen d , bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S). Las plantas del genotipo 35SD fueron generadas previamente mediante la transformación del mutante d^x con la construcción pGB1421, según describe Bishop *et al.* (1999). Los genotipos d^x y 35SD constituyen líneas isogénicas de la variedad de tomate Ailsa Craig (LA2838A), un genotipo no alterado genéticamente en la biosíntesis y reconocimiento de los BRs, por lo cual posee un nivel normal de la CS. El genotipo Ailsa Craig fue igualmente obtenido de J. Maxon Smith (Genética Práctica de Plantas, Littlehampton, Reino Unido).

Por otra parte, se emplearon plántulas de tomate de un genotipo cubano, variedad Amalia, que muestra un comportamiento de termotolerancia intermedio entre Campbell-28 (variedad susceptible) y Nagcarlang (genotipo tolerante), según Camejo *et al.* (2006). El cultivar Amalia fue obtenido en el Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (Álvarez *et al.*, 1997)

Tabla 1. Características generales de los genotipos de tomate con la homeostasis de la CS alterada (Bishop *et al.*, 1999 y Montoya *et al.*, 2002).

Genotipo	Alteración genética	Fenotipo resultante	Contenido BR activo
Ailsa Craig (AC)	Gen d normal	Normal	Castasterona (+) ($2,17 \times 10^{-7} \text{g.kg}^{-1}$ MFA)
d^x	Mutación nula del gen d	Enano	Castasterona (--) (No detectable)
35SD	Sobre-expresión del gen d	Crecimiento acelerado	Castasterona (++) ($5,75 \times 10^{-7} \text{g.kg}^{-1}$ MFA)
<i>abs1</i>	Mutación del dominio quinasa de tBRI1	Enano	Castasterona (++) ($1,856 \times 10^{-6} \text{g.kg}^{-1}$ MFA)

(+) Niveles fisiológicos de la castasterona (CS)

(--) Deficiencia de CS

(++) Contenido elevado de CS

MFA Masa fresca de la parte aérea de la planta

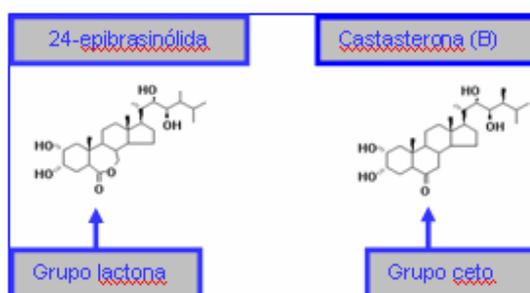


Figura 2. Estructura química de los brasinoesteroides activos, 24-epibrasinólida (A) y castasterona (B). Las flechas indican los grupos lactona y ceto de estos compuestos.

3.2 Caracterización de los diferentes genotipos de tomate con las alteraciones de la homeostasis de CS.

Las plantas de los genotipos con estas alteraciones no habían sido evaluadas desde el punto de vista de su crecimiento en relación con el estrés oxidativo y la termotolerancia. Para conocer las características del material de partida, se sembraron semillas pregerminadas de los mutantes d^x , *abs1*, la línea transgénica *35SD* y la variedad Ailsa Craig en macetas plásticas (5 L de capacidad), que contenían suelo:materia orgánica (1:1 v/v). Se emplearon seis macetas por cada uno de los genotipos y se creció una planta en cada maceta durante 45 días, en condiciones controladas de temperatura (25°C), humedad relativa del 80% y la iluminación de $2,5 \times 10^{-4} \text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Las plantas se regaron diariamente y se sometieron a la fertilización y el

manejo del cultivo adecuado para garantizar un buen crecimiento de las mismas. Con el objetivo de confirmar el fenotipo de los distintos genotipos, a los 45 días después de la siembra, se evaluaron en las seis plantas de cada genotipo los indicadores de crecimiento siguientes: la altura de la planta, el diámetro del tallo, el número de hojas, las masas secas del tallo y las hojas. Las características de crecimiento de las plantas de cada uno de los genotipos evaluados se confirmaron en un segundo experimento similar bajo las mismas condiciones experimentales.

Además, en ese mismo momento, se determinó el contenido de malondialdehído (MDA) y la actividad de la enzima peroxidasa (POX) de las plantas. Para ello, se colectó tejido foliar procedente de la cuarta hoja de 6 plantas de cada genotipo, el cual se congeló y se maceró en nitrógeno líquido, conservándose a -70°C hasta el momento de la preparación de los extractos.

3.2.1 Preparación de los extractos

Tres muestras de 0,25g de tejido se extrajeron utilizándose $2,5 \times 10^{-3}$ L de tampón fosfato de potasio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,8; EDTA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; Triton X-100 0,1% (v/v) y PVPP 1,5% (p/v). El homogenado se centrifugó a 13000 g por 20 minutos a 4°C en una microcentrifuga refrigerada (Sanyo, HAWK 15/05), colectándose el sobrenadante para los análisis de la peroxidación lipídica y los ensayos enzimáticos.

3.2.2 Análisis de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se estimó mediante la determinación del contenido de MDA como describieron previamente Heath y Packer (1968). Para el análisis, $5,0 \times 10^{-4}$ L del sobrenadante obtenido del extracto se mezcló con $5,0 \times 10^{-4}$ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5% (p/v) disuelto en ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). Las mezclas se calentaron a 95°C durante 25 minutos en tubos Eppendorf de $1,5 \times 10^{-3}$ L con orificios en la tapa para permitir la salida de los vapores, se enfriaron en hielo durante 15 minutos y luego se centrifugaron a 13000g por 10 minutos en microcentrifuga. Se midió la absorbancia a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Ultrospec 1100, Amersham Biosciences, Reino Unido). La absorbancia a 600 nm se sustrajo de la lectura que se tomó a 532 nm para descontar la absorbancia no específica. Se estimó la cantidad de malondialdehído (MDA) utilizándose el coeficiente de extinción de 155

$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, expresándose como cantidad de malondialdehído por miligramo de proteínas del sobrenadante.

3.2.3 Análisis de la actividad peroxidasa

Para el ensayo de la actividad peroxidasa, POX (EC 1.11.1.7) se utilizó $5,0 \times 10^{-5}$ L del sobrenadante colectado en una mezcla de reacción que contuvo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ del tampón fosfato, pH 7,0, pirogalol $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ y peróxido de hidrógeno 0,25% (v/v) en un volumen total de $1,0 \times 10^{-3}$ L. Estas concentraciones de los sustratos pirogalol y H_2O_2 se estandarizaron antes de realizar los ensayos. La formación de pirogalol oxidado se estimó en un espectrofotómetro con cubeta termostatada (UV/Visible Ultrospec 1100, Amersham Biosciences, Reino Unido), a través del monitoreo del incremento de la absorbancia de la purpurogalina a 420 nm cada 10 segundos en un intervalo de 1 minuto (Bergmeyer, 1974). Una unidad de actividad peroxidasa se definió como la cantidad de enzima que causó un incremento de 0,1 unidades de absorbancia por minuto a 25 °C.

3.2.4 Determinación de las proteínas solubles totales

La concentración de proteínas solubles de cada uno de los sobrenadantes se determinó por duplicado a través del método de Bradford (1976), utilizando la albúmina de suero bovino (1 g.L^{-1}) como estándar.

3.2.5 Estimación de la tolerancia de plántulas de diferentes genotipos de tomate a tratamientos de choque por temperatura alta.

Se realizó también la caracterización de la termotolerancia basal de los materiales genéticos de partida en dos condiciones: en una se crecieron las plántulas en el medio MS suplementado con la glucosa y solidificado con el agar y en la otra se emplearon plántulas desarrolladas en la solución nutritiva (Hoagland). Las semillas se esterilizaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 20 minutos y se lavaron cuatro veces con agua des-ionizada y esterilizada. En el primer caso, las semillas esterilizadas se colocaron en los potes plásticos estériles (0,9 L de capacidad) que contenían 0,1 L de medio Murashige y Skoog (MS, Duchefa, Haarlem, Holanda), ajustado a pH 5,8, suplementado con glucosa 1%

(m/v) y solidificado con agar 0,8% (m/v). En el segundo caso, las semillas esterilizadas se pregerminaron durante 5 días en placas de Petri conteniendo agua destilada y luego se transfirieron a potes plásticos estériles que contenían 0,01 L de solución nutritiva Hoagland modificada (Hoagland y Arnon, 1950), estéril y diluida con agua destilada (1:1v/v). Las plántulas se crecieron bajo condiciones de una temperatura de 25°C, la humedad relativa del 50% y un fotoperíodo de 16 horas ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, luz fluorescente).

Los potes con el medio MS que contenían las plántulas de 15 días de edad de los cuatro genotipos crecidas en presencia de la glucosa se sometieron a la temperatura de 45°C por los períodos de 4, 5, 6, 7 y 8 horas en la oscuridad en una cámara para ensayo ambiental (Sanyo, Fitotron, 170 PTX5). Por su parte, los potes con solución nutritiva que contenían plántulas de 15 días de edad se incubaron a esta misma temperatura alta durante 1, 2, 3, 4 horas en la oscuridad. Los tiempos de exposición en esta última condición fueron distintos ya que las plántulas resultaron más sensibles a la temperatura alta cuando se crecieron en solución nutritiva. En ambos bioensayos, cada pote contuvo 30 semillas y se emplearon 3 potes por cada tratamiento de temperatura alta. Tan pronto se finalizaron los choques por temperatura alta en la oscuridad, los potes con los diferentes tratamientos se colocaron inmediatamente a 25°C durante una semana (período de “recuperación”) en las condiciones de crecimiento mencionadas anteriormente. En ambos casos, el tratamiento control sin el estrés se mantuvo a 25°C también en la oscuridad.

3.2.5.1 Evaluación de la sobrevivencia

La sobrevivencia se empleó como indicador de la termotolerancia de las plántulas y se determinó al final del período de “recuperación”, o sea una semana después de la imposición del tratamiento por temperatura alta, estimándose la sobrevivencia a partir de la evaluación del número de plántulas que mantienen el ápice vivo ó la emergencia de sus primeras hojas verdaderas. Las plántulas con amarillamiento de las hojas de los cotiledones ó necrosis foliar, pero que aún sus hojas verdaderas o ápice estaban vivos con crecimiento se clasificaron como viables.

3.3 Estudio de la inducción de la termotolerancia por la 24-epibrasinólida

Para el análisis, las plántulas del genotipo Ailsa Craig, los mutantes *d^x* y *abs1* así como la línea transgénica (35SD) se desarrollaron exactamente en las dos condiciones de crecimiento

descritas en el epígrafe 3.2.5. Se empleó la 24-epibrasinólida (EBL) (ver su estructura química en la figura 2A), un brasinoesteroide natural activo biológicamente que provino de la compañía Beak Consultants Ltd, Toronto, Canadá, preparándose una solución de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ en una formulación compuesta por dimetilformamida, polietilenglicol (PM 1000) y etanol en una proporción (1:1:16 v/v/v).

La aplicación de las diferentes concentraciones de la 24-epibrasinólida en el medio MS ó en la solución nutritiva se realizó cuando las semillas ya estaban germinadas con el objetivo de descartar el efecto de este compuesto en la germinación. La adición se hizo con $5,0 \times 10^{-3} \text{ L}$ de las soluciones de este compuesto, preajustadas con las cantidades del principio activo apropiadas para lograr las concentraciones finales deseadas de 0 , $1,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$ y $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de la EBL en el medio MS ó en la solución nutritiva. A los potes del tratamiento control que no llevaba la EBL se les adicionó agua estéril preajustada con la cantidad de formulado que se utilizó para la preparación de la solución más concentrada del BR. Este tratamiento control suplementado con la solución alcohólica del formulado se incluyó para descartar el efecto en la sobrevivencia que podría ejercer el etanol presente en el formulado.

El choque por temperatura alta se impuso según se describió en el epígrafe 3.2.5, aplicándosele una temperatura de 45°C durante siete horas a los potes con el medio MS y de tres horas a los que contenían la solución nutritiva Hoagland. Todos los genotipos se colocaron conjuntamente dentro de la misma cámara para la aplicación de los choques por temperatura alta seleccionados. La termotolerancia se estimó a partir de la sobrevivencia, según se describió en 3.2.5.1.

También se emplearon otros indicadores para estimar la termotolerancia inducida por los BRs. Por un lado, la evaluación de la longitud del hipocotilo y la acumulación de la masa seca de las plántulas crecidas en ambas condiciones se realizó al final del período de “recuperación”.

Por otra parte, la estabilidad de la membrana como indicador de la termotolerancia se evaluó solamente con la concentración de la EBL que resultó más efectiva y con las plántulas de los cuatro genotipos crecidas en el medio MS, tan pronto se finalizó el tratamiento de 45°C durante las siete horas. La estabilidad de la membrana se estimó indirectamente a través de la medida del eflujo de iones (EI).

3.3.1 Determinación del eflujo de iones

Esta determinación se realizó a partir de la medida de la conductividad eléctrica, según una modificación del método de Sullivan (1972), citado por Blum (1998). Para ello se seleccionó la parte aérea de 9 plántulas por tratamiento, inmediatamente después del choque por temperatura alta, se introdujeron en tubos estériles (3 plántulas por tubo y tres tubos por tratamiento) y se lavaron tres veces con agua destilada y des-ionizada (sistema de purificación de agua, Milli-Q, Millipore, Watford, Reino Unido). Luego, a cada tubo se le añadieron $2,0 \times 10^{-2}$ L de agua des-ionizada, se taparon y se incubaron a 25°C durante 24 horas en la oscuridad. Después de la incubación se midió la conductividad de las soluciones y luego los tubos se calentaron en baño de María a 100°C durante 10 minutos para provocar la muerte al tejido. Posteriormente, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y se midió nuevamente la conductividad de las soluciones para determinar la conductividad total de las plántulas de cada uno de los genotipos.

El porcentaje de eflujo de iones (EI) a 45°C (estrés) y 25°C (control) se calculó según las expresiones

$$\text{EI (temperatura alta, \%)} = [\text{Conductividad (45°C)/Conductividad total (45°C)}] * 100$$

$$\text{EI (control, \%)} = [\text{Conductividad (25°C)/Conductividad total (25°C)}] * 100$$

Se calculó la variación del eflujo de iones que provoca el choque por temperatura alta en cada uno de los tratamientos con o sin la 24-epibrasinólida, según la fórmula:

$$\text{Incremento del EI (\%)} = [\text{EI (choque por temperatura alta) - EI (control)}]$$

3.4 Efecto de la 24-epibrasinólida en el estrés oxidativo de plántulas de diferentes genotipos de tomate sometidas a choque por temperatura alta.

Este estudio se realizó con las plántulas crecidas en el medio MS sólido suplementado con la glucosa ya que en estas condiciones las plántulas resultaron más termotolerantes. Los muestreos se realizaron antes de la imposición del tratamiento por temperatura alta, tan pronto se termina el choque térmico y una semana posterior al mismo, o sea al final del período de “recuperación”. Se colectó la parte aérea de 10 plántulas por tratamiento, las cuales se congelaron y maceraron en nitrógeno líquido, conservándose a -70°C. Los extractos se prepararon según procedimiento descrito en el epígrafe 3.2.1. El análisis de la peroxidación

lipídica y la actividad de la enzima peroxidasa se realizaron según se describe en los epígrafes 3.2.2 y 3.2.3, respectivamente.

3.4.1 Actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa.

Se evaluó el efecto de la EBL en otras enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa) de la parte aérea de las plántulas del genotipo Ailsa Craig sometidas al tratamiento por temperatura alta. Las determinaciones se realizaron en los mismos momentos indicados anteriormente y todas las actividades enzimáticas se expresaron como actividades específicas. Los ensayos enzimáticos se estandarizaron para el tomate, según la descripción realizada por Solórzano (2002).

3.4.1.1 Análisis de la actividad superóxido dismutasa

La actividad de la enzima superóxido dismutasa, SOD (EC 1.15.1.1) se analizó mediante la reducción del azul de nitrotetrazolium (NBT, siglas en inglés) según el método de Beyer y Fridovich (1987). En el ensayo se empleó de $2,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ L del sobrenadante en una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato $5,0 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹ (pH 7,8), metionina $1,3 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹, EDTA $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, NBT $7,5 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹. La reacción se realizó en tubos eppendorf en un volumen final de $1,25 \times 10^{-3}$ L y la misma se inició con la riboflavina $2,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ y exposición bajo luz blanca (15 watt, lámpara fluorescente) durante 5 minutos. La reacción se detuvo en la oscuridad. La cantidad de NBT se estimó por la absorbancia a 560nm utilizándose un espectrofotómetro con cubeta termostataada (UV/Visible Ultrospec 1100, Amersham Biosciences, Reino Unido). Una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de extracto que disminuyó en un 50% la reducción del NBT que se inhibe por la enzima. Se emplearon $2,0 \times 10^{-5}$, $4,0 \times 10^{-5}$, $6,0 \times 10^{-5}$, $8,0 \times 10^{-5}$ y $1,0 \times 10^{-4}$ L de extracto para estimar el 50% de inhibición de la reducción del NBT.

3.4.1.2 Análisis de la actividad catalasa

Para la actividad catalasa, CAT (EC 1.11.1.6) se utilizaron $5,0 \times 10^{-5}$ L del sobrenadante en la mezcla de reacción que contenía tampón fosfato $5,0 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹ (pH 7,0), y peróxido de hidrógeno $1,0 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹ en un volumen de $1,0 \times 10^{-3}$ L. La descomposición del H₂O₂ se evaluó cada 10 segundos durante 1 minuto y la cantidad de H₂O₂ se estimó por la absorbancia

a 240 nm (coeficiente de extinción del H_2O_2 a 240 nm; $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro con cubeta termostatada (UV/Visible Ultrospec 1100, Amersham Biosciences, Reino Unido). Una unidad de actividad de la catalasa correspondió a la cantidad de la enzima que descompone $1,0 \times 10^{-6}$ mol de H_2O_2 por minuto a 25°C (Aebi, 1984).

3.4.1.3 Análisis de la actividad ascorbato peroxidasa

Para el análisis de la ascorbato peroxidasa, APX (EC 1.11.1.11) se partió de un extracto que se preparó con ácido ascórbico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ya que la enzima es inestable en ausencia del sustrato. Se utilizó $5,0 \times 10^{-5} \text{ L}$ del sobrenadante en la mezcla de reacción que contuvo tampón fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,0), ácido ascórbico $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, EDTA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ y peróxido de hidrógeno $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ en un volumen final de $1,0 \times 10^{-3} \text{ L}$. El monitoreo de la oxidación del ascorbato dependiente del H_2O_2 se evaluó 10 veces en un intervalo de 100 segundos por la disminución de su absorbancia a 290 nm (coeficiente de extinción del ascorbato a 290 nm; $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro con cubeta termostatada (UV/Visible Ultrospec 1100, Amersham Biosciences, Reino Unido). Una unidad de APX se definió como la cantidad de enzima necesaria para descomponer $1,0 \times 10^{-6}$ mol del ácido ascórbico por minuto a 25°C (Nakano y Asada, 1981).

3.5 Influencia de dos análogos espiroestánicos de la castasterona y de la 24-epibrasinólida en la termotolerancia y el estrés oxidativo de plántulas de tomate var. Amalia sometidas a un choque por temperatura alta.

Con el objetivo de combinar el interés teórico con el práctico se ejecutaron experimentos donde se utilizaron dos análogos espiroestánicos de la castasterona y la 24-epibrasinólida en el genotipo de tomate Amalia, cultivar extendido en Cuba.

Para ello, las semillas de este genotipo se esterilizaron y luego se germinaron, utilizándose el medio MS solidificado con el agar y suplementado con la glucosa, según los mismos procedimientos que se describieron en el epígrafe 3.2.5. Cada pote contuvo 30 semillas del genotipo Amalia y se emplearon 3 potes por tratamiento de temperatura alta. Las plántulas se crecieron en este mismo medio MS sólido suplementado con la glucosa por 10 días adicionales en las condiciones controladas que se emplearon para el resto de los genotipos.

Para seleccionar el choque por temperatura alta a imponer, las plántulas de 15 días de edad se sometieron a tratamientos de 45 °C por 2, 3, 4 y 5 horas.

Después de la aplicación de estos choques térmicos en la oscuridad, los pots se colocaron inmediatamente en “recuperación” a 25°C durante una semana en las mismas condiciones de crecimiento que se describieron en el epígrafe 3.2.5. La sobrevivencia de las plántulas de tomate de la variedad Amalia se evaluó según se indicó para el resto de los genotipos en el epígrafe 3.2.5.1

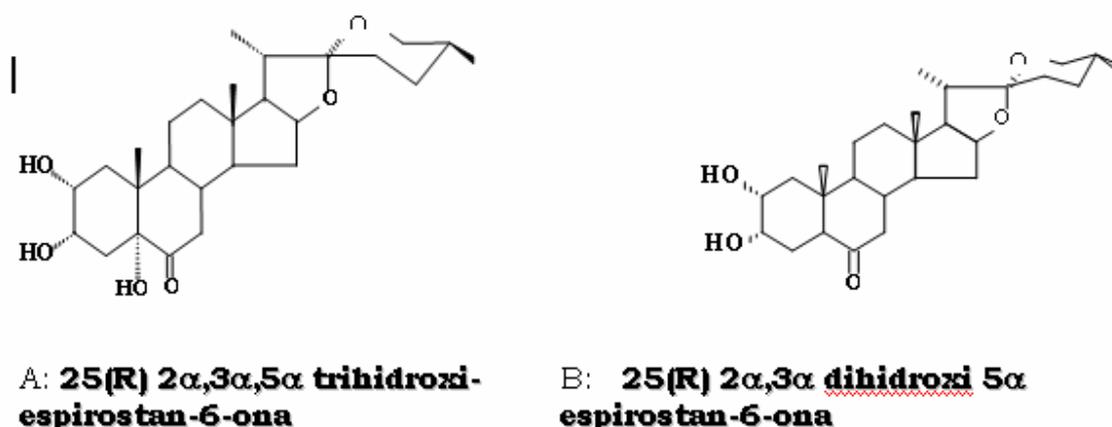


Figura 3. Estructuras químicas de los dos análogos espirostánicos de castasterona

Para el estudio de la inducción de la termotolerancia se evaluó la influencia de la 24-epibrasinólida y los análogos A y B en la sobrevivencia y el crecimiento de las plántulas de la variedad Amalia al choque de 45°C durante cuatro horas. A y B corresponden a los compuestos 25(R) 2 α ,3 α ,5 α trihidroxi-espirostan-6-ona y 25(R) 2 α ,3 α dihidroxi 5 α espirostan-6-ona, respectivamente (ver la estructura de los dos análogos en la figura 3), según se describe en Núñez *et al.* (2003). Estos compuestos se disolvieron en una solución con la misma composición de la formulación que se utilizó para la EBL, según se detalló en el epígrafe 3.3, a una concentración de 1 g.L⁻¹. Ellos fueron suministrados por el Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de la Habana.

Las condiciones de crecimiento de las plántulas, la forma de la aplicación, el rango de las concentraciones de la 24-epibrasinólida y los dos análogos, la imposición del choque por

temperatura alta, así como la estimación de la termotolerancia fueron similares a las que se describieron en el epígrafe 3.3.

También se evaluó el efecto de estos tres compuestos a la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ en el contenido de malondialdehído (MDA) y en la actividad de la enzima peroxidasa (POX). La parte aérea de las plántulas de los distintos tratamientos se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, se maceró y se conservó a -70°C hasta el momento de preparar los extractos y los muestreos se realizaron en tres momentos, según se describió en el epígrafe 3.4. El contenido de MDA, la actividad de la enzima peroxidasa y el contenido de proteínas solubles totales se determinaron con las técnicas descritas en los epígrafes 3.2.2, 3.2.3 y 3.2.4.

3.6 Análisis estadísticos.

Todos los experimentos se repitieron dos veces. Para la evaluación de la sobrevivencia se utilizaron de 45 a 60 plántulas por tratamiento en cada experimento (en total se evaluaron entre 90 y 120 plántulas por tratamiento). Los porcentajes de sobrevivencia de las plántulas de los genotipos *d^x*, *35SD* y *abs1* se compararon respecto a los valores correspondientes del genotipo Ailsa Craig. Los datos se analizaron según una prueba χ^2 de comparación de proporciones, empleándose un paquete estadístico (Compapro) desarrollado en el Departamento de Matemática del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

La altura de la planta, el diámetro del tallo, el número de hojas, la masa seca del tallo y las hojas se analizaron a partir de las 6 plantas de cada genotipo. Se calcularon las medias y se analizaron estadísticamente a través de los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

La longitud del hipocotilo y la determinación de la masa seca se realizaron con 6 plantas por tratamiento (3 muestras de 2 plantas cada una) y las medias de los valores se procesaron estadísticamente a través del análisis de los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

A los datos de los porcentajes de incremento del eflujo de iones procedentes de dos experimentos independientes (en total 6 repeticiones y 18 plántulas por tratamiento) se les realizó la comparación de medias a través de los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$). Los datos del contenido de MDA y de las actividades enzimáticas (3 muestras por tratamiento y tres repeticiones por muestra; n=9) se analizaron a través del cálculo de las medias y los intervalos de confianza.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de los diferentes genotipos de tomate con las alteraciones de la homeostasis de CS.

Para el empleo de los mutantes de los BRs como herramienta de análisis de la acción de estos compuestos en la termotolerancia se necesita de la caracterización previa de los materiales seleccionados.

Los resultados de la Tabla 2 demostraron que la deficiencia de castasterona producida por la mutación del gen *d* se manifestó en un enanismo extremo en las plantas del mutante *d^x*. Se demostró una reducción pronunciada respecto al genotipo Ailsa Craig (AC) del 75%, 88%, 86% y 87% de la altura de la planta, la acumulación de la masa seca de la hoja, el tallo y del vástago, respectivamente. Sin embargo, el diámetro del tallo disminuyó menos respecto al genotipo Ailsa Craig (35%), mientras que no se encontró una variación significativa en el número de hojas por planta.

Tabla 2. Crecimiento de plantas de los diferentes genotipos con las alteraciones del contenido de castasterona.

Indicadores/genotipos	Altura de la planta (cm)	Masa seca hojas/planta (g)	Masa seca tallo/planta (g)	Masa seca vástago /planta (g)	Diámetro del tallo (cm)	Número de hojas /planta
AC (Control)	24,2±2,8b	0,77±0,1a	0,30±0,01b	1,08±0,06a	0,49±0,08a	8,7±0,6
<i>d^x</i>	6,1±0,7d	0,09±0,01c	0,04±0,01d	0,14±0,01c	0,32±0,06b	7,8±0,6
35SD	33,0±2,7a	0,78±0,05a	0,36±0,01a	1,13±0,05a	0,44±0,05a	9,0±0,5
<i>abs1</i>	9,9±0,8c	0,24±0,01b	0,10±0,01c	0,34±0,01b	0,4±0,04ab	7,7±0,8

Se representan las medias ± intervalos de confianza. Las letras diferentes indican las diferencias significativas de la media del indicador entre genotipos.

Se encontró una mayor afectación del crecimiento en la altura del tallo que en el grosor del mismo. Se evidenció que aunque las plantas del mutante *d^x* resultaron enanas, la cantidad de hojas de las mismas no varió significativamente, lo cual sugiere que no se retrasó apreciablemente la emisión de las hojas.

Por otra parte, se demostró que las plantas 35SD mostraron mayor altura y masa seca del tallo que las del genotipo Ailsa Craig. Es decir, la sobreexpresión constitutiva del gen *d* en las plantas del genotipo *d^x* revirtió totalmente el enanismo del mutante. Así, la altura y la masa

seca del tallo de las plantas transgénicas fue de un 36% y 20% superior al de las plantas del genotipo AC. Además, en esta línea transgénica se logró revertir completamente la disminución significativa que provocó la mutación en el diámetro del tallo (Tabla 2).

Sin embargo, el resto de los indicadores de crecimiento evaluados mostraron niveles similares entre las plantas 35SD y AC, con incrementos que fueron inferiores al 5%.

Por su parte, se corroboró que el genotipo *abs1* muestra también enanismo, aunque menos extremo que el del mutante *d^x*. La altura, la acumulación de la masa seca de la hoja, el tallo y el vástago de las plantas del mutante *abs1* se redujeron respecto al genotipo AC en un 59%, 69%, 67% y 69%, respectivamente. De manera similar a lo que se observa en el mutante *d^x*, se demostró que el crecimiento en el grosor del tallo y el número de hojas del genotipo *abs1* resultaron similares (reducciones del 18% y 11,5%), respecto al de AC (Tabla 2).

El aporte de la tesis en este aspecto está relacionado con la asociación entre el crecimiento mediado por los BRs con la peroxidación lipídica y la actividad de la enzima POX. Así, se demostró que la deficiencia de CS en el mutante *d^x* incrementó el contenido del MDA y la actividad POX respecto al genotipo AC de manera mucho más pronunciada que el aumento observado en las plantas de la línea 35SD y del genotipo *abs1* (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de malondialdehido (MDA) y actividad de la peroxidasa (POX) de plantas de los diferentes genotipos

Genotipos	Contenido de MDA (10 ⁻⁶ mol MDA. mg ⁻¹ de proteína)	Actividad POX (U.mg ⁻¹ de proteína)
AC	60,6±0,53d	110,40±2,1d
<i>d^x</i>	99,8±0,21a	235,78±1,4a
35SD	79,3±0,94c	160,1±3,8c
<i>abs1</i>	88,7±0,87b	205,7±4,6b

Se representan las medias ± intervalo de confianza del contenido de MDA y la actividad de la enzima POX. Las letras diferentes indican las diferencias significativas de la media del indicador entre genotipos

Lo más importante a resaltar es que tanto en las plantas deficientes como en las que presentan CS se observó un aumento del contenido de MDA y la actividad de la enzima POX con relación al genotipo AC.

En cuanto a la caracterización de la termotolerancia basal de los genotipos seleccionados, los resultados demostraron las diferencias en la sensibilidad de las plántulas de los mismos a períodos diferentes de la aplicación de la temperatura de 45 °C (Tabla 4). Se demostró que el genotipo *abs1* resultó el más termotolerante en las dos condiciones de crecimiento utilizadas, encontrándose los mayores porcentajes de sobrevivencia de las plántulas de este mutante ante todos los tratamientos térmicos evaluados (Tabla 4). Sin embargo, las plántulas sobrevivientes de este mutante mostraron signos de amarillamiento y daño foliar (Figura 4D).

Tabla 4. Porcentajes de sobrevivencia de plántulas de diferentes genotipos de tomate crecidas en medio MS y sujetas a 45°C por 4, 5, 6, 7 y 8 horas ó crecidas en solución nutritiva Hoagland y sometidas a 45°C por 1, 2, 3 y 4 horas.

Tratamientos/genotipos (MS)	AC	<i>d^x</i>	35SD	<i>abs1</i>
45°C-4 horas	82,1±1,7	85,4±3,4	81,1±3,0	100 (*)
45°C-5 horas	50,2±4,0	42,1±3,2	45,7±5,1	97,2±2,8 (*)
45°C-6 horas	36,1±2,2	38,0±4,6	34,0±2,3	92,54±4,0 (*)
45°C-7 horas	24,5±2,1	30,0±1,47 (*)	18,25±0,63 (*)	88,25±2,95 (*)
45°C-8 horas	3,0±2,6	0	0	60,0 (*)
(Hoagland)				
45°C-1 hora	87,0±3,2	90,3±1,4	91,4±5,2	98,2±0,7 (*)
45°C-2 horas	54,1±4,7	48,1±2,5	50,5±3,9	95,5±0,5 (*)
45°C-3 horas	22,2±4,0	27,0±2,3	23,4±3,0	74,5±0,7 (*)
45°C-4 horas	0	0	0	56,3±2,7 (*)

Se representan las medias de la sobrevivencia ± error estándar. Los asteriscos indican las diferencias significativas respecto al genotipo control (AC).

Por su parte, los genotipos AC, *d^x* y 35SD mostraron comportamientos de la sobrevivencia muy similares en los diferentes tratamientos por temperatura alta, independientemente del medio en que se crecieron las plántulas. La diferencia significativa entre los porcentajes de la sobrevivencia se encontró en las plántulas de estas tres líneas isogénicas crecidas en el medio MS y sometidas a 45°C durante siete horas, siendo el mutante *d^x* el genotipo con mayor valor de sobrevivencia (30%); mientras que se encontró un 24 y 18,25% de sobrevivencia en las plántulas AC y 35SD, respectivamente (Tabla 4).

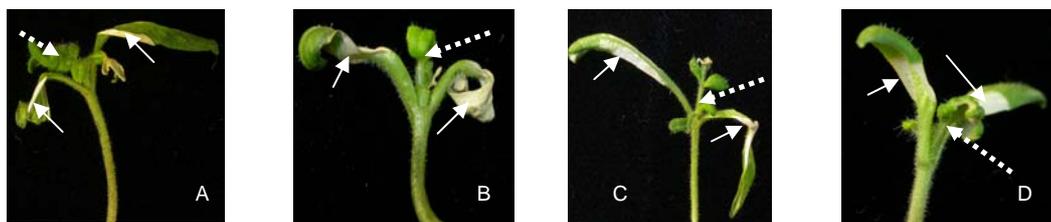


Figura 4. Plántula de los genotipos Ailsa Craig (A), mutante d^x (B), línea transgénica 35SD (C) y el mutante $abs1$ (D) clasificada como viable después de una semana de “recuperación” del choque de 45°C durante siete horas. Las flechas continuas indican signos visibles de daño inducido por la temperatura alta y las discontinuas la emergencia de las hojas verdaderas.

No obstante, las plántulas del mutante d^x mostraron síntomas visibles de daño foliar apreciables (Figura 4B).

Se demostró que la mayor reducción del número de plántulas viables crecidas en el medio MS ocurrió entre las siete y ocho horas de duración del choque por temperatura alta; sin embargo, el fenómeno se manifestó desde los primeros momentos del estrés cuando las plántulas se crecieron en la solución nutritiva. Esta evidencia sugiere que las afectaciones comienzan a desarrollarse más rápidamente al crecer las plántulas en la solución nutritiva que en el medio MS. De hecho, se determinó una mayor sensibilidad de las plántulas al choque térmico en la solución nutritiva Hoagland.

Un aporte de la tesis fue la demostración del nivel elevado de estrés oxidativo basal en los dos mutantes enanos de tomate, genotipos con cantidades extremas de la CS. Paradójicamente, la línea transgénica 35SD que revirtió el enanismo de las d^x también tuvo mayor cantidad del MDA.

Por su parte, se encontró que la termotolerancia varió poco entre la variedad AC con los genotipos d^x y 35SD a pesar del nivel más alto de estrés oxidativo basal de estos últimos. Se observó también una termotolerancia superior del mutante $abs1$, sin embargo, las plantas de este genotipo mostraron mayor nivel basal de estrés por oxidación.

4.2 Estudio de la inducción de la termotolerancia por la 24-epibrasinólida

Hasta la fecha solamente se había estudiado la termotolerancia en genotipos de tomate sin alteraciones de la homeostasis de la CS y que por tanto deben presentar cantidades normales

de hormona dentro de los rangos fisiológicos. No ha sido demostrado si las respuestas de termotolerancia inducida por la EBL exógena varían de acuerdo al contenido de la CS.

Se demostró que el efecto de la EBL en el incremento de la sobrevivencia fue dependiente de la concentración (Tabla 5), observándose que la concentración de 10^{-6} mol.L⁻¹ resultó la más efectiva. Se encontró que la sobrevivencia de las plántulas del mutante deficiente fue muy sensible a la EBL ya que las mismas respondieron a las concentraciones más bajas de este compuesto (Tabla 5).

Tabla 5 Porcentajes de sobrevivencia de plántulas de los diferentes genotipos de tomate tratadas con y sin la EBL, crecidas en el medio MS y sometidas a 45°C durante siete horas ó crecidas en la solución nutritiva (Hoagland) y expuestas a 45°C por tres horas.

Tratamientos/genotipos (MS)	AC	d^x	35SD	<i>abs1</i>
45°C-7 horas	24,5±2,1	30,0±1,47	18,25±0,63	88,25±2,95
EBL (10^{-6} mol.L ⁻¹) 45°C	55,5±3,92 (127%)	78,5±5,2 (162%)	36,0±3,45 (97%)	92,75±2,39
EBL (10^{-7} mol.L ⁻¹) 45°C	27,25±1,7	64,8±1,4 (116%)	19,5±1,26	87,8±2,95
EBL (10^{-8} mol.L ⁻¹) 45°C	27±1,08	61,2±2,7 (104%)	20,25±1,1	86,5±2,18
(Hoagland)				
45°C-3 horas	22,2±4,0	27,0±2,3	22,4±3,0	74,5±2,7
EBL (10^{-6} mol.L ⁻¹) 45°C	34,1±4,5 (54%)	63,5±3,2 (135%)	31,8±1,1 (42%)	97,2±3,6 (30%)
EBL (10^{-7} mol.L ⁻¹) 45°C	27,0±1,7	50,6±3,8 (87%)	20,0±6,1	77,9±3,1
EBL (10^{-8} mol.L ⁻¹) 45°C	28,3±3,5	42,5±4,0 (57%)	24,1±2,5	78,4±3,5

Se representan las medias de la sobrevivencia ± error estándar. Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes de incremento del indicador en los tratamientos con EBL respecto a su correspondiente tratamiento control.

En general, se demostró que la respuesta a la EBL fue más pronunciada en el medio MS que en la solución nutritiva.

Una característica particular que se demostró fue que la sobrevivencia del mutante *abs1* no se incrementó por la aplicación exógena de la EBL en el medio MS, lo cual pudo deberse al alto número de plántulas vivas de este mutante. Sin embargo, la EBL incrementó la sobrevivencia de las mismas cuando crecieron en la solución nutritiva (Tabla 5).

Tabla 6. Longitud del hipocotilo de plántulas de los diferentes genotipos de tomate crecidas en medio MS con y sin la EBL, mantenidas a la temperatura de 25°C ó sometidas al choque térmico de 45°C durante siete horas.

Genotipo/tratamientos	AC	d^x	35SD	<i>absI</i>
Control 25°C	5,38±0,26	2,23±0,2	5,68±0,33	4,63±0,33
Control 45°C	3,45±0,32 (36%)	1,33±0,33 (40%)	3,47±0,25 (39%)	3,83±0,24 (17%)
EBL (10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) 25°C	6,78±0,29	3,28±0,19	7,65±0,27	5,13±0,36
EBL (10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) 45°C	5,30±0,61 (22%)	2,93±0,25 (11%)	6,05±0,49 (21%)	4,95±0,40 (4%)
EBL (10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹) 25°C	6,75±0,33	3,23±0,25	7,55±0,27	5,13±0,36
EBL (10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹) 45°C	5,43±0,61 (20%)	2,87±0,21 (11%)	5,85±0,44 (23%)	4,95±0,40 (4%)
EBL (10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹) 25°C	5,42±0,20	3,38±0,20	5,70±0,41	4,73±0,35
EBL (10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹) 45°C	3,52±0,34 (35%)	2,82±0,42 (17%)	3,63±0,19 (36%)	3,98±0,29 (16%)

Se representan las medias de la longitud del hipocotilo (cm) ± intervalos de confianza. Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes de reducción del indicador en condiciones del tratamiento por temperatura alta respecto a su correspondiente tratamiento a 25°C.

Tabla 7. Longitud del hipocotilo de plántulas de los diferentes genotipos de tomate crecidas en la solución nutritiva Hoagland con y sin la EBL, mantenidas a la temperatura de 25°C ó sometidas al choque térmico de 45°C durante tres horas.

Genotipo/tratamientos	AC	d^x	35SD	<i>absI</i>
Control 25°C	5,82±0,27	2,57±0,23	7,25±0,23	5,35±0,25
Control 45°C	3,60±0,21 (38%)	1,53±0,17 (40%)	4,78±0,24 (34%)	4,52±0,26 (16%)
EBL (10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) 25°C	7,0±0,31	3,48±0,19	7,83±0,26	5,35±0,34
EBL (10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) 45°C	4,93±0,39 (30%)	2,93±0,32 (16%)	5,67±0,51 (28%)	5,17±0,53 (3%)
EBL (10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹) 25°C	6,83±0,37	3,35±0,28	7,72±0,37	5,20±0,41
EBL (10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹) 45°C	4,72±0,42 (31%)	2,87±0,26 (14%)	5,55±0,47 (28%)	5,0±0,44 (4%)
EBL (10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹) 25°C	5,77±0,37	3,42±0,36	7,20±0,26	5,37±0,25
EBL (10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹) 45°C	3,65±0,32 (37%)	2,92±0,37 (15%)	4,92±0,53 (32%)	4,58±0,23 (14%)

Se representan las medias de la longitud del hipocotilo (cm) ± intervalos de confianza. Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes de reducción del indicador en condiciones del tratamiento por temperatura alta respecto a su correspondiente tratamiento a 25°C.

Es importante decir que, al cabo de una semana de “recuperación” en presencia del fotoperíodo de 16 horas de luz, las plántulas viables tratadas con el choque por temperatura alta mostraron grados diferentes de daño foliar. De hecho, la sobrevivencia es un indicador que se relaciona con la capacidad del meristemo apical de continuar su crecimiento,

independientemente del grado de daño que tuvieran las plántulas y el momento de aparición del mismo.

En ambas condiciones (Tablas 6 y 7) se observó que los porcentajes de reducción del alargamiento del hipocotilo de las plántulas de todos los genotipos resultó apreciablemente menor ante la presencia de la EBL a la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ y $1,0 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹. La respuesta a estas dos concentraciones de la EBL fue más pronunciada en las plántulas de ambos mutantes.

Se demostró que las plántulas deficientes resultaron muy sensibles a la EBL ya que respondieron a la concentración de $1,0 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹; mientras que el resto de los genotipos a esta concentración tuvieron reducciones de la longitud del hipocotilo similares a las observadas en los tratamientos controles (Tablas 6 y 7).

Es importante notar que la longitud del hipocotilo de las plántulas de los genotipos AC, 35SD y *abs1* sometidas a la temperatura alta respondió a la concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹, sin embargo, la sobrevivencia no se incrementó a esta misma concentración (Tabla 5). Es decir, el alargamiento del hipocotilo resultó más sensible a la EBL que la sobrevivencia en estos tres genotipos de tomate.

Al analizarse el indicador masa seca se corroboró que la EBL a las concentraciones de $1,0 \times 10^{-6}$ y $1,0 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹ fue capaz de disminuir la reducción que provocó el choque térmico en las plántulas de todos los genotipos, siendo la reducción más marcada en las del mutante *abs1* y *d^x* (Tabla 8 y 9).

En general, los porcentajes de reducción de la masa seca de las plántulas de estos dos mutantes fueron menores en los tratamientos con la EBL a la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ en comparación con sus correspondientes controles sin la EBL. Es necesario decir que la masa seca como indicador de la termotolerancia tuvo una respuesta a la EBL menos notable que la longitud del hipocotilo en todos los genotipos (Tablas 6-7 y 8-9).

Tabla 8. Acumulación de masa seca de plántulas de los diferentes genotipos de tomate crecidas en medio MS tratadas con y sin la EBL, mantenidas a la temperatura de 25°C ó sometidas al choque térmico de 45°C durante 7.

Genotipo/tratamientos	AC	d^x	35SD	<i>abs1</i>
Control 25°C	3,28±0,02	2,81±0,04	3,62±0,03	2,93±0,03
Control 45°C	1,07±0,01 (67%)	0,70±0,04 (75%)	1,11±0,01 (69%)	1,23±0,02 (58%)
EBL (10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) 25°C	3,36±0,01	2,82±0,02	3,64±0,01	3,03±0,01
EBL (10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) 45°C	1,36±0,03 (60%)	1,02±0,03 (64%)	1,23±0,05 (66%)	1,66±0,02 (45%)
EBL (10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹) 25°C	3,31±0,01	2,77±0,02	3,58±0,01	3,0±0,02
EBL (10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹) 45°C	1,30±0,04 (61%)	0,94±0,02 (66%)	1,17±0,05 (67%)	1,54±0,03 (49%)
EBL (10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹) 25°C	3,25±0,02	2,80±0,02	3,59±0,04	2,92±0,04
EBL (10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹) 45°C	1,04±0,02 (68%)	0,93±0,02 (67%)	1,09±0,02 (70%)	1,20±0,03 (59%)

Se representan las medias de la masa seca (10⁻³g) ± intervalos de confianza. Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes de reducción del indicador en condiciones del tratamiento por temperatura alta respecto a su correspondiente tratamiento a 25°C.

Los resultados de las tablas 8 y 9 también demostraron la mayor sensibilidad de las plántulas del mutante deficiente a la EBL ya que las mismas respondieron a la concentración más baja del compuesto; mientras que las plántulas de los otros genotipos no lo hicieron.

Tabla 9. Acumulación de masa seca de plántulas de los diferentes genotipos de tomate crecidas en solución nutritiva con y sin la EBL, mantenidas a la temperatura de 25°C ó sometidas al choque térmico de 45°C durante tres horas.

Genotipo/tratamientos	AC	d^x	35SD	<i>abs1</i>
Control 25°C	3,48±0,02	2,89±0,04	3,98±0,03	3,16±0,03
Control 45°C	1,16±0,01 (67%)	0,78±0,04 (73%)	1,11±0,01 (72%)	1,29±0,03 (59%)
EBL (10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) 25°C	3,92±0,02	3,41±0,05	4,51±0,03	3,55±0,04
EBL (10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹) 45°C	1,62±0,03 (59%)	1,38±0,03 (60%)	1,47±0,02 (67%)	1,83±0,02 (48%)
EBL (10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹) 25°C	3,77±0,03	2,93±0,06	4,47±0,03	3,48±0,04
EBL (10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹) 45°C	1,52±0,03 (60%)	1,25±0,03 (57%)	1,40±0,03 (69%)	1,79±0,02 (49%)
EBL (10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹) 25°C	3,35±0,05	2,90±0,04	4,0±0,02	3,19±0,04
EBL (10 ⁻⁸ mol.L ⁻¹) 45°C	1,21±0,04 (64%)	1,28±0,04 (56%)	1,09±0,01 (73%)	1,26±0,03 (61%)

Se representan las medias de la masa seca (10⁻³g) ± intervalos de confianza. Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes de reducción del indicador en condiciones del tratamiento por temperatura alta respecto a su correspondiente tratamiento a 25°C.

En general, se confirmó que la concentración de 1,0x10⁻⁶ mol.L⁻¹ de la EBL poseyó la mayor capacidad de inducir la termotolerancia de las plántulas de todos los genotipos evaluados.

Resultados similares han sido expuestos por Singh y Shono (2005) al demostrar la mayor inducción ante la aspersión foliar de la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de la EBL.

Una evidencia importante es el hecho de que las plántulas del genotipo *abs1* mostraron una respuesta a la aplicación exógena de la EBL, aún cuando las mismas poseen el nivel más elevado de la CS.

En el presente estudio, también se ensayó la concentración de $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹, sin embargo, esta inhibió significativamente el crecimiento del hipocotilo de las plántulas del genotipo Ailsa Craig (Anexo 1a) y el mutante *d^x* (Anexo 1b) por lo que esta concentración, por resultar inhibitoria del crecimiento, no se escogió para el estudio de la sobrevivencia. Este efecto inhibitorio de las concentraciones altas de la EBL en el crecimiento coincidió con las investigaciones de Singh y Shono (2005) quienes demuestran, en tomate, que esta misma concentración inhibió el crecimiento y condujo a un menor incremento de la termotolerancia. Sería de gran valor en futuros estudios evaluar el efecto de la EBL entre el rango de $1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ para determinar la concentración que mejor promueve la termotolerancia de las plántulas.

Las plántulas de los genotipos AC, *d^x* y 35SD sin el tratamiento con la EBL perdieron entre un 38% y 42% de los electrolitos como consecuencia de la aplicación del choque por temperatura alta (Figura 5). Aunque se detectaron diferencias significativas entre el EI de las plántulas AC y 35SD, los valores de este indicador resultaron muy similares entre las plántulas de los tres genotipos (Figura 5). Se sugiere que la alteración del gen *d* en las plántulas *d^x* y 35SD afectó poco la termotolerancia basal de estos genotipos, determinada como EI.

El tratamiento por temperatura alta produjo el menor incremento del eflujo de iones (18%) de las plántulas *abs1*, lo cual confirma la mayor termotolerancia de las mismas (Figura 5).

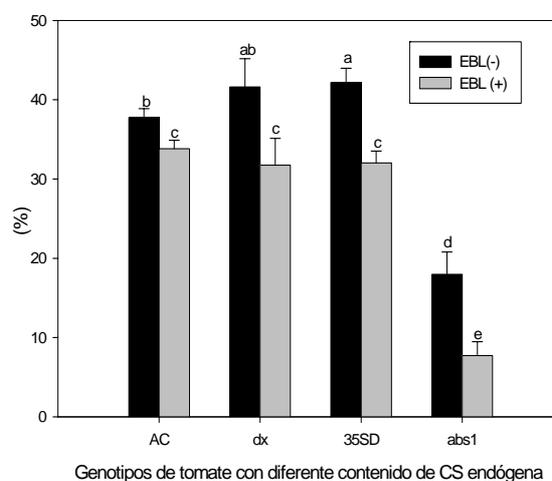


Figura 5. Porcentaje de eflujo de iones (EI) inmediatamente después de aplicarse el tratamiento de 45°C durante siete horas en plántulas de tomate de los mutantes d^x , $abs1$, la línea transgénica (35SD) y del genotipo no alterado Ailsa Craig (AC) tratadas con y sin la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de la EBL. Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según los intervalos de confianza a $\alpha < 0.05$.

Camejo *et al.* (2006) obtienen un valor de eflujo de iones de aproximadamente 50% en plantas de tomate de un genotipo susceptible tratado con un estrés moderado, el cual fue superior al encontrado en las plántulas de los genotipos utilizados en este experimento. Es conocido que las variaciones de los niveles del eflujo de iones de los tejidos de las plántulas pueden deberse, entre otros factores, a las diferencias en la composición y propiedades químico-físicas de las membranas (Chengkun *et al.*, 1996), y a la intensidad del choque por temperatura alta.

En cuanto al efecto de la EBL en este indicador, se demostró que el tratamiento de las plántulas de todos los genotipos con $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ del compuesto redujo significativamente el eflujo de iones de las mismas (Figura 5).

Se sugiere que este compuesto puede termoestabilizar la membrana de las plántulas de los genotipos estudiados. En las plántulas del mutante $abs1$, este compuesto produjo la mayor reducción del eflujo de iones (57,1%), indicando la respuesta superior de este indicador a la aplicación de la EBL en plántulas del mutante.

En conjunto, los indicadores mostrados en las tablas 6 a la 9 y en la figura 5 confirmaron que la termotolerancia basal de las tres líneas isogénicas (AC, d^x y 35SD) cambió poco entre ellas; mientras que el mutante $abs1$ fue el más termotolerante. No obstante, debe decirse que, al

evaluar la termotolerancia en base a la acumulación de la masa seca, las plántulas del mutante deficiente resultaron ligeramente más sensibles a la temperatura alta (Tablas 8 y 9), sin embargo, las mismas aún en tales condiciones sobrevivieron.

Se sugiere que la termotolerancia basal se modifica poco cuando el contenido de CS se eleva entre la deficiencia hasta una cantidad intermedia de $5,75 \times 10^{-7}$ g.kg⁻¹ de MFA (35SD). A partir de este nivel de hormona, un incremento adicional de hasta $18,56 \times 10^{-7}$ g.kg⁻¹ de MFA produce un aumento de la termotolerancia (mutante *abs1*).

Los resultados demostraron por primera vez que la inducción de la termotolerancia por la EBL es pronunciada tanto en tejidos con deficiencia como en los que poseen un nivel elevado de CS.

Se demostró además que, en general, con la aplicación de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de la EBL en el medio MS se obtuvieron los mayores niveles de inducción de la termotolerancia de las plántulas. Por ello se seleccionaron esta concentración y condición de crecimiento para los estudios del estrés oxidativo inducido por la temperatura alta.

4.3. Efecto de la 24-epibrasinólida en el estrés oxidativo de plántulas de diferentes genotipos de tomate sometidas a choque por temperatura alta.

Al evaluarse plántulas del genotipo Ailsa Craig no tratadas con la EBL, inmediatamente después del choque por temperatura alta en la oscuridad, puede constatarse que la exposición de las mismas a la temperatura alta incrementó en un 16% el contenido de malondialdehído (MDA) (Figura 6A). Este resultado difirió del obtenido por Larkindale y Knight (2002) quienes no encuentran un incremento del nivel de MDA en las plántulas de *Arabidopsis* sometidas a un choque por temperatura alta de 40°C durante 1 hora y dejadas crecer en la oscuridad. Esto sugiere que la respuesta del estrés oxidativo al choque por temperatura alta depende de la especie utilizada, del método de aplicación del tratamiento térmico así como de su intensidad.

Debe resaltarse que estas plántulas con un contenido mayor de MDA también mostraron una inhibición del crecimiento y un aumento del eflujo de iones ante el tratamiento por temperatura alta (Tablas 6 y 8, Figura 5).

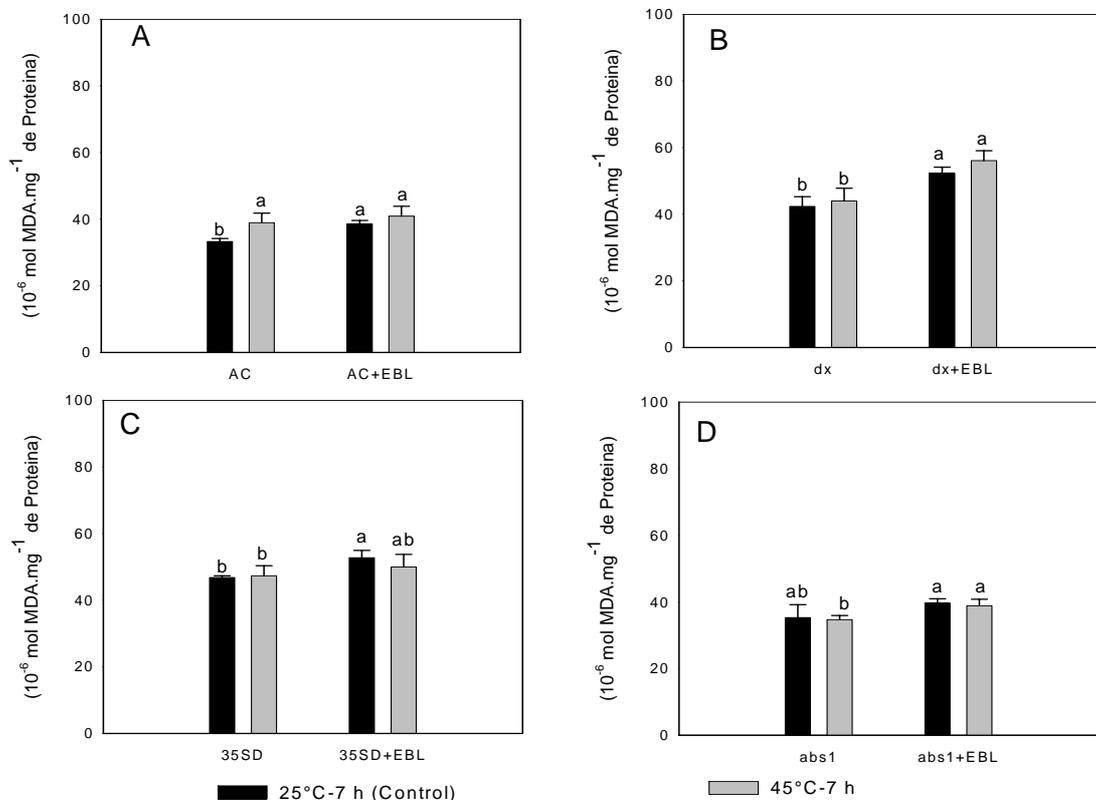


Figura 6. Contenido de malondialdehído de plántulas de tomate de los genotipos Ailsa Craig (AC), mutante deficiente (*dx*), línea transgénica (35SD) y mutante semi-insensible (*abs1*) evaluadas inmediatamente después del tratamiento de 45°C durante siete horas en la oscuridad. Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

Las plántulas del mutante *dx* y las de la línea transgénica 35SD sin tratar con la EBL no incrementaron significativamente el contenido de MDA, al someterlas al choque por temperatura alta durante siete horas en la oscuridad (Figura 6B, 6C). De igual manera, el contenido de MDA tampoco se incrementó en las plántulas del mutante *abs1* expuestas al choque por temperatura alta (Figura 6D).

Puede decirse que no hubo un incremento de la peroxidación lipídica respecto al control a 25°C en las plántulas de los genotipos alterados evaluadas inmediatamente después del tratamiento por temperatura alta, independientemente del nivel de la CS y de que fuesen enanas ó no. Sin embargo, las plántulas de estos mismos genotipos presentaron un incremento del eflujo de iones ante el choque por temperatura alta (Figura 5). Se sugiere que el efecto de

la temperatura alta alteró primariamente la estabilidad de la membrana de las plántulas de estos genotipos sin que estas tuvieran daño oxidativo, determinado como incremento del contenido de MDA.

En cuanto al efecto de la EBL en las plántulas sometidas a condiciones de choque por temperatura alta, puede observarse que el contenido del MDA de las plántulas de los genotipos AC y 35SD tratadas con la EBL mantuvo un nivel similar al de las plántulas sin tratar con el compuesto y sometidas a la temperatura alta (Figura 6A, 6C).

Inmediatamente después del choque por temperatura alta, la EBL contribuyó a un incremento significativo del contenido de MDA en las plántulas del mutante d^x sujetas a condiciones de choque por temperatura alta, mientras que este BR tuvo un efecto muy leve en la peroxidación lipídica de las plántulas del genotipo *abs1* sometidas a la temperatura alta (Figura 6B, 6D). Sin embargo, la EBL propició la reducción del eflujo de iones de las plántulas de todos los genotipos, evaluadas inmediatamente después del choque por temperatura alta (Figura 5). Esto sugiere que no siempre la termoestabilización de la membrana por la EBL tiene que estar aparejada con un cambio en el nivel de daño oxidativo de las plántulas.

También puede observarse que el nivel basal de MDA en las plántulas del mutante d^x (Figura 6B) y las del genotipo 35SD (Figura 6C) fue superior al nivel basal de las plántulas del genotipo AC. Sin embargo, el contenido basal de MDA de las plántulas del mutante *abs1* fue similar al de las plántulas AC.

La EBL contribuyó al incremento del nivel de la peroxidación lipídica en las plántulas de los genotipos AC, 35SD y d^x que se mantuvieron a 25°C. Sin embargo, en las plántulas del genotipo *abs1*, el contenido de MDA no se incrementó significativamente en respuesta a la aplicación de la EBL. Ha sido demostrado por otros autores un incremento del contenido del MDA de las plantas tratadas con los BRs en condiciones de temperatura ambiente (Zhao *et al.*, 1990; He *et al.*, 1996).

El contenido de MDA de las plántulas de todos los genotipos, mantenidas a 25°C, no varió durante las siete horas que estuvieron las otras plántulas ante el choque por temperatura alta en la oscuridad (Anexo 2).

Se estudió el contenido del MDA en las plántulas de los distintos genotipos al final del período de “recuperación”, fase en que también puede generarse estrés oxidativo pronunciado (Larkindale y Knight, 2002).

La figura 7 muestra que el choque por temperatura alta aumentó significativamente el contenido de MDA en las plántulas de todos los genotipos en magnitudes diferentes, evaluadas al final del período de “recuperación”.

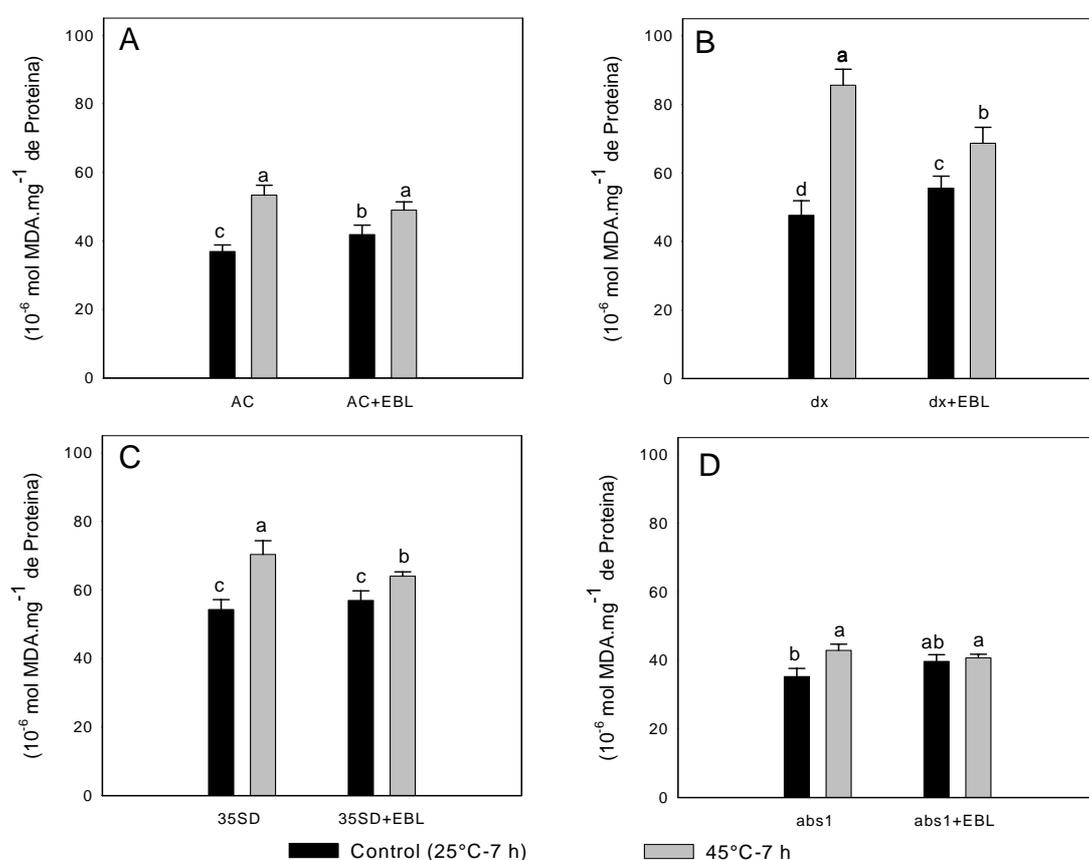


Figura 7. Contenido de malondialdehído de plántulas de tomate de los genotipos Ailsa Craig (AC), mutante deficiente (d^x), línea transgénica (35SD) y mutante semi-insensible ($abs1$) evaluadas al final del período de “recuperación” en la luz del tratamiento de 45°C durante siete horas. Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

Así, el incremento del MDA respecto al tratamiento de 25°C resultó en un 44,6% en las plántulas AC (Figura 7A), en las del mutante d^x fue de un 75% (Figura 7B), en las plántulas 35SD y $abs1$ fue de 30% y 21%, respectivamente (Figura 7C y 7D).

Las plántulas de los distintos genotipos mostraron signos de daño foliar transcurrida la semana de “recuperación”, según se mostró en la figura 4. Este efecto fue significativo, aún cuando la intensidad luminosa en la que crecieron las plántulas ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) no puede considerarse alta para este cultivo en condiciones naturales.

Estas evidencias confirmaron que la aplicación de un choque por temperatura alta en combinación con la luz induce la oxidación, según han observado varios autores (Gong *et al.*, 1998a, b; Dat *et al.*, 1998).

Por tanto, otro aspecto nuevo demostrado es que el contenido de MDA varió apreciablemente entre las líneas isogénicas d^x , AC y 35SD; a pesar de que las plántulas de estos genotipos mostraron un nivel de termotolerancia similar. Se sugiere que la alteración del gen *d* y los consecuentes cambios en el contenido de la CS influyeron más en el nivel de daño oxidativo inducido por la temperatura alta. En cambio, el mutante *abs1* resultó el más termotolerante y el menos dañado desde el punto de vista oxidativo, lo cual puede deberse a sus características genéticas específicas.

Al analizar el comportamiento del incremento del nivel de MDA de las plántulas, evaluadas inmediatamente después del choque por temperatura alta (Figura 6) respecto a las evaluadas al final de la “recuperación” (Figura 7), se demostró que el contenido de MDA incrementó en las plántulas de todos los genotipos sometidas al choque por la temperatura alta durante el período de “recuperación”. Este aumento fue muy marcado (95%) en las del mutante d^x (Figuras 6B y 7B) y menor (24%) en las del genotipo *abs1* (Figuras 6D y 7D).

Los resultados demostraron que las plántulas d^x lograron sobrevivir con el nivel de daño oxidativo más elevado.

En cuanto a la respuesta a la EBL, se observó que, en presencia de choque por temperatura alta, el contenido de MDA de las plántulas del genotipo AC tratadas con este compuesto fue similar al de las plántulas crecidas sin este BR (Figura 7A).

Sin embargo, este contenido de MDA fue significativamente menor en las plántulas del mutante d^x y la línea transgénica 35SD tratadas con la EBL y expuestas a la temperatura alta respecto a las no tratadas con el BR (Figura 7B, 7C). El contenido de MDA de las plántulas del mutante *abs1* sometidas al choque por temperatura alta no se alteró por la presencia de la EBL en el medio de cultivo (Figura 7D).

En este trabajo se demostró que la EBL no propició la protección de las membranas de las plántulas AC y *abs1* ante el daño oxidativo mediado por la temperatura alta, sin embargo, este compuesto ejerció un efecto protector en las plántulas de los genotipos *d^x* y 35SD, siendo marcado en las primeras. Por su parte, Zhu *et al.* (1996) sugieren una protección inducida por la EBL contra el estrés oxidativo en plántulas de pepino sometidas a tratamiento por temperatura alta. Los resultados indican que no puede generalizarse el efecto antioxidante de la EBL.

Teniendo en cuenta que las plántulas no mostraron el mismo nivel de daño foliar dentro de un mismo tratamiento, el efecto de la EBL en el contenido de MDA pudo variar entre tejidos de una misma plántula. Se sugiere en futuros estudios seleccionar plántulas de acuerdo a su nivel de daño foliar para evaluar la peroxidación lipídica de las plántulas de los distintos genotipos. Debe señalarse que, en condiciones de temperatura ambiente, las plántulas del mutante *d^x* y las de la línea transgénica 35SD mantuvieron su contenido básico de MDA superior al de las plántulas del genotipo AC (Figuras 6A, 6B, 6C y 7A, 7B, 7C). Por su parte, las plántulas del mutante *abs1* tuvieron un nivel basal de MDA similar al del genotipo AC en el medio MS (Figuras 6D y 7D). Sin embargo, al crecerse las plantas durante 45 días en el invernadero, el nivel basal de MDA de las plantas *abs1* fue superior al de las AC y 35SD (Tabla 3). Se sugiere que este indicador puede depender, en parte, de las condiciones de crecimiento y del estadio de desarrollo de la planta.

La EBL contribuyó al incremento del contenido de MDA de las plántulas del genotipo AC crecidas a temperatura ambiente (Figura 7A), hallazgo que fue consistente con lo descrito anteriormente (Figura 6A) y que coincide con lo informado en la bibliografía consultada (Zhao *et al.*, 1990; He *et al.*, 1996). Este compuesto también propició el aumento del contenido de MDA de las plántulas del genotipo *d^x* crecidas a 25°C (Figura 7B), pero no incrementó el de las plántulas 35SD y *abs1* a temperatura ambiente (Figura 7C, 7D).

Es importante señalar que en cuanto al efecto de la EBL en el contenido de MDA del mutante *abs1* se encontró un comportamiento diferente respecto al resto de los genotipos. La EBL tuvo efecto en este indicador en las plántulas del mutante *abs1* evaluadas inmediatamente después del tratamiento por temperatura alta (Figura 6D); sin embargo, durante la "recuperación", el compuesto limitó el incremento del MDA (comparación entre la Figura 6D

y 7D). Así, el incremento del contenido de MDA de las plántulas *abs1* crecidas sin y con el compuesto y sometidas a la temperatura alta fue del 24% y 5% durante la “recuperación”, respectivamente, sugiriéndose que la EBL protegió a las plántulas del genotipo *abs1* durante este período.

Puede concluirse parcialmente que, al aumentar el contenido de la CS, el daño oxidativo inducido por la temperatura alta se redujo. Así, las plántulas con ausencia de la CS se dañaron más y las que presentan el contenido más elevado ($1,856 \times 10^{-6}$ g.kg⁻¹ de MFA) se afectaron menos.

Por su parte, el daño oxidativo de las plántulas sometidas al choque por temperatura alta respondió mejor a la EBL en ausencia de la hormona ó cuando el contenido de la CS fue elevado.

Puede observarse en la figura 8A que, la actividad de la enzima POX disminuyó en un 15 y 8% en respuesta al choque por temperatura alta en las plántulas del genotipo Ailsa Craig crecidas en ausencia y presencia de la EBL en el medio de cultivo, respectivamente; aunque en el primer caso, ese decrecimiento no fue estadísticamente significativo. La EBL contribuyó al incremento en un 48% de la actividad de la enzima POX de las plántulas, inmediatamente después del choque por temperatura alta.

Debe destacarse que este compuesto incrementó la actividad de la enzima POX a temperatura ambiente, lo cual coincidió con las evidencias obtenidas por las investigaciones de otros autores (Zhao *et al.*, 1990; He *et al.*, 1996).

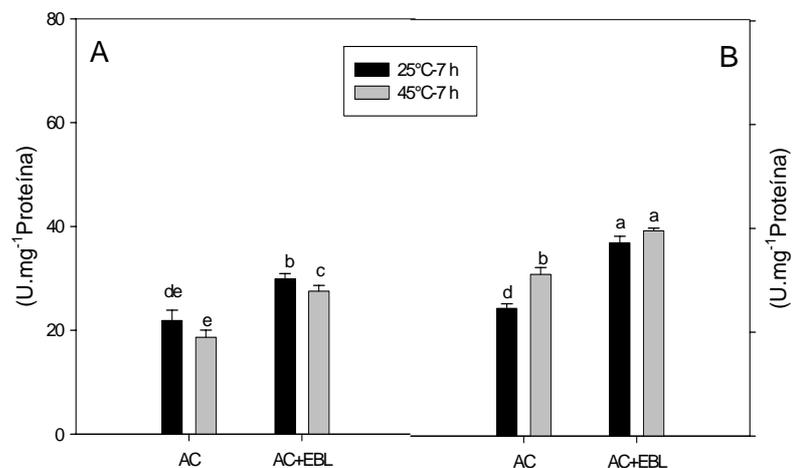


Figura 8. Actividad específica de la enzima peroxidasa de plántulas de tomate del genotipo Ailsa Craig (AC) inmediatamente después del tratamiento de 45°C durante siete horas en la oscuridad (A) y siete días después de la “recuperación” en la luz (B). Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

La disminución de la actividad de la enzima POX coincidió con la inhibición de la actividad de la enzima por temperaturas elevadas informada en los estudios de Rivero *et al.* (2001, 2003 y 2004).

Al cabo de una semana de “recuperación”, el choque por temperatura alta incrementó significativamente en 26,7% la actividad de la enzima POX de las plántulas crecidas en ausencia de la EBL (Figura 8B). Sin embargo, la actividad de la enzima POX no se alteró en respuesta al choque por temperatura alta en el tratamiento con la EBL. Este compuesto incrementó apreciablemente la actividad de la enzima POX de las plántulas mantenidas a temperatura ambiente y de las sujetas a la temperatura alta (Figura 8B).

La inducción de estrés oxidativo por efecto de la temperatura alta puede deberse, entre otros, al estado del sistema de defensa antioxidante enzimático (Foyer *et al.*, 1997). Para demostrar si la EBL afecta la actividad de otras enzimas antioxidantes, se estudió la actividad de algunas enzimas secuestradoras de ROS en plántulas del genotipo Ailsa Craig. Se demostró que la actividad de la enzima SOD de las plántulas tratadas ó no con la EBL incrementó significativamente, inmediatamente después de la exposición a la temperatura alta (Figura 9A). Sin embargo, después de los siete días en “recuperación”, la actividad de esta enzima

alcanzó un nivel similar en las plántulas del tratamiento control y del sometido a la temperatura alta, tratadas o no con la EBL (Figura 9B).

Los resultados indican que la aplicación de la EBL no incrementó la actividad de la enzima SOD de las plántulas del genotipo Ailsa Craig sometidas a las condiciones de choque por temperatura alta ó crecidas a la temperatura ambiente. Sin embargo, la actividad enzimática SOD incrementó en las plántulas que se mantuvieron a la temperatura ambiente durante los siete días de “recuperación” (Figura 9A y 9B), comportamiento que puede deberse, entre otras causas, al efecto del crecimiento en las condiciones normales durante ese período de tiempo. La actividad enzimática SOD no varió en las plántulas sometidas a choque por temperatura alta durante la “recuperación” (Figura 9A y 9B).

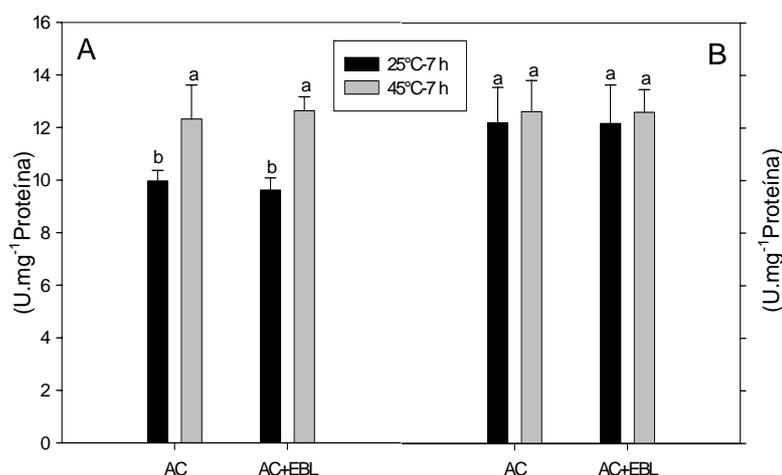


Figura 9. Actividad específica de la enzima superóxido dismutasa de plántulas de tomate del genotipo Ailsa Craig (AC) evaluadas inmediatamente después del tratamiento de 45°C durante siete horas en la oscuridad (A) y siete días después de la imposición del tratamiento (B). Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

En general, los valores absolutos de esta actividad enzimática específica estuvieron en el rango de los encontrados, para plantas de tomate, por Rivero *et al.* (2004) y Camejo *et al.* (2006). La actividad SOD aumenta en respuesta a un tratamiento por temperatura alta en el trabajo de Rivero *et al.* (2004), comportamiento que también se encontró en el presente estudio. Sin embargo, Camejo *et al.* (2006) encuentran una disminución de la actividad SOD ante un choque por temperatura alta. Las variaciones pueden atribuirse a las condiciones

distintas del ensayo enzimático, a las diferencias en las condiciones del crecimiento, así como a los distintos genotipos utilizados en ambos estudios.

Por otro lado, en la figura 10A se muestra que la actividad de la enzima APX resultó extremadamente susceptible al tratamiento por temperatura alta, con reducciones del 94-95% respecto al control, tanto en las plántulas tratadas o no con la EBL.

De igual manera, la actividad de la enzima APX se mantuvo reducida, por debajo del nivel observado después del tratamiento por temperatura alta (Figura 10A), transcurrida la semana de “recuperación” (Figura 10B).

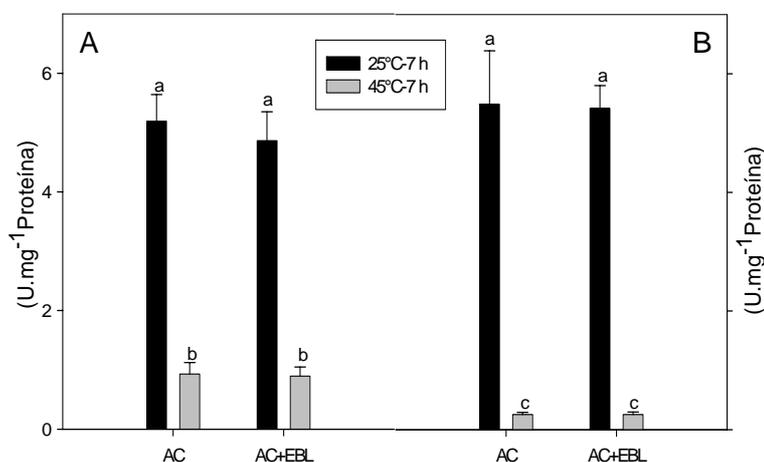


Figura 10. Actividad específica de la enzima ascorbato peroxidasa de plántulas de tomate del genotipo Alisa Craig (AC) inmediatamente después del tratamiento de 45°C durante siete horas en la oscuridad (A) y siete días después de imposición del tratamiento (B). Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

Por su parte, el tratamiento con la EBL no influyó en la actividad de la enzima de las plántulas sujetas a las condiciones de choque por temperatura alta ó a temperatura ambiente en ninguno de los momentos evaluados (Figura 10A y 10B).

En general, a diferencia de la enzima SOD, los valores de actividad enzimática APX resultaron intermedios entre los encontrados por Rivero *et al.* (2004) y Camejo *et al.* (2006). Sin embargo, los comportamientos ante la temperatura alta varían ya que en el primer estudio, el aumento de la temperatura disminuyó la actividad de la enzima APX, lo cual se

correspondió con los resultados obtenidos en la presente tesis; mientras que en el segundo, el choque por temperatura alta aumentó la actividad enzimática.

Por su parte, la actividad de la enzima CAT tanto de las plántulas tratadas como de las no tratadas con la EBL se redujo significativamente en un 51-53% en respuesta al tratamiento por temperatura alta, en la evaluación realizada inmediatamente después de la imposición del choque (Figura 11A). La figura 11B muestra que esta reducción se hizo aún mayor (75-76% respecto al tratamiento de 25°C) en las plántulas evaluadas una semana después de aplicarse el choque por temperatura alta.

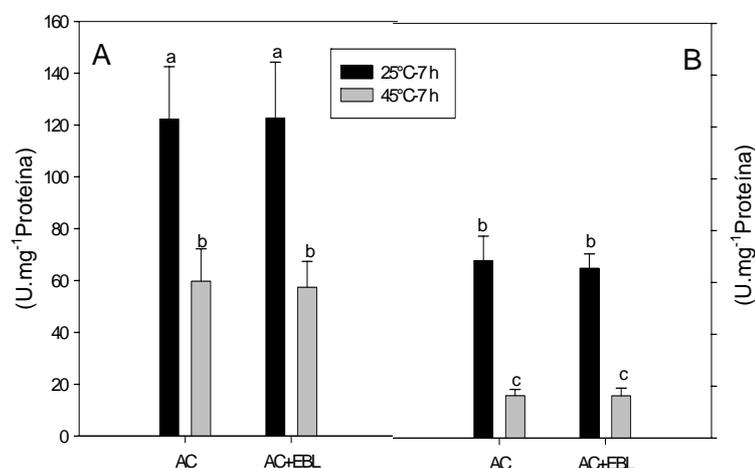


Figura 11. Actividad específica de la enzima catalasa de plántulas de tomate del genotipo Ailsa Craig (AC) inmediatamente después del tratamiento de 45°C durante siete horas en la oscuridad (A) y siete días después de imposición del tratamiento (B). Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

También, se observó que la actividad de la enzima CAT de las plántulas mantenidas a temperatura ambiente disminuyó durante los siete días de crecimiento en un fotoperíodo de 16 horas de luz.

Los valores absolutos de actividad CAT estuvieron en el rango de los encontrados por Rivero *et al.* (2004) y Camejo *et al.* (2006). El efecto de la temperatura alta en la disminución de esta actividad se correspondió con el decrecimiento encontrado por Rivero *et al.* (2004). Sin embargo, en los estudios de Camejo *et al.* (2006), el choque por temperatura alta no tuvo efecto ó este aumentó la actividad de la enzima CAT.

En general, debe decirse que los comportamientos de la actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas coincide con los hallazgos de otros autores (Sato *et al.*, 2001; Rizhsky *et al.*, 2002; Vacca *et al.*, 2004; Rivero *et al.*, 2004).

Con relación al efecto de la aplicación de la EBL, Zhu *et al.* (1996) en pepino encuentran que este compuesto a la concentración de $2,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ protege la actividad de estas enzimas antioxidantes ante un tratamiento por temperatura alta, resultado contrario al obtenido en este trabajo. En el estudio de Zhu *et al.* (1996), la EBL disminuyó el nivel de inducción de la peroxidación lipídica ante el choque por temperatura alta; mientras que en el presente estudio, el efecto fue distinto ya que este compuesto no redujo el incremento de la peroxidación lipídica de las plántulas, pero indujo su termotolerancia. Esta diferencia puede deberse a que el efecto antioxidante de la EBL varía de acuerdo a la concentración, la especie y la intensidad del daño por temperatura alta.

Como se ha visto, de todas las enzimas estudiadas en el genotipo AC, la actividad enzimática POX fue la única que se incrementó ante aplicaciones exógenas de la EBL. Se ha encontrado una expresión pronunciada de genes que codifican para la enzima peroxidasa en plántulas de la *Arabidopsis* tratadas con la brasinólida (Goda *et al.*, 2002; Mussig *et al.*, 2002).

Estas evidencias sugieren que la actividad de la enzima POX pudiera ser clave en las respuestas inducidas por los BRs. Por tanto, se estudió el efecto de la aplicación de la EBL en la actividad de la enzima POX en plántulas de los diferentes genotipos sometidas al choque térmico.

Se observa en la figura 12(A, B) que, en ausencia de la EBL, el choque por temperatura alta disminuyó significativamente en un 23 y 16% la actividad de la enzima POX de plántulas del mutante *d^x* y la línea 35SD, respectivamente. El tratamiento por temperatura alta fue inefectivo en la actividad de la enzima POX de las plántulas del mutante *abs1* (Figura 12C).

En cuanto al efecto de la EBL se observa que este BR fue capaz de incrementar la actividad enzimática POX de las plántulas del genotipo *d^x* y 35SD sometidas a choque por temperatura alta ó crecidas a temperatura ambiente. Este efecto de la EBL fue más pronunciado en las plántulas del mutante deficiente (Figura 12A, 12B).

Se demostró que el tratamiento de las plántulas del mutante *abs1* con la EBL incrementó la actividad de la enzima POX ante el choque por temperatura alta y en condiciones de la temperatura ambiente (Figura 12C).

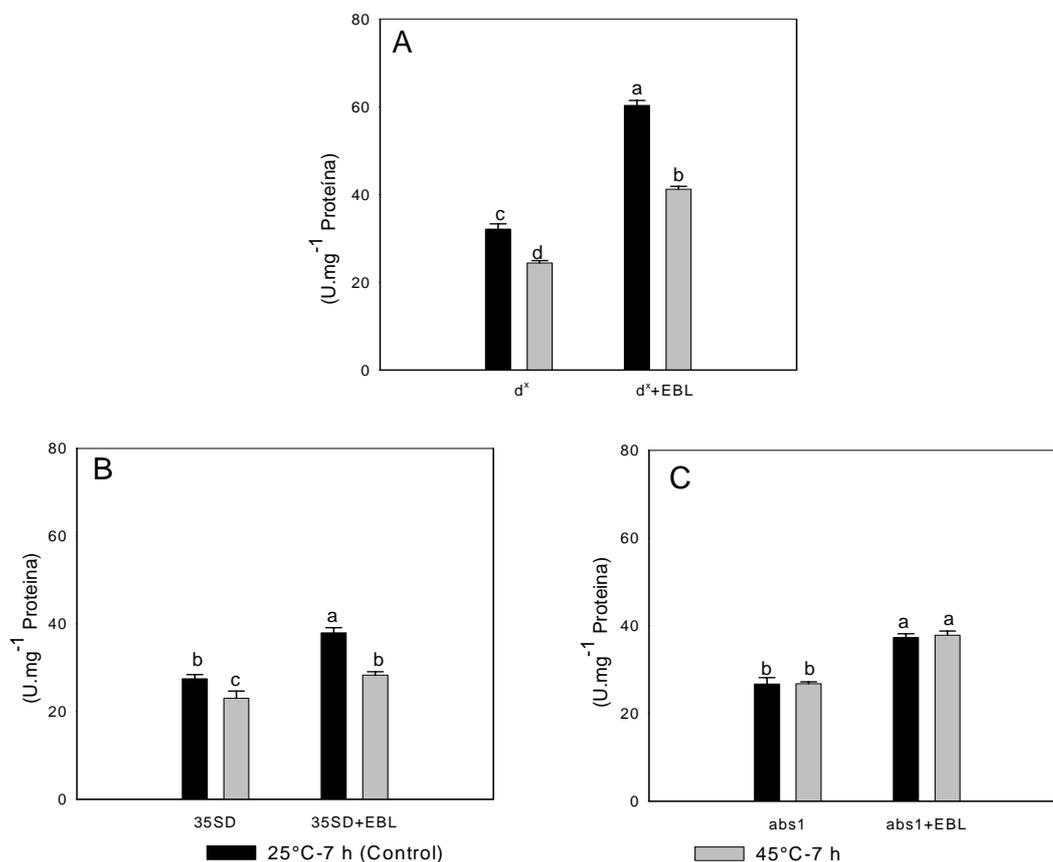


Figura 12. Actividad específica de la enzima peroxidasa de plántulas de tomate del mutante deficiente, *d^x* (A), la línea transgénica 35SD (B) y el mutante semi-insensible *abs1* (C), inmediatamente después del tratamiento de 45°C durante siete horas en la oscuridad. Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

Vale la pena señalar que las plántulas del mutante *d^x* tuvieron un nivel basal de actividad enzimática POX superior a las del genotipo AC (Figura 11A, Tabla 3). Este resultado concuerda con lo reportado por Evans y Alldridge (1964), quienes informan que las plantas adultas del mutante *d^x* tienen más actividad de la enzima POX que las del genotipo Ailsa Craig. Por su parte, el nivel basal de actividad de la POX de las plántulas de la línea 35SD y el mutante *abs1* fue ligeramente superior al de las del genotipo AC (Figura 11A). Esto coincidió con la observación de la actividad POX de las plantas de estos genotipos (Tabla 3).

Se estudió la actividad de la enzima POX de las plántulas de los distintos genotipos, al final de la fase de “recuperación” post choque por temperatura alta. Puede observarse en la figura 13 (A, B) que las plántulas del mutante d^x y la línea transgénica 35SD incrementaron significativamente respecto al control a 25°C la actividad de la enzima POX, evaluada una semana después de ser sometidas al tratamiento por temperatura alta.

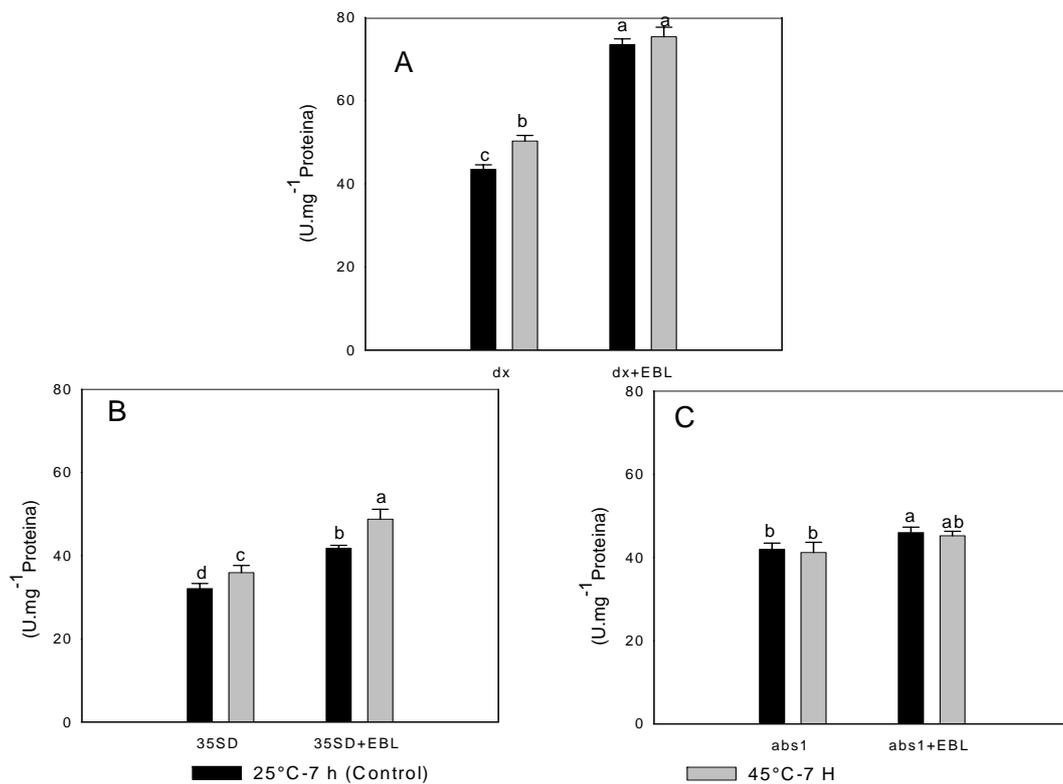


Figura 13. Actividad específica de la enzima peroxidasa de plántulas de tomate del mutante deficiente d^x (A), la línea transgénica 35SD (B) y el mutante semi-insensible $abs1$ (C), después de una semana de “recuperación” del tratamiento de 45°C durante siete horas. Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

El incremento de la actividad de la enzima POX en las plántulas sometidas al tratamiento por temperatura alta fue de un 15% y 12% en los genotipos d^x y 35SD, respectivamente, y de un 26,7% en las plántulas del genotipo Ailsa Craig (Figura 8B).

La actividad enzimática POX de las plántulas del genotipo $abs1$ no se incrementó respecto al control en ninguno de los dos momentos evaluados (Figuras 12C y 13C). En cuanto al efecto

de la EBL puede observarse que, el compuesto incrementó la actividad de la enzima POX de las plántulas del mutante d^x sometidas al choque por temperatura alta al final de la “recuperación” (Figura 13A) e incrementó un 106% durante este período (comparación entre figura 13A y 12A). Debe resaltarse que este incremento de la actividad de la enzima POX en respuesta a la EBL fue más pronunciado en las plántulas de este mutante, sujetas al tratamiento por temperatura alta, que en las del genotipo AC (Figura 11B). Este fenómeno se observó también en la actividad de la enzima POX de las plántulas de 15 días de edad ante el tratamiento con este BR (Figuras 11A y 12A).

También se observó que la EBL incrementó significativamente la actividad de la enzima POX en las plántulas del genotipo 35SD sometidas al choque por temperatura alta y evaluadas al final de la “recuperación”(Figura 13B); sin embargo, no lo hizo en la actividad enzimática POX de las plántulas del genotipo *abs1* (Figura 13C). No obstante, este compuesto aumentó la actividad POX de las plántulas *abs1*, evaluadas inmediatamente después del choque por temperatura alta (Figura 12C). Se demostró que la actividad de la enzima POX incrementó menos respecto al resto de los genotipos en las plántulas del mutante *abs1* tratadas con la EBL durante la “recuperación”, con valores que oscilaron entre 38-45 U.mg⁻¹ de proteína (Figuras 12 C y 13C).

Debe señalarse que la EBL incrementó la actividad POX de las plántulas de todos los genotipos mantenidas a 25°C (Figuras 11B y 13), siendo este incremento más marcado en las del genotipo d^x (Figura 13A).

Los niveles basales de la actividad de la enzima POX de los genotipos con alteración del contenido y el reconocimiento de CS continuaron siendo superiores a los de las plántulas del genotipo Ailsa Craig.

Puede concluirse, parcialmente, que la respuesta más pronunciada de la actividad POX se encontró cuando el tejido presenta deficiencia de CS; mientras que esta actividad no respondió al choque por temperatura alta en plántulas con un nivel endógeno de $1,856 \times 10^{-6}$ g.kg⁻¹ MFA.

Por su parte, al aplicarse la EBL, la actividad de la enzima POX incrementó de manera pronunciada cuando las plántulas poseen deficiencia de CS endógena. Sin embargo, se observó un cambio en la respuesta de la actividad POX ante el contenido más elevado de hormona. En este caso, la EBL inicialmente incrementó la actividad POX de las plántulas

abs1 la cual fue disminuyendo durante la "recuperación" hasta igualarse al final de este período.

4.4 Influencia de dos análogos espirostánicos de la castasterona y de la 24-epibrasinólida en la sobrevivencia y el metabolismo oxidativo de plántulas de tomate var. Amalia sometidas a un choque por temperatura alta.

Al analizar el comportamiento del porcentaje de sobrevivencia de las plántulas del genotipo Amalia, crecidas en el medio MS, ante diferentes tratamientos por temperatura alta, se puede observar (Figura 14) que a las dos horas, ya se detectaron plántulas muertas y a partir de ahí disminuyó marcadamente la sobrevivencia, obteniéndose un 46%, 11% y 3% de plántulas vivas a las 3, 4 y 5 horas de exposición a la temperatura de 45°C, respectivamente.

Al comparar la sobrevivencia de las plántulas del genotipo Amalia y las de Ailsa Craig que se crecieron en el medio MS se observa que mientras en el primer genotipo murieron prácticamente todas las plántulas al cabo de las cinco horas de choque por temperatura alta (Figura 14), las del genotipo Ailsa Craig necesitaron ocho horas (Tabla 4). Se demostró también que la acumulación de la masa seca y el alargamiento del hipocotilo fue más sensible al tratamiento térmico en las plántulas del genotipo Amalia (Tabla 10) que en AC (Tabla 6 y 8).

Esto indica la diferente sensibilidad de estos genotipos al tratamiento por temperatura alta, en las condiciones específicas del presente trabajo. Se sugiere que la termotolerancia del cultivar Ailsa Craig puede estar más cercana a la del genotipo termotolerante Nagcarlang. Es conocido que el cultivar Amalia posee un nivel de tolerancia intermedio entre el genotipo Nagcarlang y el genotipo susceptible Campbell-28 (Florido *et al.*, 1999).

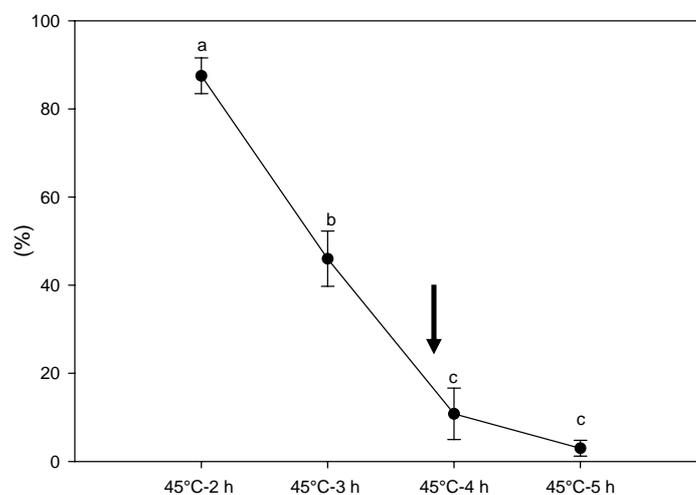


Figura 14. Influencia de diferentes períodos de exposición a la temperatura de 45°C en el porcentaje de sobrevivencia de plántulas de tomate variedad Amalia. Las barras representan el error estándar de las medias y las letras diferentes indican las diferencias significativas entre tratamientos, según análisis de comparación de proporciones ($\alpha < 0.05$).

Aunque con el choque por temperatura alta de 45°C durante 4 horas se obtuvo una sobrevivencia inferior a la observada por Dhaubhadel *et al.* (1999), la aplicación de la EBL a la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ propició un incremento pronunciado de la sobrevivencia de las plántulas de tomate var. Amalia (Figura 15), inclusive un aumento superior al encontrado por Dhaubhadel *et al.* (1999) y al observado en las plántulas del genotipo Ailsa Craig crecidas en el medio MS (Tabla 5). Es conocido que el efecto de la EBL varía con la magnitud y el tipo de estrés así como con la susceptibilidad del genotipo (Núñez *et al.*, 2003). Con estos resultados se comprobó que el tratamiento de las plántulas con la EBL fue más efectivo en el incremento de la sobrevivencia del genotipo Amalia, que tuvo más sensibilidad que el Ailsa Craig al choque por temperatura alta.

Se encontró que el 85% y el 49% de las plántulas tratadas con la EBL a las concentraciones de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ y $1,0 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹, respectivamente sobrevivieron el choque por temperatura alta. Esto demostró que la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ resultó la más efectiva.

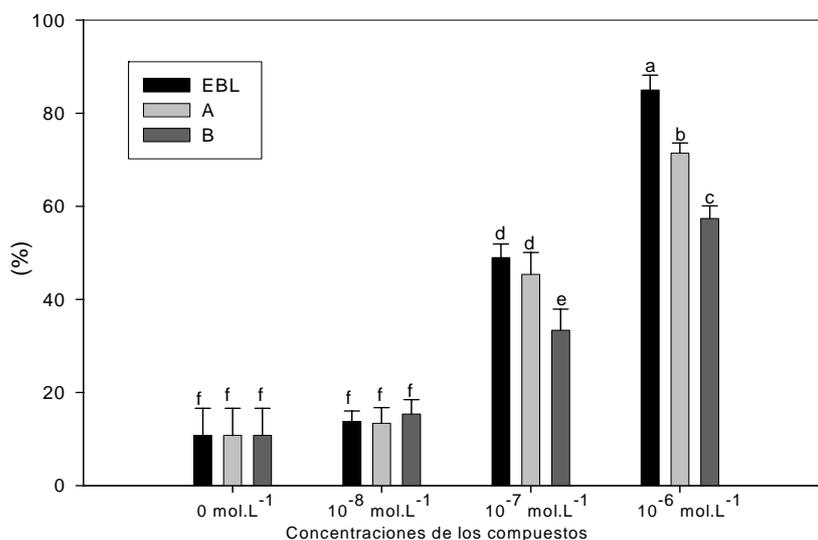


Figura 15. Influencia de diferentes concentraciones de la 24-epibrasinólida y los análogos A y B en la sobrevivencia de plántulas de tomate (variedad Amalia) sometidas al choque de 45°C durante cuatro horas. Las barras representan los errores estándar de las medias y las letras las diferencias significativas entre tratamientos, según análisis de comparación de proporciones ($p < 0.05$).

Los resultados de la acumulación de la masa seca y de la longitud del hipocotilo confirmaron que la EBL fue capaz de inducir la termotolerancia (Tabla 10). El incremento de la termotolerancia fue mayor en las plántulas del genotipo Amalia que en Ailsa Craig (Tabla 6 y 8).

Al evaluar el efecto de los análogos espiroestánicos se pudo comprobar que, estos compuestos también incrementaron la sobrevivencia de las plántulas en función de la concentración (Figura 15). Se debe notar que el tratamiento de las plántulas con $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de los análogos A y B incrementó el porcentaje de sobrevivencia hasta 72% y 58%, respectivamente; valores significativamente menores que el encontrado en las plántulas del tratamiento con la EBL (85%). A la concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹, el porcentaje de sobrevivencia fue significativamente menor en las plántulas tratadas con el análogo B y similares en las plántulas tratadas con el análogo A y la EBL. No hubo respuesta a la concentración de $1,0 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹ de ninguno de los compuestos.

Tabla 10. Acumulación de masa seca y longitud de hipocotilo de plántulas del genotipo Amalia crecidas en medio MS tratadas con y sin $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de la EBL y el choque térmico de 45°C durante cuatro horas.

Tratamientos/Indicador	Masa seca	Longitud de hipocotilo
Control 25°C	3,20±0,02	4,97±0,20
Control 45°C	0,96±0,01 (70%)	1,37±0,24 (72%)
EBL (10^{-6} mol.L ⁻¹) 25°C	3,53±0,02	6,12±0,25
EBL (10^{-6} mol.L ⁻¹) 45°C	3,07±0,04 (13%)	4,26±0,37 (30%)
A (10^{-6} mol.L ⁻¹) 25°C	3,27±0,05	5,05±0,47
A (10^{-6} mol.L ⁻¹) 45°C	1,66±0,07 (49%)	1,44±0,54 (71%)
B (10^{-6} mol.L ⁻¹) 25°C	3,15±0,03	4,52±0,29
B (10^{-6} mol.L ⁻¹) 45°C	1,27±0,02 (60%)	1,32±0,25 (71%)

Se representan las medias de la acumulación de masa seca (10^{-3} g) y la longitud del hipocotilo (cm) ± error estándar. Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes de reducción del indicador en condiciones del tratamiento por temperatura alta respecto a su correspondiente tratamiento a 25°C.

A la concentración más efectiva de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, la aplicación de los análogos A y B evitaron parcialmente la disminución de la acumulación de la masa seca inducida por el tratamiento térmico (Tabla 10), lo cual confirmó que estos compuestos indujeron la termotolerancia; aunque relativamente menor que la inducción lograda con la EBL. Cuando se evaluó el crecimiento del hipocotilo no se encontró una respuesta positiva de los análogos ante el tratamiento por la temperatura alta (Tabla 10).

En conjunto, los resultados también indican que el análogo A fue más efectivo que el B en el incremento de la termotolerancia de las plántulas de este genotipo (Figura 15 y Tabla 10).

Con la concentración más efectiva ($1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹) se estudió la peroxidación lipídica, la actividad de la enzima POX inmediatamente después del choque por temperatura alta y al final de la “recuperación”.

Como puede apreciarse en la figura 16, el contenido de MDA de las plántulas del tratamiento control se incrementó significativamente (16,3%) durante las cuatro horas de choque por temperatura alta en la oscuridad. Este incremento fue similar al aumento en el contenido que se encontró en las plántulas del genotipo Ailsa Craig (16,9%) como se observa en la figura 6A; a pesar de que las plántulas de ambos genotipos se sometieron a diferentes duraciones de choque por temperatura alta.

El tratamiento por temperatura alta incrementó el contenido del MDA de las plántulas tratadas con la EBL, alcanzando un valor que no difirió significativamente del de las plántulas sin tratar con este compuesto. Esto indica que la EBL no tuvo efecto en el daño oxidativo de las plántulas del genotipo Amalia (Figura 16).

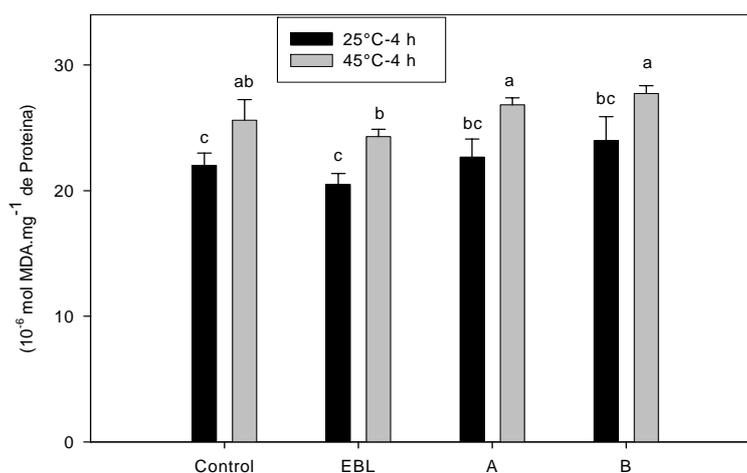


Figura 16. Contenido de malondialdehído de plántulas de tomate Amalia, tratadas con la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ M de 24-epibrasinólida y los análogos espiroestánicos, A y B, inmediatamente después del choque por 45°C durante cuatro horas. Se representan las medias de los tratamientos y las letras diferentes corresponden a las diferencias significativas entre tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

En esta misma figura puede observarse que, en condiciones de choque por temperatura alta, los valores del contenido de MDA de las plántulas tratadas con A y B fueron similares al de las plántulas sin tratar y significativamente superiores al encontrado en las tratadas con la EBL. Ninguno de los tres compuestos afectó el contenido de MDA de las plántulas a temperatura ambiente.

Al analizar el comportamiento de este indicador en las plántulas evaluadas al final de la fase de “recuperación” (Figura 17) se observó un incremento del contenido de MDA de las plántulas tratadas y sin tratar con los compuestos.

Los valores alcanzados del contenido de MDA de las plántulas tratadas con la EBL y los análogos A y B fueron significativamente menores que el mostrado por las plántulas del

tratamiento control. Se destacan las plántulas tratadas con la EBL por presentar el menor valor del contenido de MDA respecto al resto de los tratamientos.

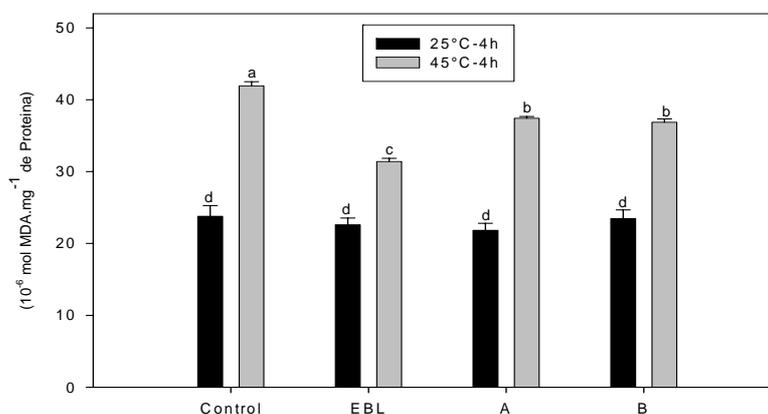


Figura 17. Contenido de malondialdehído de las plántulas de tomate Amalia, tratadas con la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de la 24-epibrasinólida y los análogos espirostánicos, A y B, evaluadas después de una semana de “recuperación” del tratamiento de 45°C durante cuatro horas. Las barras indican los errores estándar y las letras diferentes corresponden a las diferencias significativas entre los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

Sin embargo, este efecto de la EBL fue diferente al encontrado en las plántulas del genotipo Ailsa Craig, lo cual pudo deberse, entre otras causas, a que las plántulas tuvieron sensibilidades diferentes a la temperatura alta.

Al comparar las figuras 16 y 17 se observa que el incremento del contenido de MDA de las plántulas tratadas con los tres compuestos y sometidas al choque por temperatura alta aumentó durante la “recuperación”. Estos incrementos del contenido de MDA fueron inferiores al de las plántulas del tratamiento control. Se sugiere que la aplicación de estos compuestos puede contribuir a la protección de las plántulas contra el daño oxidativo inducido por la temperatura alta, respuesta no encontrada en las plántulas del genotipo Ailsa Craig tratadas con la EBL.

En relación a la actividad de la enzima POX, evaluada inmediatamente después del choque por temperatura alta, puede apreciarse en la figura 18 que la misma se incrementó poco en las plántulas del tratamiento control.

Este comportamiento difirió de lo observado en las plántulas del genotipo Ailsa Craig, donde la actividad de la enzima POX disminuyó en un 15% por exposición al choque por temperatura alta (Figura 8A). Como se sugirió anteriormente, la diferencia en la respuesta a la

EBL de ambos genotipos puede deberse, entre otros factores, a que las plántulas poseen una sensibilidad diferente al choque por temperatura alta.

De hecho, varios autores han detectado incrementos (Ali *et al.*, 2005) y otras veces disminuciones de la actividad peroxidasa (Rivero *et al.*, 2001; 2003) ante una elevación de la temperatura.

Por otra parte, en la figura 18 se observa que las plántulas de los tratamientos con la EBL y los dos análogos de la CS aumentaron significativamente la actividad de la enzima POX frente al choque por temperatura alta, detectándose incrementos en relación a las mantenidas a 25°C de 12,45%, 16,7% y 15% en las plántulas tratadas con la EBL, y los análogos A y B, respectivamente.

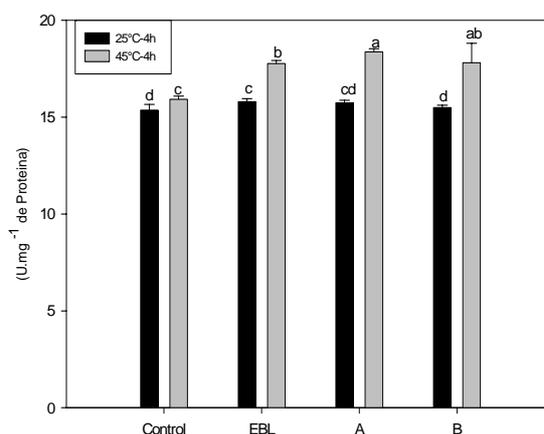


Figura 18. Actividad específica de la enzima peroxidasa de plántulas de tomate Amalia, tratadas con la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de la 24-epibrasinólida y los análogos espirostánicos, A y B, inmediatamente después del choque de 45°C durante cuatro horas. Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes corresponden a las diferencias significativas entre los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

La figura 19 muestra el comportamiento de la actividad de la enzima POX de las plántulas evaluadas al final del período de “recuperación” post choque por temperatura alta. En este caso, el tratamiento por temperatura alta incrementó significativamente (19,4%) la actividad enzimática POX de las plántulas controles.

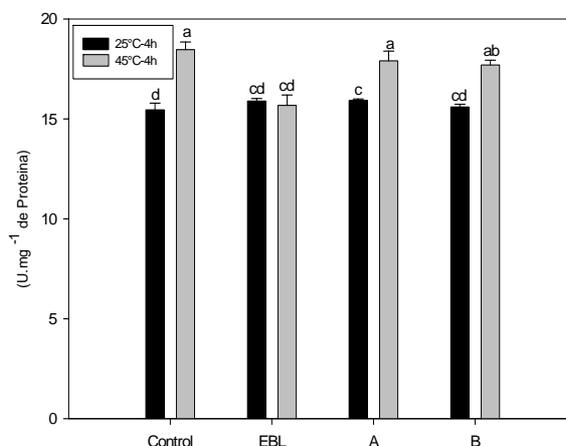


Figura 19. Actividad específica de la enzima peroxidasa de plántulas de tomate Amalia, tratadas con la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de la 24-epibrasinólida y los análogos espiroestánicos, A y B, después de una semana de “recuperación” en la luz del tratamiento de 45°C durante cuatro horas. Las barras indican los errores estándar de las medias y las letras diferentes corresponden a las diferencias significativas entre los tratamientos, según los intervalos de confianza ($\alpha < 0.05$).

Este hecho coincidió con el incremento de la actividad de esta enzima en las plántulas de la variedad Ailsa Craig sometidas a la temperatura alta y evaluadas al final del período de “recuperación” (Figura 14B). Por su parte, la EBL contribuyó a una disminución respecto al tratamiento control de la actividad de la enzima POX de las plántulas del genotipo Amalia evaluadas al final del período de “recuperación” post choque por temperatura alta.

Este efecto de la EBL en la actividad de la enzima POX fue diferente al observado en las plántulas del genotipo Ailsa Craig sometidas al choque por temperatura alta, donde este compuesto promovió un aumento de la actividad de esta enzima (Figura 14B). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, en las plántulas de la variedad Ailsa Craig, la EBL estimuló la actividad de la enzima POX a temperatura ambiente mientras que este compuesto no tuvo efecto en las del genotipo Amalia (Figura 19).

A diferencia de la respuesta de las plántulas tratadas con la EBL, la figura 19 muestra que los tratamientos con los análogos A y B no tuvieron efecto en la actividad de la enzima POX de las plántulas sometidas al choque por temperatura alta respecto al tratamiento control.

Si se compara el comportamiento de la actividad de la enzima POX de las plántulas evaluadas inmediatamente después del choque por temperatura alta (Figura 18) y al final del período de

“recuperación” (Figura 19) se evidencia que la actividad de la enzima incrementó en las plántulas del tratamiento control durante la “recuperación”; mientras que hubo una disminución de la actividad en las plántulas tratadas con la EBL. La actividad enzimática POX no cambió en las plántulas tratadas con los análogos y sometidas al tratamiento por temperatura alta durante el período de “recuperación”.

Sin embargo, este comportamiento de la actividad de la enzima POX de las plántulas del genotipo Amalia tratadas con la EBL y sometidas al choque por temperatura alta fue completamente diferente al que se observó en las del genotipo Ailsa Craig. En las plántulas de este último genotipo se constató, durante la “recuperación”, un aumento de la actividad de la enzima en respuesta a la aplicación de la EBL (Figura 9A, 9B).

Puede decirse que la imposición del tratamiento por temperatura alta de 45°C durante cuatro horas a las plántulas del genotipo Amalia resultó suficiente para evaluar el efecto protector de la EBL al aumentar la termotolerancia de dichas plántulas y demostrar que los análogos de castasterona fueron capaces de inducir la termotolerancia, pero en una menor proporción.

El comportamiento de los indicadores del metabolismo oxidativo (peroxidación lipídica y actividad de la enzima POX) ante la aplicación de los análogos A y B sugiere que ellos tuvieron efectos similares, sin embargo, el análogo A proporcionó un mayor incremento del porcentaje de la sobrevivencia y de la acumulación de la masa seca (Tabla 10; Figura 15). Se infiere que otros mecanismos, más que la reducción del daño oxidativo, podrían determinar la mayor capacidad del análogo A de incrementar la termotolerancia.

Se demostró que la termotolerancia inducida por la EBL se obtiene a concentraciones relativamente altas del compuesto ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), superiores a las empleadas generalmente para estimular los efectos clásicos de los BRs en la promoción del crecimiento del hipocotilo (alrededor de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ ó inclusive más bajas) (Clouse y Sasse, 1998).

5. DISCUSIÓN

La tesis presenta el primer trabajo de una caracterización de mutantes deficientes y acumuladores de los BRs relacionada con algunos aspectos fisiológicos y bioquímicos del crecimiento y la termotolerancia de plantas de tomate. Entre los distintos genotipos de tomate disponibles, con las alteraciones de la biosíntesis (*dpy*, *cb2*, *d^x*) ó del reconocimiento de la CS (*tbr*, *cu3*, *abs1*) (Bishop, 2003), los utilizados aquí (*d^x* y *abs1*) se seleccionaron ya que sus alteraciones genéticas se han identificado en el punto limitante de la biosíntesis de la CS (conversión de la desoxo-CS a la CS) y en un paso clave del reconocimiento de los BRs (actividad del dominio quinasa del receptor tBRI1), respectivamente (Bishop *et al.*, 1999; Montoya *et al.*, 2005).

Los defectos del alargamiento y la acumulación de la masa seca del tallo de las plantas de los mutantes *d^x* y *abs1* y su reversión en las del genotipo 35SD (Tabla 2) confirmaron que el enanismo de los primeros y el crecimiento acelerado de la línea transgénica se deben a estas alteraciones de la biosíntesis y al reconocimiento de la CS (Bishop *et al.*, 1999; Montoya *et al.*, 2005). Sin embargo, también es posible que las cantidades elevadas de CS en el mutante *abs1* pueda ser una de las causas de que las plantas de este mutante no resulten en un enanismo extremo (Montoya *et al.*, 2002).

La observación del alargamiento del tallo de las plantas crecidas en el suelo, la solución nutritiva ó el medio MS, el cual fue superior en presencia de los BRs activos, ya sea endógeno (AC, 35SD y *abs1*) ó exógeno (aplicación de la EBL) y drásticamente inferior al bloquearse la biosíntesis de la CS (*d^x*) (Tablas 2, 6, 7) indicó que los BRs controlan la elongación celular independientemente de las condiciones del crecimiento de las plantas. Los mutantes de la *Arabidopsis* y de otras especies deficientes de la biosíntesis y del reconocimiento de las hormonas esteroidales también mostraron enanismo en diferentes condiciones de crecimiento fundamentalmente por fallas en el alargamiento del tallo (Bishop, 2003).

Se sabe que el receptor BRI1 como la(s) ruta(s) de señal(es) a los BRs deben encontrarse en un estado inactivo ante una deficiencia y se activan por esta hormona (Li y Jin, 2007). Así el hecho de que el mutante *d^x* resultó muy sensible a la aplicación exógena de la EBL (Tablas 5-9) sugiere una activación pronunciada del receptor tBRI1 y de las señales a los BRs.

Sin embargo, dado que los mutantes deficientes e insensibles a las giberelinas (GAs) también poseen defectos en el crecimiento del tallo comunes a los de los BRs (Bouquin *et al.*, 2001) cabe preguntarse si el enanismo del mutante con déficit de la CS se debe, en parte, a una disminución del nivel y la sensibilidad a las giberelinas (GAs). Es posible especular una alteración de la biosíntesis y la sensibilidad a las GAs en el mutante d^x que contribuye, en parte, al enanismo. Esta hipótesis se sustenta en la evidencia de que mutantes de *Arabidopsis* deficientes e insensibles a los BRs tienen afectaciones de sus respuestas a GAs (Azpiroz *et al.*, 1998; Bouquin *et al.*, 2001).

Por otra parte, el efecto positivo de los BRs activos, ya sea endógeno (AC, 35SD y *abs1*) ó exógeno (aplicación de la EBL) en el alargamiento del tallo puede estar acompañado de incrementos del contenido de las GAs. Varios estudios demuestran que los BRs inducen la expresión de genes de la biosíntesis de las GAs (Bouquin *et al.*, 2001) y también incrementan la acumulación de GAs (Xu *et al.*, 1990). El alargamiento inducido por la EBL ó la CS en los diferentes genotipos también pudo deberse a un incremento de la sensibilidad del tejido a las GAs a través de la activación de la producción del segundo mensajero GMPc implicado en las cascadas de transducción de señales de las GAs y los BRs (Kwezi *et al.*, 2007).

El enanismo y la restricción del alargamiento celular en mutantes deficientes a los BRs se asocia a un bloqueo de la expresión génica específica y de las señales a estos compuestos (Li y Jin, 2007) que puede traducirse en las alteraciones del funcionamiento de varias de las enzimas modificadoras de la pared como las xiloglucano-endo-transglicoxilasas (XETs), las expansinas, las extensinas, entre otras.

En la presente tesis se encontró evidencia de la activación de la POX y la elevación del nivel del MDA en las plantas con la deficiencia de la CS, sugiriéndose mecanismos de inducción de la peroxidasa y de estrés oxidativo que se desencadenan por el enanismo de las plantas del mutante d^x . Esta oxidación puede generarse, entre otras razones, por un exceso de la producción de las ROS, principalmente en los cloroplastos, el organelo que más contribuye al estrés oxidativo de los tejidos vegetales (Foyer, 1997). Por tanto, se sugiere que el nivel superior de la peroxidación lipídica en las plantas de este mutante (Figuras 6 y 7) pudo generarse en los cloroplastos. Otros autores han planteado que la deficiencia de BRs en mutantes de *Arabidopsis* produce estrés en las plantas (Szekeres y Koncz, 1998) y este trabajo

por primera vez demuestra que la oxidación puede ser un tipo de estrés generado en los tejidos de tomate por la deficiencia de hormonas esteroidales.

La hipótesis del papel de los cloroplastos en la generación de estrés oxidativo se apoya en la demostración de que los mutantes de la *Arabidopsis* y el tomate deficientes de los BRs son verdes oscuros y contienen un nivel elevado de clorofila (Clouse y Sasse, 1998; Bishop, 2003). En este contexto, debido a la restricción del crecimiento, el enanismo y la probable reducción de la fijación del CO₂ y el transporte de los fotoasimilados en estos mutantes, la incidencia de luz producirá un exceso de electrones que puede reducir el O₂, provocándose la generación del oxígeno singlete a nivel del fotosistema II. Asimismo, los electrones en lugar de utilizarse para la reducción del NADP y la fosforilación del ADP también pueden canalizarse hacia la reducción del O₂, la producción de los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno vía reacción de Mehler (Apel y Hirt, 2004).

En esta situación el H₂O₂ puede también generarse en el proceso de fotorespiración (Apel y Hirt, 2004). Se cree que la asimilación del CO₂ en las plántulas mutantes sea mínima debido a los estomas pequeños de las plantas enanas que limitan la cantidad de este gas en el sitio de la carboxilación de la RUBISCO.

Ante la posibilidad de la inhibición del sistema defensivo antioxidante por el déficit de los BRs, disminuye la eficiencia del secuestro de los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno, incrementándose el contenido de estas ROS (Apel y Hirt, 2004) y sus reacciones con los lípidos de la membrana de los cloroplastos. Por tanto, es muy probable que este estrés ocurra en los cloroplastos del mutante *d^x* debido al incremento del flujo de los electrones de las clorofilas hacia el oxígeno a causa del enanismo extremo.

Además de la generación significativa de las ROS en los cloroplastos, es muy posible que parte de la peroxidación lipídica asociada con el enanismo extremo se origine en la membrana citoplasmática debido a una activación de las isoenzimas POXs cercanas a la pared celular en las plantas del mutante *d^x*. Los resultados sugieren que la restricción del crecimiento y el enanismo *per se* activan la enzima POX, lo cual puede ser, en parte, independiente de la presencia de los BRs.

Esta activación de la actividad POX puede deberse a una mayor expresión de genes que codifican para esta enzima en las plantas *d^x*. En el mutante deficiente de la *Arabidopsis det2*

se ha encontrado la expresión pronunciada de varios genes que codifican para isoenzimas POXs (Goda *et al.*, 2002). El incremento de la actividad POX puede generar parte del estrés oxidativo a través de la producción excesiva de ROS. A su vez, estas mismas ROS y los productos de la peroxidación lipídica (MDA) pueden también inducir la actividad POX (Pedreño *et al.*, 1995; Mika y Lüthje, 2003) y contribuir a limitar el crecimiento.

Asociado con esta activación de las POXs en el espacio extracelular puede incrementarse la síntesis de la lignina necesaria para que ocurra el reforzamiento de la pared y la restricción del crecimiento del mutante. En este proceso las POXs pueden funcionar a través de su mecanismo peroxidativo en la oxidación de fenoles y formación de los radicales intermediarios fenoxi (R) que darían paso a la generación de la lignina y el reforzamiento de la pared (Hiraga *et al.*, 2001). En varias especies se han detectado isoenzimas POX que correlacionan con la inhibición del crecimiento (Duroux y Welinder, 2003).

También, cabe la posibilidad de que una parte de la actividad POX de las plantas d^x se deba a la inducción de las isoenzimas POXs citosólicas implicadas en la reducción del nivel del AIA a través de la oxidación mediada por la enzima POX de esta auxina (Kato y Shimizu, 1985) y la consecuente reducción del crecimiento. Se sugiere que, el enanismo de las plantas d^x también puede deberse a una disminución del contenido del AIA activo.

A partir de los resultados de la tesis y las evidencias de la literatura se plantea un modelo para el mecanismo de inducción del crecimiento por los BRs en el tomate. En condiciones del alargamiento celular, los tejidos pueden inducir la expresión del gen *d* y la actividad de la enzima CYP85A1 para aumentar la producción de la CS (Figura 20 [1]).

Tanto la CS como la EBL pueden ser reconocidos en la superficie de la membrana por el complejo receptor tBRI1 en el tomate (Figura 20 [1]). Se sugiere que ambos compuestos pueden unirse al dominio LRR extracelular de la proteína, inclusive en plantas del mutante *abs1*.

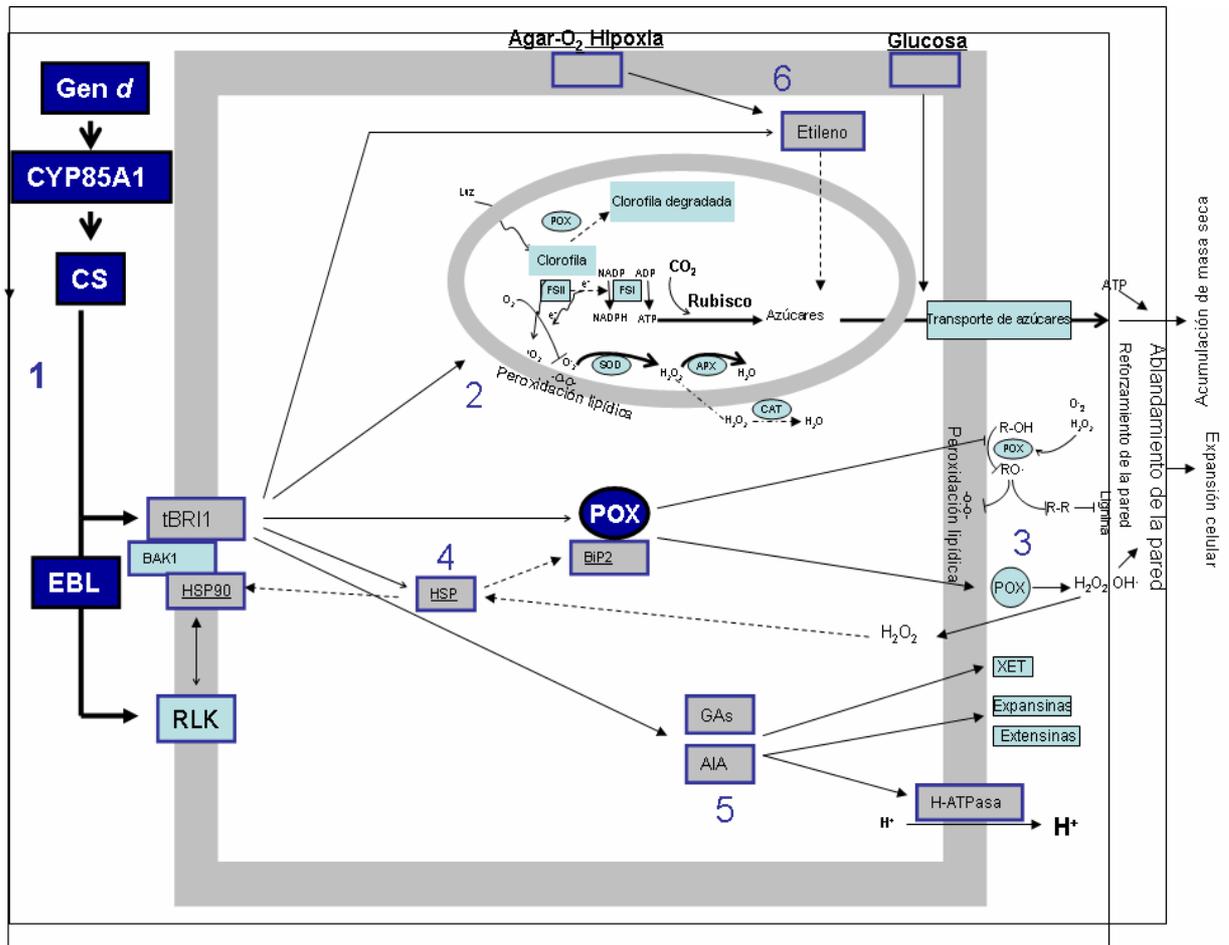


Figura 20. Modelo de la estimulación del crecimiento por los BRs en el tomate. 1) La biosíntesis de la castasterona (CS) es catalizada por la acción de la enzima CYP85A1 y el reconocimiento de este BR y la 24-epibrasinólida (EBL) en la superficie de la membrana puede ocurrir vía activación del complejo receptor tBRI1 y por un mecanismo independiente de este receptor (vía RLK). 2) La actividad de los cloroplastos se regula por los BRs y puede constituir el sitio fundamental de generación de especies activas de oxígeno (ROS) mediada por esta hormona. 3) Las peroxididas (POXs) inducidas por los BRs pueden actuar en la pared celular, liberándose el H₂O₂ y el OH⁻, ROS asociadas con el ablandamiento no enzimático de la pared. 4) Los BRs inducen diferentes proteínas de choque térmico (HSPs) que funcionan como chaperonas moleculares en la protección de proteínas/enzimas relacionadas con la expansión inducida por las hormonas esteroidales. 5) Las giberelinas (GAs) y las auxinas (AIA) interactúan con los BRs y estimulan factores necesarios para la expansión celular (POXs, XETs, expansinas, hiperpolarización de la membrana). 6) Las condiciones de crecimiento (presencia de glucosa y agar) pueden favorecer la producción del etileno e influir en el crecimiento.

A diferencia del mutante insensible *cu3* de tomate, el mutante *abs1* sintetiza la proteína tBRI1 con el dominio extracelular intacto (Montoya *et al.*, 2005) por tanto este receptor debe

mantener su capacidad de unir BRs, aunque debido a la desactivación del dominio quinasa intracelular, se encuentra alterada la transducción de la señal (Montoya *et al.*, 2005).

Sin embargo, la demostración de la respuesta del mutante *abs1* a la EBL (Tablas 5-9; Figura 5) sugiere que puede ocurrir una ruta de inducción del crecimiento por los BRs independiente de tBRI1 (Figura 20 [1]).

Esta hipótesis se refuerza con la evidencia de que las plantas del genotipo *abs1* no manifestaron un enanismo extremo aún con el receptor tBRI1 inactivo (Tabla 2), lo cual sugiere que, aunque pueda encontrarse desactivado el reconocimiento de los BRs para inducir respuestas de crecimiento, en las mismas todavía funciona, de alguna forma, rutas de señales a los BRs que pueden ser alternativas. Incluso, un mutante nulo de *Arabidopsis* (*bri1-116*) con deficiencia del receptor BRI1 aún responde a la aplicación de BR (Tanaka *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2007).

En el modelo se sugiere que, en tomate, el reconocimiento puede ocurrir, además, a través de otros receptores de los BRs en la membrana (Figura 20 [1]). De hecho, se han identificado otras proteínas receptoras RLK (BRL1 y BRL3) que poseen alta afinidad por la brasinólida (Caño-Delgado *et al.*, 2004). Estas RLK podrían participar en el reconocimiento de los BRs y la transmisión del estímulo hacia el interior celular (Figura 20[1]).

En general, las respuestas pronunciadas del mutante *abs1* y la línea transgénica 35SD a la aplicación de los BRs sugieren la posibilidad de que la afectación de la actividad del complejo receptor puede activar estas rutas de reconocimiento independientes de tBRI1, aunque es muy probable que las posibles RLK de tomate no sustituyan el papel central de tBRI1 en la activación de las señales a los BRs.

Otro aspecto en relación al reconocimiento de los BRs es la posibilidad de una regulación del receptor BRI1 por la CS ó la EBL (Figura 20 [1]). La demostración novedosa de que las plántulas de los genotipos 35SD y *abs1* respondieron a la EBL en varios casos ligeramente mejor que el genotipo control AC (Tablas 5-9; Figura 5) fue una evidencia sorprendente ya que la hipótesis que se plantea en la literatura es que la acumulación de BRs endógenos, inclusive a niveles fisiológicos, disminuye la sensibilidad a estos compuestos, debido parcialmente a que se reprime el reconocimiento de la hormona (Noguchi *et al.*, 1999; Montoya *et al.*, 2002). Esto puede deberse a una reducción mediada por los BRs de la

expresión de genes *bri1* por retroalimentación negativa (Goda *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2007) que contribuya a la disminución de las moléculas activadas del receptor tBRI1 en estos genotipos. De hecho se ha sugerido, en *Arabidopsis*, una disminución de la sensibilidad a la hormona a través del aumento de la endocitosis de moléculas BRI1 hacia el interior celular (Rusinova *et al.*, 2004). Sin embargo, la respuesta marcada de estos genotipos acumuladores de CS a la aplicación de la EBL pudiera deberse a una débil represión del reconocimiento a nivel de BRI1 ó alternativamente, a la existencia de otros mecanismos de activación de señales (vía RLK) que desencadenen un efecto pronunciado (Figura 20[1]).

Por otro lado, una vez que se unen los BRs y se activa el complejo receptor BRI1 se desencadenan cascadas de señales (Li y Jin, 2007) y las posibles respuestas. Se planteó anteriormente la hipótesis del papel de los cloroplastos en la generación de ROS ante la deficiencia de los BRs. Sin embargo, las ROS pudieran también ser generadas fundamentalmente a nivel de los cloroplastos durante el proceso de elongación celular (Figura 20 [2]), aún cuando, al parecer, el nivel de las ROS debe ser probablemente inferior en el proceso de crecimiento celular en relación a la cantidad de estas especies en las plantas con enanismo. De hecho, se demostró que las hojas de las plantas AC tuvieron menor contenido del MDA que las d^x (Tabla 2), lo cual pudo deberse al menor contenido de ROS. Esta es una observación importante ya que se plantea que las funciones de las ROS (tóxica ó como señal beneficiosa) depende del nivel de estas especies en el tejido (Mittler, 2002). Se sugiere la hipótesis de que los BRs influyan en la actividad cloroplástica para incrementar la fotosíntesis y simultáneamente controlar el nivel de ROS (Figura 20 [2]).

El mecanismo de acción de los BRs a nivel de los cloroplastos puede implicar la formación de las ROS en este organelo a través de la inducción de POXs que actúan en la degradación oxidativa de las clorofilas (Kato y Shimizu, 1985) (Figura 20 [2]). En la *Arabidopsis*, los BRs reprimen la expresión del gen *Lhcb1.3* que codifica la proteína de unión a clorofila *a/b* colectora de luz (LHC) y disminuyen el contenido de clorofila (Goda *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de la posible disminución del contenido de las clorofilas por la aplicación de los BRs, los resultados demostraron que estos compuestos estimulan la acumulación de masa seca, lo cual puede indicar una mayor actividad fotosintética (Figura 20 [2]). Es conocido que al incrementarse el contenido de BRs se debe estimular la fotosíntesis (Singh y Shono, 2005),

la fijación de CO₂ a través del incremento de la expresión de la subunidad menor de la RUBISCO (Dhaubhadel *et al.*, 2002) y una activación del nivel de RUBISCO inducida por una mayor disponibilidad de CO₂ (Singh y Shono, 2005). En el modelo, se plantea también la hipótesis de que la inducción de la fotosíntesis se acople a una aceleración de la translocación de fotoasimilados necesarios para el crecimiento (Figura 20 [2]). De hecho, la aplicación de los BRs incrementa marcadamente la expresión de genes de proteínas transportadoras de azúcares (hexosas, glucosa, sacarosa) en *Arabidopsis* (Goda *et al.*, 2004).

Otro aporte de la tesis fue la demostración, en tomate, de que el crecimiento inducido por los BRs puede estar conectado con cambios en la actividad de la enzima POX y el estrés oxidativo. Una posible ruta de generación de ROS puede ocurrir durante el ablandamiento de la pared inducido por POX específicas en el proceso de alargamiento celular (Figura 20 [3]). El hecho de que la actividad de la POX y la peroxidación lipídica se incrementaron por la aplicación exógena de la EBL (Figura 6 y 7) ó por un aumento del contenido endógeno de la CS en las plantas 35SD respecto a las AC (Tabla 2) sugiere que la estimulación del crecimiento por los BRs puede ser mediado por las ROS e isoenzimas POXs.

Esta hipótesis se sustenta en que las ROS se han detectado en las regiones en crecimiento activo de raíces, hojas y tallos (Schopfer *et al.*, 2001; Liskay *et al.*, 2003). Cabe la posibilidad de que un posible aumento del H₂O₂ durante el crecimiento a temperatura ambiente se genere por una activación de la enzima SOD (Figura 9) acoplada a la inhibición de la CAT (Figura 11). Además, el radical superóxido puede ser transformado a radical hidroxilo a través de la enzima POX durante el ablandamiento de la pared y el peróxido de hidrógeno también está implicado en la expansión celular (Liskay *et al.*, 2004).

Nuestro modelo sugiere la hipótesis de que, a través de rutas dependientes e independientes de tBRI1, pueden inhibirse isoenzimas POXs asociadas con la formación de lignina (reforzamiento de la pared) y activarse coordinadamente isoenzimas POX generadoras de ROS que facilitan la ruptura de enlaces de moléculas de xiloglucanos y el ablandamiento no enzimático de la pared.

El hecho de que la actividad POX fue menor en las plantas con mayor crecimiento (genotipos AC, 35SD y *abs1*) puede explicarse por una inhibición del grupo de las isoenzimas POXs que participan en la formación de la lignina, el reforzamiento de la pared y la restricción del

crecimiento (Figura 20 [3]). A su vez, la inducción coordinada del grupo de las isoenzimas POXs asociadas con la formación del $\text{OH}\cdot$, el H_2O_2 y el ablandamiento no enzimático de la pared mediado por estas ROS debe facilitar el proceso de la elongación celular (Figura 20 [3]). Por tanto, el modelo que se propone en la presente tesis plantea la hipótesis de que el aumento de la cantidad/actividad de las isoenzimas POX del ablandamiento respecto a las del reforzamiento debe favorecer el crecimiento y viceversa.

De hecho, las plantas acumuladoras de BRs con el crecimiento acelerado (35SD) tuvieron más actividad POX que las AC. Inclusive, esta inducción de actividad POX por los BRs se evidenció en presencia de un enanismo extremo, demostrándose que en las plántulas del mutante d^x tratadas con la EBL se incrementó la actividad POX aún por encima del nivel basal superior entre todos los genotipos (Figura 12A y 13A). Se plantea la hipótesis de que las POXs que actúan durante el ablandamiento de la pared funcionan a través de su mecanismo hidroxílico, sintetizando peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Passardi *et al.*, 2004). Estas ROS poseen elevada reactividad sobre los enlaces de celulosa y hemicelulosa, provocando la ruptura de los mismos en el ablandamiento no enzimático de la pared (Figura 20 [3]).

No obstante, debe decirse que, en ocasiones, no se detectó un estrés oxidativo y una activación de la enzima POX (Figuras 7C, 7D, 16, 17, 18 y 19) asociado a la estimulación del crecimiento por la EBL, lo cual sugiere que la generación de las ROS en ausencia del estrés térmico puede ser una respuesta que depende del contenido endógeno de BRs y del genotipo. Alternativamente, en las plántulas pudo ocurrir una producción ligera de ROS sin que ello tuviera efecto significativo en la peroxidación lipídica.

Una respuesta promovida por los BRs es la expresión de proteínas de choque térmico (HSPs), aún sin estrés por temperatura alta (Deng *et al.*, 2007). En el modelo, se plantea la hipótesis de que algunas de estas proteínas funcionen como chaperonas moleculares (figura 20 [4]). La activación de la proteína de choque térmico BiP2 y la HSP90 por los BRs pueden apoyar la secreción de las proteínas extracelulares, entre ellas las POXs, y también ayudar a estabilizar el complejo tBRI1 de la membrana durante el crecimiento celular. Se ha demostrado que la HSP90 participa en el plegamiento del complejo receptor de proteínas quinasas con estructura

similar a BRI1 (Ishiguro *et al.*, 2002) y se induce por tratamiento con BR (Dhaubhadel *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2007).

Es necesario destacar que, además del posible papel de las ROS en el ablandamiento no enzimático de la pared, los BRs en colaboración con otras hormonas también estimulan el crecimiento a través del ablandamiento de la pared por la acción de enzimas específicas (Figura 20 [5]). Es bien conocido que los BRs inducen la expresión de genes específicos que codifican para varias enzimas modificadoras de la pared (las XETs, las expansinas, las extensinas, entre otras) y también proteínas estructurales como las proteínas arabinogalactanos (Catala *et al.*, 1997; Goda *et al.*, 2002), para facilitar el ablandamiento de la misma, necesario durante el proceso de la elongación celular (Wada y Katsumi, 2005). Se plantea en el modelo que las GAs y las auxinas (AIA) pueden colaborar en el alargamiento celular a través de la estimulación de las XETs, las POXs, extensinas, expansinas (Figura 20 [5]). Esta propuesta se apoya en que, por ejemplo, en la *Arabidopsis*, las auxinas y la brasinólida inducen comúnmente la expresión de genes POX (PER69, PER62, PER49, PER53, PER21) (Goda *et al.*, 2002; Goda *et al.*, 2004) y las GAs también inducen genes que codifican XETs (Kauschmann *et al.*, 1996). Sin embargo, un cambio en el patrón de expresión de isoenzimas específicas ante variaciones en el contenido de BRs puede que no sea una respuesta general en todas las especies. De hecho, en tomate no se han detectado diferencias entre isoenzimas POXs de plantas *d^x* y de la variedad AC al realizarse tinción en gel específica para esta enzima (Evans y Alldridge, 1964).

Es importante aclarar que, en el presente estudio, puede estar enmascarándose la actividad POX y la peroxidación lipídica porque se ha determinado la actividad y el contenido de MDA total y no se sabe que parte se debe a los BRs y cual está asociada al enanismo. Sería de mucho valor estudiar en el futuro la separación, la caracterización de isoenzimas POX y la estimación del estrés oxidativo en los cloroplastos aislados de las plantas de los diferentes genotipos.

Además de alterar las propiedades físicas y la síntesis *de novo* de la pared, los BRs pueden afectar la turgencia de la célula mediante la afectación del transporte de agua, la regulación de las acuaporinas y la actividad de la H-ATPasa (Clouse y Sasse, 1998). En este sentido, la hiperpolarización de la membrana por la acción de la H-ATPasa (Figura 20 [5]) se considera

un mecanismo de estimulación del crecimiento por los BRs y las auxinas (Wada y Katsumi, 2005).

Se demostró que, en general, el crecimiento de las plántulas en el medio MS solidificado con el agar y suplementado con la glucosa fue ligeramente menor que en la solución nutritiva (Tablas 6-9). La reducción del crecimiento de las plántulas en el medio MS puede deberse a la composición del mismo (en particular, la presencia de glucosa y el agar). Por ejemplo, es conocido que la glucosa en el medio de cultivo inhibe el desarrollo de las plántulas (To et al., 2002), la masa seca, la tasa de fotosíntesis neta y el contenido de azúcares (Lian et al., 2002). Por tanto, es muy probable que, debido a la escasa fotosíntesis de las plantas cultivadas *in vitro*, la mayor parte de los azúcares implicados en la acumulación de la masa seca provengan de la glucosa externa (Figura 20[6]). Por su parte, el uso del agar puede disminuir el contenido de O₂, lo cual puede provocar un aumento de la concentración del etileno (Figura 20[6]) y reducirse el contenido de las clorofilas y el crecimiento (Wiengweera *et al.*, 1997).

En cuanto al estrés térmico, la primera novedad de la tesis fue que demostró que determinadas cantidades de BRs exógenos ó endógenos que activan el crecimiento son incapaces de incrementar la sobrevivencia de las plántulas (Tablas 5 y 6). Se sugiere por primera vez la necesidad de un contenido umbral de los BRs, a partir del cual se logra desencadenar la termotolerancia. Sin embargo, el hecho de que los genotipos isogénicos *d^x*, AC y 35SD tuvieran alterado su crecimiento (Tabla 6) y mantuvieran un nivel de termotolerancia similar (Tabla 5) sugiere que el control de la biosíntesis por la enzima CYP85A1 dentro de rangos relativamente bajos de la hormona puede regular la elongación celular y tener poca influencia en la termotolerancia.

Sin embargo, el tratamiento térmico puede reducir la eficiencia del transporte de la hormona y su disponibilidad en el sitio de reconocimiento. Se ha sugerido que los BRs pueden transportarse a través de la planta hasta sus sitios de acción desde la raíz (Yokota *et al.*, 1992). El hecho de que la inducción de la termotolerancia de las plántulas de tomate por la EBL y los análogos espirostánicos se lograra, vía raíz, por la aplicación directa del compuesto en el medio de cultivo ó en la solución nutritiva sugiere la posibilidad de que hubo transporte de BRs en el fenómeno de inducción de la termotolerancia.

Un segundo resultado novedoso fue que la termotolerancia resultó menos sensible a los BRs ya que este efecto requirió de concentraciones superiores para inducirse en comparación al crecimiento (Tabla 5 y 6), lo que puede deberse, entre otros factores, a una menor afinidad del receptor tBRI1 por estos compuestos ante la temperatura alta, un menor número de moléculas del receptor en la membrana ó una inhibición de la actividad receptora por el exceso de hormona (Figura 21[1]).

Las demostraciones de que, en el medio MS, las plántulas fueron más sensibles a la EBL; que las plántulas del mutante *abs1* no respondieron a este compuesto en el medio MS pero si en la solución nutritiva (Tabla 5) y que la EBL fue más efectiva en el genotipo Amalia más sensible a la temperatura alta (Figura 15, Tabla 10) que en Ailsa Craig (Tabla 5, 6 y 8) sugieren que factores como las condiciones del medio de crecimiento, la intensidad del estrés térmico y la susceptibilidad del genotipo pudieran interactuar con elementos asociados con el reconocimiento y la sensibilidad del tejido a los BRs.

Este incremento de la termotolerancia en respuesta a concentraciones relativamente elevadas de BRs (endógenos como exógenos) sugiere la hipótesis de que, a partir de determinado nivel de hormona, se puede producir una inhibición del regulador BIN2 (Figura 21[1]). BIN2 actúa como regulador negativo de BRI1 y su inhibición puede incrementar la señalización a la hormona y la termotolerancia (Koh *et al.*, 2007). La respuesta de inducción de termotolerancia por los BRs en el mutante *abs1* sugiere que puede ocurrir una señalización por un mecanismo independiente de la actividad del dominio quinasa del receptor BRI1, posiblemente vía RLK (Figura 21[1]).

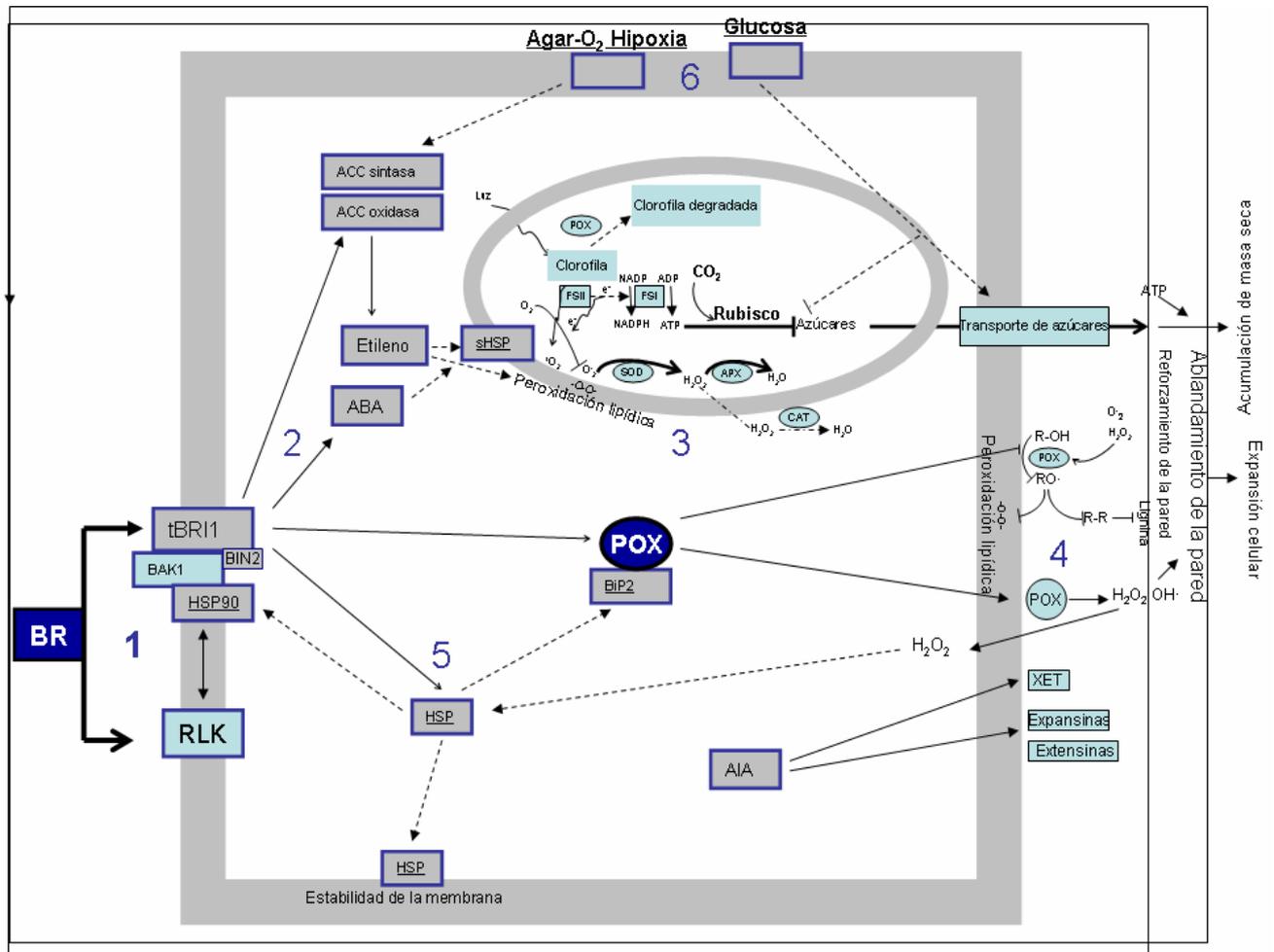


Figura 21. Modelo del mecanismo de acción de los BRs en la inducción de la termotolerancia de plántulas de tomate. 1) Reconocimiento de los BRs (la CS ó la EBL) en la superficie de la membrana y activación de los receptores tBR11 y RLK. 2) Las hormonas del estrés (ABA y Etileno) pueden actuar como señales mediadoras de varias respuestas inducidas por los BRs. 3) La regulación de los niveles de especies activas de oxígeno (ROS) a nivel de la cadena transportadora de electrones y la protección de los cloroplastos frente al estrés oxidativo pueden constituir el mecanismo central de tolerancia a la temperatura alta. 4) Las peroxidasas (POXs) y las ROS (H₂O₂; OH·) que se generan por la acción de esta enzima pueden funcionar en el ablandamiento de la pared y la expansión celular en situación del estrés térmico. 5) La inducción de la expresión de múltiples proteínas de choque térmico (HSPs) por los BRs y el H₂O₂ contribuye a la estabilización de la membrana y proteínas/enzimas necesarias para la inducción de la termotolerancia de los tejidos. 6) Las condiciones ambientales externas (glucosa, agar, O₂) activan señales que pueden interactuar con posibles factores protectores y pueden modular la termotolerancia inducida por los BRs.

A su vez, la activación de la transducción de señales a los BRs puede provocar el incremento del ácido abscísico (ABA) y el etileno (Figura 21[2]). De hecho, se ha demostrado que el ABA se incrementa muy rápidamente en respuesta a concentraciones relativamente altas de

los BRs (Kovtun *et al.*, 2000), mientras que el incremento de la concentración del etileno se produce vía activación de la ACC oxidasa por los BRs (Deng *et al.*, 2007).

Además, esta inducción del etileno por los BRs se logra a concentraciones de 1-3 μM , mientras que las concentraciones más bajas de BR no tienen efecto (Arteca *et al.*, 1983; 1991), es decir, se observa el comportamiento consistente con la dependencia observada en la termotolerancia.

En general, se demostró un menor estrés oxidativo ante la temperatura alta en los genotipos de tomate con presencia de la CS ó ante la aplicación exógena de la EBL (Figura 7 y 17), lo cual sugiere que los BRs pueden disminuir el nivel de ROS inducido por choque térmico.

En este aspecto es importante notar que la protección antioxidante conferida por la EBL se manifestó en las plántulas expuestas a la luz; a saber al final del periodo de “recuperación” en las plántulas (d^x y 35SD) y durante la “recuperación” en las plántulas *abs1* (Comparación figuras 6D y 7D), sugiriéndose que la protección puede asociarse fundamentalmente al estrés fotooxidativo generado por los cloroplastos en la luz (Figura 21[3]).

Dado que el ABA y el etileno son mediadores de los efectos de los BRs, se especula que estas tres hormonas pueden colaborar para proteger los cloroplastos a través de la reducción del estrés oxidativo en este organelo (Figura 21[3]). El etileno induce termotolerancia y disminuye el estrés oxidativo (Clarke *et al.*, 2004; Larkindale *et al.*, 2005).

En cuanto al posible mecanismo de regulación del estrés oxidativo, no está claro si los BRs reducen el nivel de producción de radicales a través de una disminución de su generación ó un aumento de la actividad de los sistemas defensivos antioxidantes. Es conocido que estas enzimas reducen su actividad frente a las temperaturas altas provocando un aumento de las ROS (Foyer, 1997). Se ha planteado la hipótesis de un papel de la actividad de las enzimas SOD, APX y CAT responsables del secuestro de radicales libres (Figura 21[3]) ya que la EBL incrementó la actividad de estas enzimas en plantas de tomate sometidas a choque térmico (Ogweno *et al.*, 2008). Sin embargo, los resultados de la presente tesis demostraron que no siempre se observa este efecto con la EBL, lo cual pudo deberse a que la activación del sistema antioxidante por los BRs depende de la severidad del estrés (Scandalios, 1990). Es importante aclarar que la peroxidación lipídica depende también de otros mecanismos

oxidativos no asociados a estas enzimas (Foyer, 1997), incluyendo por ejemplo, la oxidación no enzimática de los lípidos de la membrana (Weber *et al.*, 2004).

Por otra parte, una posible protección de la actividad cloroplástica en los tejidos foliares que contienen BRs puede estimular el crecimiento de las plantas. Es conocido que el calor disminuye la acumulación de la clorofila (Burke, 2001) y la actividad de la RUBISCO (Cseke y Buchanan, 1986). Sin embargo, los BRs pueden inducir la fijación del CO₂ en condiciones de temperatura alta (Singh y Shono, 2005), probablemente debido a que ellos han demostrado un efecto positivo en la expresión de la subunidad menor de la RUBISCO ante el choque térmico (Dhaubhadel *et al.*, 2002). Por tanto, la protección del aparato fotosintético por estos componentes puede apoyar, en parte, la termotolerancia de las plantas.

Por otra parte, los resultados de la tesis sugieren que las POXs también pueden funcionar en la termotolerancia mediada por los BRs (Figura 21[4]). Es muy probable que la activación de las señales a los BRs mantenga el funcionamiento del mecanismo de elongación celular, induciéndose las POXs ligadas al ablandamiento e inhibiéndose coordinadamente las enzimas del reforzamiento de la pared según se sugirió anteriormente en la estimulación del crecimiento por los BRs (Figura 20[3]). De hecho, un aspecto novedoso de la tesis fue que, en general, se encontró una asociación entre la estimulación del crecimiento y la activación de las POXs por la EBL en las plántulas sometidas al estrés térmico (Figuras 12 y 13), lo cual sugiere un predominio de las isoenzimas que funcionan en la formación del OH·, el H₂O₂ y el ablandamiento de la pared durante la elongación celular de las plántulas estresadas (Figura 21[4]). Por otra parte, la activación de la POX en respuesta a la EBL en el genotipo *abs1* (Figura 12C) sugiere que esta enzima puede inducirse por rutas independientes de la actividad del dominio quinasa del receptor tBRI1.

La protección de la actividad de las POX por los BRs tiene enorme importancia ya que se ha observado que las enzimas modificadoras de la pared son sensibles a la temperatura alta (Wada y Katsumi, 2005) y, en general, la actividad POX tendió a ser sensible al choque térmico aplicado, excepto en el genotipo termotolerante *abs1* (Figura 8A y 12). Por tanto, el mantenimiento de una elevada actividad POX puede contribuir a que las plántulas puedan mantener el alargamiento celular en condiciones de temperatura alta (Figura 21[4]).

Debe decirse que entre las ROS, el peróxido del hidrógeno a concentraciones bajas puede funcionar en el desarrollo de la termotolerancia (Foyer, 1997). El H₂O₂ generado por la acción de las POXs de la pared ó el producido en otros sitios de la célula como los cloroplastos puede disparar la síntesis de HSPs (Dat *et al.*, 2000) y por tanto contribuir a la inducción de HSPs y la termotolerancia por los BRs (Figura 21[4]). Las ROS pueden formarse en otros procesos u organelos celulares como es la generación del H₂O₂ a partir de la NADPH oxidasa de la membrana citoplasmática, de las enzimas amino-oxidasas y peroxidasas de la pared (Desikan *et al.*, 1998), producto de la foto-respiración (Foyer, 1997) y de la respiración mitocondrial (Richter y Kass, 1991).

Se postula un modelo donde la producción del H₂O₂ por las POXs antes de la aplicación del choque térmico (Figura 20[3]) puede ser una señal previa que refuerce la termotolerancia inducida por los BRs (Figura 21[4]). Así, un nivel moderado de estrés oxidativo previo inducido por la aplicación de la EBL ó un incremento del contenido de CS puede constituir un mecanismo de adaptación del tejido a un aumento posterior de la temperatura.

Debe señalarse que los resultados también sugieren la posibilidad de que el grupo de las isoenzimas POXs que participan en la formación de la lignina y el reforzamiento de la pared (Figura 21[4]) se protejan por los BRs ya que las plántulas *d^x* mantuvieron un nivel superior de POX (Figura 12A y 13A) y restringieron su crecimiento en condiciones de choque térmico (Tabla 6).

Es conocido que la acumulación marcada de varios tipos de HSPs constituye el mecanismo más estudiado de la inducción de la termotolerancia por los BRs (Deng *et al.*, 2007; Kagale *et al.*, 2007). Se sugiere que la termotolerancia de la actividad POX puede mantenerse, en parte, por la protección conferida por la HSP ((BiP2) durante la secreción de POXs hacia el espacio entre la membrana citoplasmática y la pared (Figura 21[5]). La chaperona (BiP2) se activa apreciablemente por BR (Deng *et al.*, 2007).

La protección de las HSPs puede darse por la acumulación de estas proteínas a nivel de la membrana. La demostración del aumento de la estabilidad de la membrana en todos los genotipos por los incrementos de las cantidades de BRs (Figura 5) puede deberse, en parte, por una mayor presencia de estas HSPs (Figura 21[5]). El hecho de que la estabilización de la membrana por la EBL (Figura 5) no se asociara con un cambio marcado en el estrés oxidativo

inducido por la temperatura alta (Figura 6) sugiere que otros mecanismos (ejemplo, HSPs) y no las ROS se implican en la regulación de la estabilidad de la membrana. También, la HSP90 puede ser inducida para la protección del complejo responsable del reconocimiento de BRs en la membrana durante el estrés (Figura 21[5]). Se ha sugerido que la HSP90 puede asociarse al receptor de BRs y acumularse durante el estrés (Dhaubhadel *et al.*, 2002).

Por tanto, se plantea la hipótesis de que los BRs pueden facilitar su propio reconocimiento en condiciones del estrés térmico a través de la protección del receptor por la vía de la acumulación de HSP90 y la estabilización de la membrana necesaria para la actividad de tBRI1 (Figura 21[1,5]). Como el receptor de los BRs se localiza en la membrana, la estabilización de la misma puede ser un mecanismo primario de mantenimiento de la estructura activa de tBRI1 y la sensibilidad del tejido a esta hormona ante un aumento de la temperatura.

Además, cabe la posibilidad de que una mayor acumulación de las HSPs y una reducción de la peroxidación lipídica por los BRs en la membrana de los cloroplastos y el citoplasma (Figura 21[5]), favorezca la estabilización de las interacciones lípido-proteína y la integridad de la membrana (Georgieva, 1999). Este proceso puede ser esencial en la protección de las proteínas de membrana asociadas al transporte electrónico y la fijación de CO₂ en los cloroplastos durante el estrés por temperatura alta. Es conocido que la EBL induce algunas HSPs de bajo peso molecular (HSP17.6 y HSP23.8) en las plántulas de tomate sometidas a la temperatura alta, las que pudieran acumularse en la membrana (Dhaubhadel *et al.*, 1999; Singh y Shono, 2005) y conferirle termotolerancia a la cadena de transporte de electrones de los cloroplastos y las mitocondrias, según investigaciones de Heckathorn *et al.* (1998) y Downs y Heckathorn (1998).

Es importante señalar que, en este proceso de inducción de HSPs por los BRs pueden estar involucradas las hormonas etileno y ABA, que también inducen estas proteínas (Larkindale *et al.*, 2005). Específicamente, la expresión de HSP90 en la inducción de la termotolerancia por los BRs parece ser mediada por el ABA (Wilén *et al.*, 1995). Por otra parte, las diferentes HSPs inducidas por los BRs pueden jugar una función central en la protección de la maquinaria de transducción de proteínas (Kagale *et al.*, 2007).

Por otra parte, se demostró que, aunque las plántulas crecieron más lentamente en el medio MS, ellas resultaron más tolerantes a la temperatura alta cuando se crecieron en este medio solidificado con el agar y suplementado con la glucosa (Tablas 5-9). Este incremento de la termotolerancia puede deberse a que el choque por temperatura alta incrementa la acumulación de glucosa y otras hexosas en el tejido (Rolland *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2004) y eleva el contenido del etileno (Hays *et al.*, 2007). En las circunstancias específicas donde se eleva la concentración de la glucosa, al parecer el etileno no siempre actúa como una hormona inhibitoria sino que puede funcionar en la estimulación del crecimiento (Pierik *et al.*, 2006; Tholen *et al.*, 2007), ayudando a que la glucosa afecta menos la fotosíntesis (Gibson, 2004). Por su parte, la glucosa *per se* puede estabilizar las proteínas y las membranas y actuar como un soluto compatible durante el desarrollo de la termotolerancia (Kaplan *et al.*, 2004).

Se propone que el incremento de la termotolerancia puede estar asociado, en parte, a una generación de determinado nivel de hipoxia (Figura 21[6]) debido a la presencia del agar en el medio MS que disminuye la concentración del O₂ (Wiengweera *et al.*, 1997). El hecho de que la inducción de la termotolerancia por los BRs se logró en condiciones donde podrían presentarse otros tipos de estrés como la hipoxia implica que estos compuestos pueden incrementar la tolerancia a varios tipos de situaciones estresantes. Se sabe que la aplicación de BRs también induce la tolerancia a diferentes tipos de estrés abióticos (Clouse y Sasse, 1998; Krishna, 2003; Kagale *et al.*, 2007). Además, se ha observado que el mutante hipersensible a BRs (*bin2*) incrementa su tolerancia a diferentes estrés abióticos (Koh *et al.*, 2007).

Es importante dejar claro que la termotolerancia es un fenómeno con mecanismos más complejos. Por tanto, los elementos discutidos hasta aquí constituyen una parte de las posibles conexiones que pueden ocurrir entre diferentes rutas de señales comunes a otros estreses (ejemplo, el etileno, el H₂O₂) en la inducción de la termotolerancia por los BRs. Es conocido la existencia de mecanismos comunes de tolerancia cruzada entre diferentes tipos de estrés, incluyendo la temperatura alta, la hipoxia y el estrés oxidativo (Dat *et al.*, 1998; Desikan *et al.*, 2001).

Un aspecto a destacar es que, al igual que la activación de la POX y el estrés oxidativo, parte de la termotolerancia puede ser independiente del contenido de CS. Esto se sustenta en el

hecho de que las plantas deficientes d^x con un nivel superior de estrés oxidativo sobrevivieron y estabilizaron su membrana (Tabla 4; Figuras 5-7). Es muy probable que una expresión abundante de HSPs en las plántulas d^x contribuya a su termotolerancia. Se ha demostrado que, en la *Arabidopsis*, las plantas mutantes deficientes de BRs (*det2*) acumularon un nivel pronunciado de HSPs (Kagale *et al.*, 2007).

Es conocido que, en ocasiones, las plantas enanas han tenido tolerancia alta a diferentes tipos de estrés, por ejemplo, al estrés oxidativo (Hsieh *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2005), y al calor (Vettakkorumakankav *et al.*, 1999). Sin embargo, los resultados de la presente tesis demostraron que el enanismo inducido por deficiencia de BRs puede tener poco efecto en la tolerancia basal de las plantas a las temperaturas altas.

Es importante decir que esta respuesta de tolerancia a las temperaturas altas a nivel de plántulas crecidas en el medio MS no puede generalizarse a otros estadios y condiciones de crecimiento y desarrollo del vegetal, ya que la termotolerancia varía con la edad y las características de crecimiento, de modo que mecanismos de tolerancia a las temperaturas altas que se expresan en plántulas no siempre aparecen luego en plantas adultas que se desarrollan bajo condiciones naturales (Mullarkey y Jones, 2000).

La viabilidad del polen puede utilizarse para evaluar la termotolerancia en estadios de desarrollo reproductivo de plantas adultas; ya que los BRs son particularmente abundantes en el polen (Clouse y Sasse, 1998). La EBL a la concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ incrementa la termotolerancia básica del polen de tomate durante la germinación *in vitro* (Singh y Shono, 2003).

Las diferencias estructurales entre la CS (un BR con grupo cetona) y la EBL (BR con grupo lactona) puede ser una de las causas de que, en general, la respuesta no es la misma cuando el contenido de BR se aumenta de manera endógena ó cuando se aplica la EBL exógena en plántulas que poseen niveles diferentes de CS endógena. También, el hecho de que la capacidad de la inducción de la termotolerancia de dos análogos espirostánicos de la CS fue menor a la de la EBL puede explicarse, en parte, debido a que las lactonas son más activas que las cetonas (Clouse y Sasse, 1998); sin embargo se desconoce la relación entre estos grupos químicos con el reconocimiento de estos compuestos por el receptor.

Un factor que pudiera afectar la termotolerancia es que el reconocimiento de los BRs por el receptor tBRI1 puede variar con la estructura química. Se conoce que existen variaciones en la afinidad del receptor ante diferentes BRs, demostrándose que los compuestos pueden unirse al receptor BRI1 en *Arabidopsis*, aunque la afinidad de los mismos fue diferente (Wang *et al.*, 2005a). Se propone que la EBL, la CS y sus análogos espiroestánicos a las concentraciones relativamente altas pueden ser reconocidos por el receptor de membrana tBRI1 con afinidades distintas, inhibiéndose la actividad receptora para desencadenar la termotolerancia. Las diferencias en la respuesta pudiera deberse a que la proteína tBRI1 reconozca deficientemente el anillo espirocetálico de los análogos, estructura que no se encuentra en la EBL y otros BRs naturales.

La estructura química también puede afectar el transporte y la distribución tisular de los BRs. Por ejemplo, la ausencia de la cadena lateral con grupos hidroxilos puede limitar las reacciones de glucosilación en estos análogos y esto puede provocar que sus formas derivadas sean más hidrofóbicas y que su movilización sea más lenta en la planta.

La presencia de una función OH con estereoquímica α en posición 5 del núcleo esteroidal en el análogo A puede ser importante en la actividad biológica del mismo. Se ha demostrado que los BRs pueden ser esterificados en el núcleo esteroidal. La desactivación reversible de los BRs a través de la formación de acil-conjugados en C-3 y la posterior liberación de hormona libre, al parecer, es importante en la disponibilidad de BRs activos (Suzuki *et al.*, 1993). Puede suceder que estos análogos sean inactivados reversiblemente dentro del tejido y este grupo OH constituya un factor que favorezca la liberación y disponibilidad de formas activas del compuesto A. De esta manera, el análogo A puede promover los efectos de termotolerancia con más eficiencia que el análogo B. Este aspecto puede tener una importancia en el diseño de estrategias para la síntesis de análogos de BRs más activos, en particular porque esta función OH en el carbono 5 es única y no aparece en los BRs naturales (Brosa *et al.*, 1998).

La importancia práctica del uso de análogos en lugar de la EBL puede ser considerable teniendo en cuenta que la 24-epibrasinólida es muy costosa y su aplicación práctica tiene múltiples problemas, debido fundamentalmente a que el compuesto tiene efectos de corta duración en las plantas (Kamuro, 1999), lo que provocó que se suspendieran los ensayos con brasinólida, epibrasinólida y homobrasinólida en condiciones de campo en Japón y los países

europeos.

Por tanto, aunque desde el punto de vista teórico la EBL ha sido útil como brasinoesteroide de referencia en la dilucidación de la acción de las hormonas esteroidales, su introducción en la práctica productiva puede presentar limitaciones. En cambio, las formulaciones a base de los análogos, A y B, conocidas también como MH5 y BB6, respectivamente, son obtenidas en el país, y a diferencia de los BRs naturales sus efectos pueden ser más prolongados en el tiempo. Se han demostrado efectos positivos de diferentes análogos (BB6, BB16, MH5) en la estimulación del rendimiento de los cultivos y como sustituto hormonal en la biotecnología; encontrándose promoción del crecimiento a una concentración de 0.0005 mg.L^{-1} del MH5 (González *et al.*, 1998; Núñez *et al.*, 2003). Es posible que, también en el caso de los análogos de BRs, las respuestas de crecimiento sean más sensibles que las de termotolerancia. El comportamiento promisorio de los análogos puede deberse, entre otras razones, a las posibles diferencias en la forma de su transformación catabólica. La degradación de BRs naturales como la 24-epiCS y la EBL implica la hidroxilación del carbono 25 y 26 así como la ruptura de la cadena lateral a nivel del carbono 20. Sin embargo, estas reacciones no pueden ocurrir en los análogos ya que los mismos no tienen esa cadena lateral típica, por lo que ellos pudieran mantenerse intactos por un tiempo más prolongado.

Por otra parte, específicamente en el cultivo del tomate, la aplicación de estos análogos de BRs no tanto en la promoción del crecimiento sino como sustancias anti-estrés puede ser beneficiosa, teniendo en cuenta el interés por aumentar los rendimientos y la calidad del fruto en el período primavera-verano “estación lluviosa”, cuando la interacción de las temperaturas altas con la alta intensidad luminosa y humedad relativa son las responsables de la baja fructificación del cultivo. En particular, la variedad de tomate “Amalia” se caracteriza por un buen comportamiento general y rendimientos altos, incluso cuando abundan las temperaturas elevadas (Álvarez *et al.*, 1997), aunque se han ensayado cultivares que han demostrado termotolerancia superior (Florido *et al.*, 2002). Si los efectos observados de estos compuestos en las plántulas de la variedad Amalia, en condiciones *in vitro* se manifestaran a nivel de campo, los beneficios pudieran ser considerables; por lo que se requiere de la ejecución de otras investigaciones para continuar profundizando en este sentido.

6. CONCLUSIONES

1. El incremento del contenido de los BRs y su reconocimiento a nivel del receptor estimulan el crecimiento a través de la inducción de estrés oxidativo y de la actividad peroxidasa.
2. Las respuestas de los brasinoesteroides dependen de la concentración; siendo el crecimiento más sensible a la hormona que la termotolerancia.
3. El reconocimiento de los brasinoesteroides puede desencadenarse por vías dependientes e independientes de la actividad del dominio quinasa del receptor tBR11.
4. Los brasinoesteroides provocan la activación de la enzima peroxidasa e inhiben el estrés oxidativo inducido por el choque térmico para promover la termotolerancia.
5. La capacidad superior del análogo A (25(R) 2 α ,3 α ,5 α trihidroxi-espirostan-6-ona) respecto al B (25(R) 2 α ,3 α dihidroxi 5 α espirostan-6-ona) de inducir la termotolerancia depende poco de la protección contra la oxidación en plántulas del genotipo Amalia.

7. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros mutantes de homeostasis de BRs así como los efectos de la EBL y los análogos espirostánicos en la dinámica de la termotolerancia y el metabolismo oxidativo durante la imposición del choque por temperatura alta y el período de “recuperación”.
- Continuar profundizando en el estudio evaluando la expresión de HSPs, la actividad fotosintética y respiratoria así como el metabolismo oxidativo (metabolitos, genes antioxidantes y ROS) en distintos genotipos a nivel de plántula, organelos aislados y en otros estadios de crecimiento y desarrollo susceptibles a las temperaturas altas.
- Utilización de este documento como material de estudio en la docencia de pre y postgrado.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdelmageed, A.H. Nazim Gruda, Bernd Geyer. **2004**. Effects of Temperature and Grafting on the Growth and Development of Tomato Plants under Controlled Conditions. Deutscher Tropentag, October 5 - 7, en Berlin "Rural Poverty Reduction through Research for Development and Transformation".
2. Aebi H. **1984**. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 105:121-126.
3. Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Grover A. **2002**. Plant Hsp100 proteins: structure, function and regulation. **Plant Sci.** 163 (33):97-405.
4. Alfonso M., Yruela I., Almárcegui S., Torrado E., Pérez M.A. **2001**. Unusual tolerance to high temperature in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. Cell cultures deficient in fatty acid desaturation. **Planta** 212:573-582.
5. Ali M.B., Hahn E.J., Paek K.Y. **2005**. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. **Plant Physiol. Biochem.** 43(3):213-223.
6. Álvarez M., De Armas G., Martínez B. **1997**. Informe de nuevas variedades. Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate para consumo fresco. **Cult. Trop.** 18(1): 830.
7. Anderson J.A. **2002**. Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. **Scientia Horticulturae.** 95(4): 277-284.
8. Aono M., Kubo A., Saji H., Tanaka K., Kondo N. **1993**. Enhanced tolerance to photo-oxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* that express the gene for glutathione reductase from *Escherichia coli*. **Plant Cell Physiol.** 32:691-697.
9. Apel K., Hirt H. **2004**. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Ann. Review Plant Biol.** 55: 373-399.
10. Arteca R. N., De-Sheng T., Schlagnhauer C., Mandava N.B. **1983**. The effect of brassinolide on auxin-induced ethylene production by etiolated mung bean segments. **Physiol. Plant.** 59:539-544.
11. Arteca R.N., De-Sheng T., Mandava N.B. **1991**. The inhibition of brassinosteroid-induced ethylene biosynthesis in Etiolated Mung Bean Hypocotyl Segments by 2,3,5-Triiodobenzoic acid and 2-(p-Chlorophenoxy)-2-methylpropionic Acid. **J. Plant Physiol.** 139: 52-56.
12. Asada K. **1992**. Ascorbate peroxidase- A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiol. Plant.** 85: 235-241.
13. Asada K. **1994**. Production and action of reactive oxygen species in photosynthetic tissues. En: Foyer C., Mullineaux P. (Eds). Causes of Photo-oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton., 77-105.
14. Asada K. **1999**. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 50:601-39.
15. Azpiroz R. Wu Y., LoCascio J. C., Feldmann K. A. **1998**. An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. **Plant Cell.** 10: 219-230.
16. Bajguz A., Tretyn A. **2003**. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. **Phytochem.** 62:1027-1046.

17. Bancos S., Szatmári A. M., Castle J., Kozma-Bognár L., Shibata Kyomi., Yokota T., Bishop G., Nagy F., Szekeres M. **2006**. Diurnal Regulation of the Brassinosteroid-Biosynthetic CPD Gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 141(1): 299-309.
18. Banzet N., Richaud C., Deveaux Y., Kazmaier M., Gagnon J., Triantaphylidès C. **1998**. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. **Plant J.** 13(4): 519-527.
19. Baroli I., Niyogi K.K. **2000**. Molecular genetics of xanthophylls-dependent photoprotection in green algae and plants. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.** 355: 1385-1394.
20. Bergmeyer H. U. **1974**. Peroxidase. En: Bergmeyer H.U. (Eds). Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press Inc. New York and London. 685-690.
21. Beyer W.F., Fridovich I. **1987**. Assaying for Superoxide Dismutase Activity: Some Large Consequences of Minor Changes in Conditions. **Anal. Biochem.** 161: 559-566.
22. Bishop G.J. **2003**. Brassinosteroid mutants of crops. **J. Plant Growth Regul.** 22: 325-335.
23. Bishop G.J., Koncz C. **2002**. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. **Plant Cell** 14: 97-110.
24. Bishop G.J., Nomura T., Yokota T., Harrison K., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Jones J.D.G., Kamiya Y. **1999**. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 96: 1761-1766.
25. Blum A. **1998**. Breeding crop varieties for stress environments. **Plant Sci.** 2:199-236.
26. Blum A., Ebercon A. **1981**. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. **Crop Sci.** 21:43-47.
27. Bouchereau A., Aziz F., Larher J.M. **1999**. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Sci.** 140:103-125.
28. Bouquin T., Meier C., Foster R., Nielsen M.E., Mundy J. **2001**. Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. **Plant Physiol.** 127:450-458.
29. Bradford M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
30. Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. **2000**. Responses to abiotic stresses. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R., (eds). Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, MD: ASPB, 1158-1203.
31. Brosa C., Zamora I., Terricabras E., Kohout L. **1998**. The effect of electrostatic properties and ability to form hydrogen-bonds on the activity of brassinosteroid side-chain analogs. **Czech. Chem. Comm.** 63(10):1635-1645.
32. Burke J.J. **2001**. Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance. **Physiol. Plant.** 112(2): 167-170.
33. Busch W., Wunderlich M., Schöffl F. **2005**. Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 41:1-5.
34. Camejo D., Jiménez A., Alarcón J.J., Torres W., Gómez J.M., Sevilla F. **2006**. Changes in photosynthetic parameters and antioxidant activities following heat-shock treatment in tomato plants. **Functional Plant Biol.** 33(2):177-187.
35. Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-García S., Cheng J.C., Nam K.H., Li J., Chory J. **2004**. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. **Development.** 131:5341-5351.

36. Cao S., Xu Q., Cao Y., Qian K., An K., Zhu Y., Binzen H., Zhao, Kuai B. **2005**. Loss-of-function mutations in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in *Arabidopsis*. **Physiol. Plantarum** 123: 57-64.
37. Castillo F., Miller P.R., Greppin H. **1987**. "Waldsterben" Part IV: extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. **Experientia** 43:111-115.
38. Castle J., Szekeres M., Jenkins G., Bishop G.J. **2005**. Unique and overlapping expression patterns of Arabidopsis CYP85 genes involved in brassinosteroid C-6 oxidation. **Plant Mol. Biol.** 57:129-140.
39. Catala C., Rose J., Benneth A. **1997**. Auxin-regulation and spatial localization of an endo-1,4- β -D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding
40. Chaitanya K.V., Sundar D., Masilamani S., Reddy A.R. **2002**. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. **Plant Growth Regul.** 36(2): 74-79.
41. Chaitanya K.V., Sundar D., Reddy A.R. **2001**. Mulberry leaf metabolism under high temperature stress. **Biol. Plant.** 44(3): 379-384.
42. Chen S., Schopfer P. **1999**. Hydroxyl radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. **Euro. J. Bioch.** 260: 726-735.
43. Chengkun H., Suzhi G., Jiasen L. **1996**. Effects of drought stress on activated oxygen metabolism in tomato. **J. Fujian. Agr. Univ.** 25(3):307-311.
44. Choe S., Fujioka S., Noguchi T., Takatsuto S., Yoshida S., Feldmann K.A. **2001**. Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. **Plant J.** 26: 573-582.
45. Clarke S.M., Mur L.A.J., Wood J.E., Scott I.M. **2004**. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant J.** 38 (3): 432-447.
46. Clouse S.D. **2002**. Arabidopsis Mutants Reveal Multiple Roles for Sterols in Plant Development. **Plant Cell.** 14: 1995-2000.
47. Clouse S.D., Langford M., McMorris T.C. **1996**. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. **Plant Physiol.** 111: 671-678.
48. Clouse S.D., Sasse J.M. **1998**. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.** 49:427-451.
49. Coll D.M. **2005**. Identificación de nuevos genes regulados por brasinoesteroides y caracterización de uno de ellos en *Arabidopsis thaliana* Heynh. /T. Altmann y S. González, tutores. Tesis de grado (Dr. en Ciencias Biológicas). UH. Cuba.
50. Coll F., Jomarrón I., Robaina C., Alonso E., Cabrera M. T. **1995**. Polyhydroxyspirostanones as plant growth regulators. **PCT Int. Appl.** W09713. 780 [C.A. 126, 343720].
51. Crafts-Brandner S.J., Salvucci M.E. **2000**. Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. **Proc. Na. Acad. Sci. USA.** 97:13430-13435.
52. Cseke C., Buchanan B.B. **1986**. Regulation and utilisation of photosynthate in leaves. **Biochim. Biophys. Acta.** 853:43-63.

53. Cuartero J., Fernández-Muñoz R.F., González-Fernández J.J. **1995**. Estrés abióticos. En: Nuez, F. (Eds). El cultivo del tomate. Ediciones Muni-Prensa. Madrid, Barcelona y México. 351-384.
54. Dat J., Vandenbeeke S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. **2000**. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell. Mol. Life Sci.** 57: 779-795.
55. Dat J.F., Foyer C.H., Scott I.M. **1998**. Changes in salicylic acid and antioxidants during induction of thermotolerance in mustard seedlings. **Plant Physiol.** 118: 1455-1461.
56. Deng Z., Zhang X., Tang W., Osés-Prieto J.A., Suzuki N., Gendron J.M., Chen H., Guan S., Chalkley R.J., Peterman T.K., Burlingame A.L., Wang Z.Y. **2007**. A Proteomic Study of Brassinosteroid Response in Arabidopsis. **Mol. Cell. Proteomics.** 11:451-467.
57. Desikan R., Burnett E.C., Hancock J.T., Neill S.J. **1998**. Harpin and hydrogen peroxide induce expression of a homologue of go91^{phox} in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **J. Exp. Bot.** 49: 1767-1771.
58. Desikan R., Mackerness S.A.H., Hancock J.T., Neill S.J. **2001**. Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. **Plant Physiol.** 127:159-172.
59. Dhaubhadel S., Browning K.S., Gallie D.R., Krishna P. **2002**. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. **Plant. J.** 29(6): 681-691.
60. Dhaubhadel S., Chaudhary S., Dobinson K., Krishna P. **1999**. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. **Plant. Mol. Biol.** 40: 333-342.
61. Downs C.A., Heckathorn S.A. **1998**. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH: ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. **FEBS. Lett.** 430:246-250.
62. Duroux L., Welinder K.G. **2003**. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. **J. Mol. Evol.** 57: 397-407.
63. Ecker J.R. **1995**. The ethylene signal transduction pathway in plants. **Science** 268: 667-675.
64. Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G. **1997**. The carotenoids as anti-oxidants: a review. **J. Photochem. Photobiol.** 41:189-200.
65. Evans J.J., Alldridge N.A. **1964**. The distribution of peroxidases in extreme dwarf and normal tomato (*Lycopersicon esculentum mill.*). **Phytochem.** 4: 499-503.
66. Finkelstein R. R., Zeevart J. A. D. **1994**. En: *Arabidopsis*, eds. Meyerowitz E. M., Somerville C. R. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY). 523-553.
67. Florido M., Lara R.M., Plana D., Alvarez M. **1999**. Establecimiento de un método eficiente para evaluar la tolerancia al calor en tomate (*Lycopersicon spp.*). **Cult. Trop.** 20(2):69-73.
68. Florido M., Lara R.M., Plana D., Alvarez M., García A. **2002**. Patrones electroforéticos de peroxidasas, catalasas, superóxido dismutasas y proteínas totales en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) sometidas a estrés de temperaturas. **Cult Trop.** 23(1):45-48.
69. Foyer C.H. **1993**. Ascorbic acid. En: Alscher R.G., Hess J.L. (Eds). Antioxidants in Higher Plants. Boca Raton, CRC Press. 31-58.

70. Foyer C.H. **1997**. Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. En: Scandalios J. (Eds). *The Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 587-621.
71. Foyer C.H., Descourvières P., Kunert K.J. **1994**. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. **Plant Cell Environ.** 17: 507-523.
72. Foyer C.H., Halliwell B. **1976**. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta** 133: 21-25.
73. Foyer C.H., Harbinson J. **1994**. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. En: Foyer C., Mullineaux P. (Eds). *Causes of Photo-oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton., 1-43.
74. Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M. **1997**. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiol. Plant.** 100:241-254.
75. Friedrichsen D.M., Joazeiro C.A., Li J., Hunter T., Chory J. **2000**. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. **Plant Physiol.** 123: 1247–1256.
76. Fujioka S., Sakurai A. **1997**. Brassinosteroids. **Nat. Prod. Rep.** 14:1-10.
77. Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S. **2002**. An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. **Plant Physiol.** 130: 930–939.
78. Fujioka S., Yokota T. **2003**. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. **Annu. Rev. Plant Biol.** 54:137–164.
79. García A., Rodríguez T., Hector E., Núñez M. **2005**. Efecto del análogo de brasinoesteroide MH-5 en el crecimiento *in vitro* del arroz (*oryza sativa* L) en condiciones de déficit hídrico. **Cult. Trop.** 26(1): 89-93.
80. Georgieva K., Tsonev T., Velikova V., Yordanov I. **2000**. Photosynthetic activity during high temperature treatment of pea plants. **J. Plant Physiol.** 157(2): 169-176.
81. Georgieva K. **1999**. Some mechanisms of damage and acclimation of the photosynthetic apparatus due to high temperature. **Bulg. J. Plant Physiol.** 25(3-4): 89-99.
82. Gibson S.I. **2004**. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network. **J. Exp. Bot.** 55: 253–264.
83. Gilmore A.M., Yamamoto H.Y. **1993**. Biochemistry of xanthophylls-dependent nonradiative energy dissipation. En: Yamamoto H.Y., Smith C.M. (Eds). *Photosynthetic Responses to the Environment*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD. 162-165.
84. Goda H., Sawa S., Asami T., Fujioka S., Shimada Y., Yoshida S. **2004**. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 134:1555-1573.
85. Goda H., Shimada Y., Asami T., Fujioka S., Yoshida S. **2002**. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 130:1319–1334.
86. Gong M., Li Y.J., Chen S.Z. **1998a**. Abscisic acid induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by Ca²⁺ and associated with antioxidant systems. **J. Plant Physiol.** 153:488-496.

87. Gong M., Vanderluit M.R., Knight M.R., Trewavas A.J. **1998b**. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca²⁺ level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. **Plant. Physiol.** 116:429-437.
88. González S., Diosdado E., Rodríguez J., Román M.I., Garbey P., Coll D., Benítez D., Abreu C., Echemendía D., Ramírez I., Ferro N., Coll F. **1998**. Actividad Biológica de nuevos biorreguladores de las plantas. **Revista Biología.** 12:28-34.
89. González, J., Córdova, A., Aragón, C.E., Pina, D., Rivas, M, Rodríguez, R. **2005**. Effect of an analogue of brassinosteroid on FHIA-18 plantlets exposed to thermal stress. **Infomusa** 14: 18-21
90. Hamilton C.A., Brosman H.J., McIntyre M., Graham D., Dominiczak A.F. **2001**. Superoxide excess in hypertension and aging. **Hypertension** 37: 529-533.
91. Hays D.B., Do J.H., Mason R.E., Morgan G., Scott A. F.**2007**. Heat stress induced ethylene production in developing wheat grains induces kernel abortion and increased maturation in a susceptible cultivar. **Plant Science.** 172(6):1113-1123.
92. He J.X., Gendron J.M., Sun Y., Gampala S.S., Gendron N., Sun C.Q., Wang Z.Y. **2005**. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. **Science.** 307: 1634–1638.
93. He J.X., Gendron J.M., Yang Y., Li J., Wang Z.Y. **2002**. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. **Proc Nat Acad Sci USA.** 99: 10185–10190.
94. He Y.J., Xu R.J., Zhao Y.J. **1996**. Enhancement of senescence by epibrassinolide in leaves of mung bean seedling. **Acta Phytophysiol. Sin.** 22: 58-62.
95. He Z., Wang Z.Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Ronald P., Chory J. **2000**. Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. **Science** 288: 2360–2363.
96. Heath R.L., Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Arch. Biochem. Biophys.** 125: 189-198.
97. Heckathorn S.A., Downs C. A., Sharkey T. D., Coleman J. S. **1998**. The small, methionine-rich heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. **Plant Physiol.** 116: 439–444.
98. Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. **2001**. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiol.** 42:462-468.
99. Hoagland D.R., Arnon D.I. **1950**. The water-culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Exp. Stn.** (Circ. no 347).
100. Hong S.W., Lee U., Vierling E. **2003**. *Arabidopsis* hot Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures. **Plant Physiol.** 132: 757-767.
101. Hong Z., Ueguchi-Tanaka M., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Hasegawa Y., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. **2005**. The rice brassinosteroid-deficient dwarf2 mutant, defective in the rice homolog of *Arabidopsis* DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone. **Plant Cell** 17: 2243-2254.
102. Hong Z., Ueguchi-Tanaka M., Shimizu-Sato S., Inukai Y., Fujioka S., Shimada Y., Takatsuto S., Agetsuma M., Yoshida S., Watanabe Y., Uozu S., Kitano H., Ashikari M., Matsuoka M. **2002**. Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6

- oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem. **Plant J.** 32:495–508.
103. Hong Z., Ueguchi-Tanaka M., Umemura K., Uozu S., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. **2003**. A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf* (*d2*), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. **Plant Cell** 15: 2900–2910.
 104. Horváth C.J., Pollock C.J., Peacock J.M. **1997**. Development of laboratory-based methods for assessing seedling thermotolerance in pearl millet. **New Phytol.** 137: 129–139.
 105. Hossain M., Nakano Y., Asada K. **1991**. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its implication in the susceptibility of plants to chilling-induced photoinhibition. **Planta** 183: 222-228.
 106. Hsieh T.H., Lee J.T., Yang P.T., Chiu L.H., Chang Y.Y., Wang Y.C., Chan M.T. **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 Physiol.** 129: 1086-1094.
 107. Hu Y.X., Bao F., Li J.Y. **2000**. Promotive effects of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. **Plant J.** 24: 693–701.
 108. Iba S. **2002**. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. **Annu. Rev. Plant. Biol.** 53: 225-45.
 109. Ikekawa N., Zhao Y.J. **1991**. Application of 24-epibrassinolide in agriculture. En: Culter HG, Yokota T, Adam G, eds. Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Washington DC: American Chemical Society 280–291.
 110. Ishiguro S., Watanabe Y., Ito N., Nonaka H., Takeda N., Sakai T., Kanaya H., Okada K. **2002**. SHEPHERD is the Arabidopsis GRP94 responsible for the formation of functional CLAVATA proteins. **Embo J.** 21:898-908.
 111. Ishikawa T., Yoshimura K., Sakai K., Tamoi M., Takeda T., Shigeoka S. **1998**. Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. **Plant Cell Physiol.** 39: 23-34.
 112. Jinn T.L., Chen Y.M., Lin C.Y. **1995**. Characterization and physiological function of class I low-molecular-mass, heat shock protein complex in soybean. **Plant. Physiol.** 108: 693-701.
 113. Joyard J., Teyssier E., Miege C., Berny-Seigneurin D., Maréchal E., Block M.A., Dorne A.J., Rolland N., Ajlani G., Douce R. **1998**. The biochemical machinery of plastid envelope membranes. **Plant Physiol.** 118: 715-723.
 114. Kagale S., Divi U.K., Krochko J.E., S  ller W.A., Krishna P. **2007**. brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *brassica napus* to a range of abiotic stresses. **Planta** 225: 353-364.
 115. Kamuro Y. **1999**. Practical application of brassinosteroids in agricultural fields./ Y. Kamuro y S. Takatsuto.- In: Brassinosteroids. Steroidal Plant Hormones. Springer-Verlag Tokyo.
 116. Kaplan F., Kopka J., Haskell D.W., Zhao W., Schiller K.C, Gatzke N., Sung D.Y., Guy C.L **2004**. Exploring the Temperature-Stress Metabolome of *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 136:4159-4168.

117. Karni L., Aloni B. **2002**. Fructokinase and hexokinase from pollen grains of bell pepper (*Capsicum annuum* L.): Possible role in pollen germination under conditions of high temperature and CO₂ enrichment. **Annals Bot.** 90(5): 607-612.
118. Kato M., Shimizu S. **1985**. Chlorophyll metabolism in Higher Plants VI. Involvement of Peroxidase in Chlorophyll degradation. **Plant Cell Physiol.** 26(7):1291-1301.
119. Kauschmann A., Jessop A., Koncz C., Szekeres M., Willmitzer L., Altmann T. **1996**. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. **Plant J.** 9: 701-713.
120. Keren-Keiserman A., Tanami Z., Shoseyov O., Idit G. **2004**. Peroxidase activity associated with suberization processes of the muskmelon (*Cucumis melo*) rind. **Plant Physiol.** 121: 141-150.
121. Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A. **1999**. Brassinosteroids. A new Class of Plant Hormones. Academic Press. New York. 456p.
122. Kim T.W., Hwang J.Y., Kim Y.S., Joo S.H., Chang S.C., Lee J.S., Takatsuto S., Kim S.K. **2005**. *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis. **Plant Cell** 17: 2397-2412.
123. Koh S., Lee S.Ch., Kim M.K., Koh J.H., Lee S., An G., Choe S., Kim S.R. **2007**. T-DNA tagged knockout mutation of rice OsGSK1, an orthologue of Arabidopsis BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stress. **Plant. Mol. Biol.** 65:453-466.
124. Koka C.V., Cerny R.E., Gardner R.G., Noguchi T., Fujioka N., Takatsuto S., Yoshida S., Clouse S.D. **2000**. A putative role for the tomato gene *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiol.** 122: 85-98.
125. Konigshofer H., Lechner S. **2002**. Are polyamines involved in the synthesis of heat-shock proteins in cell suspension cultures of tobacco and alfalfa in response to high-temperatures stress?. **Plant Physiol. Biochem.** 40: 51-59.
126. Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. **2000**. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 97(6):2940-2945.
127. Krishna P. **2003**. Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. **J. Plant Growth Regul.** 22(4): 289 -297.
128. Krishna P. **2007**. Comunicación Personal. Department of Biology. University of Western Ontario. Canada.
129. Kulaeva O.N., Burkhanova E.A., Fedina A.B., Kaokhlova V.A., Bokebayeva G.A. **1991**. Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant-cell-ultrastructure under stress conditions. En: Cutler H.G., Yokota T., Adam G. (Eds). *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. American Chemical Society. Washington, DC. 141-155.
130. Kwezi L., Meier S., Mungur L., Ruzvidzo O., Irving H., Gehring C. **2007**. The *Arabidopsis thaliana* Brassinosteroid Receptor (AtBRI1) Contains a Domain that Functions as a Guanylyl Cyclase *In Vitro*. **Plant J.** 6:215-222.
131. Lagrimini L. M., Rothstein S. **1987**. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiol.** 84:438-442.

132. Larkindale J., Hall J.D., Knight M.R., Vierling E. **2005**. Heat Stress Phenotypes of *Arabidopsis* Mutants Implicate Multiple Signaling Pathways in the Acquisition of thermotolerance. **Plant Physiol.** 138: 882-897.
133. Larkindale J., Knight M.R. **2002**. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. **Plant Physiol.** 128: 682–695.
134. Lee G.J., Pokala N., Vierling E. **1995**. Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. **J. Biol. Chem.** 270:10432-10438.
135. Leithold B., Muller G., Weber W.E., Westermann T. **1997**. Investigations on heat tolerance of spring wheat varieties of different origin under growth chamber conditions. **J. Agron. Crop Sci.** 179:115-122.
136. Levitt J. **1980**. Responses of plants to environmental stress: Chilling, freezing, and high temperature I. Stress and strain terminology. Academic. Press. New York. 3-9.
137. Li J., Jin H. **2007**. Regulation of brassinosteroid signaling. **Trends Plant Sci.** 12(1): 37-41.
138. Li J., Wen J., Lease K.A., Doke J.T., Tax F.E., Walker J.C. **2002**. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. **Cell** 110: 213–222.
139. Li J.M., Chory J. **1997**. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. **Cell** 90: 929–938.
140. Li J.M., Nam K.H. **2002**. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. **Science** 295: 1299-1301.
141. Lin C.Y., Chen Y.M., Key J.L. **1985**. Solute leakage in soybean seedlings under various heat shock regimes. **Plant Cell Physiol.** 26: 1493–1498.
142. Liskay A., Kenk B., Schopfer P. **2003**. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. **Planta** 217: 658-667.
143. Liskay A., Van der Zalm E., Schopfer P. **2004**. Production of reactive oxygen intermediates (H_2O_2 , and $\cdot\text{OH}$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiol.** 136:3114–3123.
144. López-Serrano M., Fernández M.D., Pomar F., Pedreno M.A., Ros Barcelo A. **2004**. *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for the cell lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. **J. Exp. Bot.** 55: 423-431.
145. Matters. **1996**. Effect of elevated temperatures on catalase and superoxide dismutase during maize development. **Differentiation** 30:190-196.
146. Mehlhorn H., Tabner B., Wellburn A. **1990**. Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. **Physiol. Plant.** 79: 377-383.
147. Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K.J. **2003**. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. **Plant Physiol.** 132:272-281.
148. Mika A., Lüthje S. **2003**. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. **Plant Physiol.** 132:1489-1498.
149. Mittler R. **2002**. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** 7: 405–410.

150. Mohanty N. **2003**. Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of flag leaf and the grain yield in two cultivars of *Triticum aestivum* (L.) exposed to warmer growth conditions. **J. Plant Physiol.** 160(1): 71-74.
151. Montoya T., Nomura T., Farrar K., Kaneta T., Yokota T., Bishop G.J. **2002**. Cloning the Tomato Curl3 Gene Highlights the Putative Dual Role of the Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase tBRI1/SR160 in Plant Steroid Hormone and Peptide Hormone Signaling. **Plant Cell** 14: 3163–3176.
152. Montoya T., Nomura T., Yokota T., Farrar K., Harrison K., Jones J.G.D., Kaneta T., Kamiya Y., Szekeres M., Bishop G.J. **2005**. Patterns of Dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. **Plant J.** 42: 262-269.
153. Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Lui Y.X., Hwang I., Jones T., Sheen J. **2003**. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. **Science.** 300:332–336.
154. Mullarkey M., Jones P. **2000**. Isolation and analysis of thermotolerant mutants of wheat. **J. Exp. Bot.** 51(342):139-146.
155. Mussig C., Biesgen C., Lisso J., Uwer U., Weiler E., Altmann T. **2000**. A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from Arabidopsis thaliana provides a potential link between brassinosteroid-action and jasmonic-acid synthesis. **J Plant Physiol.** 157: 143–152.
156. Mussig C., Fischer S., Altmann T. **2002**. Brassinosteroid-regulated gene expression. **Plant Physiol.** 129:1241-251.
157. Nakano Y., Asada K. **1981**. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 22:867-880.
158. Nam K.H., Li J. **2002**. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. **Cell** 110: 203–212.
159. Nguyen H.T., Joshi C.P. **1992**. Molecular strategies for the genetic dissection of water and high temperature and water stress. Adaptation of food crops to temperature and water stress. **Proceeding of an International Symposium.** Taiwan, 13-18.
160. Noctor G., Foyer C.H. **1998**. Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49: 249-279.
161. Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Sakurai A., Yoshida S., Li J., Chory J. **1999**. *Arabidopsis* det2 is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-en-3-one to (24R)-24-methyl-5-cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis. **Plant Physiol.** 120: 833–840.
162. Nomura T., Kushiro T., Yokota T., Kamiya Y., Bishop G.J., Yamaguchi S. **2005**. The Last Reaction Producing Brassinolide Is Catalyzed by Cytochrome P-450s, CYP85A3 in Tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis*. **J. Biol. Chem.** 280: 17873-17879.
163. Nomura T., Sato T., Bishop G.J., Kamiya Y., Takatsuto S., Yokota T. **2001**. Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6-deoxocathasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. **Phytochem.** 57: 171-178.
164. Nover L., Bharti K., Döring P., Mishra S., Ganguli A., Scharf K.D. **2001**. Arabidopsis and the Hsf world: how many heat stress transcription factors do we need? **Cell Stress Chaperones** 6: 177–189.

165. Núñez M., Robaina C., Coll F. **2003**. Synthesis and practical applications of brassinosteroid analogs. En: Hayat S., Ahmad A. *Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 87-117.
166. Ogwenó J.O., Son X.S., Shi K., Hu W.H., Mao W.H., Zhou Y.H., Yu J.Q., Nogués S. **2008**. Brassinosteroid alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum*. **J. Plant Growth Regul.** 27:49-57.
167. Ogwenó J.O., Song X.S., Shi K., Hu W.H., Mao W.H., Zhou Y.H., Yu J.Q., Nogués S. **2008**. Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing Carboxylation Efficiency and Enhancing Antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum*. **J. Plant Growth Regul.**27: 49-57.
168. Oh M.H., Ray W.K., Huber S.C., Asara J.M., Gage D.A., Clouse S.D. **2000**. Recombinant brassinosteroid insensitive 1 receptor-like kinase autophosphorylates on serine and threonine residues and phosphorylates a conserved peptide motif *in vitro*. **Plant Physiol.** 124: 751–766.
169. Ortega P., Rodés R., Ortega E., Fernández L., Díez M., García V. **2003**. Efecto de un brasinoesteroide sintético (DAA-6) sobre el crecimiento del vástago y las raíces de la caña de azúcar. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 34(2): 67-72.
170. Panchuck I.I., Volkov R.A., Schoffl F. **2002**. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 129: 838-853.
171. Panikulangara T.J., Eggers-Schumacher G., Wunderlich M., Stransky H., Schoffl F. **2004**. Galactinol synthase1. A Novel Heat Shock Factor Target Gene Responsible for Heat-Induced Synthesis of Raffinose Family Oligosaccharides in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 136(2): 3148 - 3158.
172. Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. **2005**. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Rep.** 24:255-265.
173. Passardi F., Penel C., Dunand C. **2004**. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends Plant Sci.** 9:534-540.
174. Pedreño M.A., Ferrer M.A., Gaspar T., Muñoz R., Ros-Barcelo A. **1995**. The polyfuntionality of cell wall preoxidases avoids the necessity of an independent H₂O₂ – generating system for phenolic coupling in the cell wall. **Plant Peroxidase Newslett.** 5: 3-8.
175. Perez-Perez J. M., Ponce M.R., Micol J.M. **2002**. The UCU1 *Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis. **Develop Biol.** 242: 161–173.
176. Pien S., Wyrzykowska J., McQueen-Mason S., Smart C., Fleming A. **2001**. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. **Plant Physiol.** 98(20): 11812-11817.
177. Pierik R., Tholen D., Poorter H, Visser E.J.W., Voesenek L.A.C.J.**2006**. The Janus face of ethylene: growth stimulation and inhibition. **Trends Plant Sci.** 11: 176–183.
178. Polle A.**1997**. Defense against photooxidative damage in plants. En: Scandalios J. (Eds). *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.785-813.
179. Queitsch C., Hong S.W., Vierling E., Lindquist S. **2000**. Heat shock protein 100 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 12:479-492.

180. Quiroga M., Guerrero C., Botella M.A., Barcelo A., Amaya I., Medina M.I., Alonso F.J., de Forchetti S.M., Tigier H., Valpuesta V. **2000**. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiol.** 122:1119-1127.
181. Radin J.W., Lu Z., Percy R.G., Zeiger E. **1994**. Genetic variability for stomatal conductance in Pima cotton and its relation to improvements of heat adaptation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91: 7217–7221.
182. Rao M.V., Hale B.A., Omrod D.J. **1995**. Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. Role of antioxidant enzymes. **Plant Physiol.** 109: 421-432.
183. Rennenberg H., Polle A. **1994**. Protection from oxidative stress in transgenic plants. **Bioch. Soc. Trans.** 22: 936-940.
184. Richter C., Kass G.E.N. **1991**. Oxidative stress in mitochondria. Its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. **Chem. Biol. Interact.** 77(1): 1-23.
185. Rivero R.M., Ruiz J.M., García P.C., Lopez-Lefebvre L.R., Sanchez E., Romero L. **2001**. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Sci.** 160 (2): 315-321.
186. Rivero R.M., Ruiz J.M., Romero L. **2004**. Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress. **J. Hort. Sci. Biotech.** 79(4):560-564.
187. Rivero R.M., Sanchez E., Ruiz J.M., Romero L. **2003**. Influence of temperature on biomass, ion metabolism and some related bioindicators in tomato and watermelon plants. **J. Plant Physiol.** 160(9):1065-1071.
188. Rizhsky L., Liang H., Mittler R. **2002**. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiol.** 130: 1143–1151.
189. Rolland F., Moore B., Sheen J. **2002**. Sugar sensing and signaling in plants. **Plant Cell.** 14: 185–205.
190. Roy B., Gosh. **1996**. Polyamines, both common and uncommon, under heat stress in rice (*Oryza sativa*) callus. **Physiol. Plant.** 98:196-200.
191. Russinova E., Borst J.W., Kwaaitaal M., Cano-Delgado A., Yin Y., Chory J., de Vries S.C. **2004**. Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). **Plant Cell.** 16:3216–3229.
192. Sakata T., Takahashi H., Nishiyama I., Higashitani A. **2000**. Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. **J. Plant Research** 113: 395-402.
193. Sam O., Núñez M., Falcón V., Ruiz M.C., Dell'Amico J. 2001. Effect of a brassinosteroid analogue and high temperature stress on leaf structure of *Lycopersicon esculentum*. **Biol. Plant.** 44(2): 213-218.
194. Sato S., Peet M.M. **2005**. Effects of moderately elevated temperature stress on the timing of pollen release and its germination in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). **J. Hort. Sci. & Biotech.** 80(1):23-28.
195. Sato Y., Murakami T., Funatsuki H., Matsuba S., Saruyama H., Tanida M. **2001**. Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. **J. Exp. Bot.** 52:145-153.
196. Scandalios J.G. **1990**. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Adv. Genet.** 28:1-41.

197. Scandalios J.G. **1994**. Regulation and properties of plant catalases. En: Foyer C.H., Mullineaux P.M.(Eds). Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in Plants. CRC Press, Boca Ratón. 275-315.
198. Scandalios J.G., Guan L.M., Polidoros A. **1997**. Catalase in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. En: Scandalios J.G. (Eds). Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, NY. 343-406.
199. Schnabl H., Roth V., Friebe A. **2001**. Brassinosteroid-induced stress tolerances of plants. *Recent. Res. Devel. Phytochem.* 5:169-183.
200. Schopfer P., Plachy C., Frahry G. **2001**. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 125:1591–1602.
201. Shimada, Y., Goda H., Nakamura A., Takatsuto S., Fujioka S., Yoshida S. **2003**. Organ-Specific Expression of Brassinosteroid-Biosynthetic Genes and Distribution of Endogenous Brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131(1):287-297.
202. Singh I., Shono M. **2003**. Effect of 24-epibrassinolide on pollen viability during heat-stress in tomato. *Indian J. Exp. Biol.* 41: 174-176.
203. Singh I., Shono M. **2005**. Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, on thermotolerance of tomato. *Plant Growth Regul.* 47:111-119.
204. Smillie R.M., Hetherington S.E. **1983**. Stress tolerance and stress induced injury in crop plants measured by chlorophyll fluorescence in vivo. *Plant Physiol.* 72:1043–1050.
205. Solórzano E. **2002**. Estudio de enzimas y proteínas de defensa en la interacción tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)-tizón temprano (*Alternaria solani* Ellis y Martín (Jones y Grout)). /O. León, tutor. Tesis de grado (Dr. en Sanidad Vegetal). UCLV. Cuba.
206. Storozhenko S., De Pauw P., Van Montagu M., Kushnir S. **1998**. The heat shock element is a functional component of the Arabidopsis APX1 gene promoter. *Plant Physiol.* 116: 1005-1014.
207. Sun W., Van Montagu M., Verbruggen N. **2002**. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Bioch. Biophys. Acta* 1577: 1–9.
208. Suzuki H., Kim S.K., Takahashi N., Yokota T. **1993**. Metabolism of castasterone and brassinolide in mung bean explant. *Phytochem.* 33: 1361-1367.
209. Szekeres M., Koncz C. **1998**. Biochemical and genetic analysis of brassinosteroid metabolism and function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 145–155.
210. Tanabe S., Ashikari M., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Yano M., Yoshimura A., Kitano H., Matsuoka M., Fujisawa Y., Kato H., Iwasaki Y. **2005**. A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *Plant Cell* 17: 776–790.
211. Tanaka K., Asami T., Yoshida S., Nakamura Y., Matsuo T., Okamoto S. **2005**. Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. *Plant Physiol.* 138: 1117-1125.
212. Tholen D., Thijs L. P., Voesenek LACJ., Poorter H. **2007**. Ethylene Insensitivity Results in Down-Regulation of Rubisco Expression and Photosynthetic Capacity in Tobacco. *Plant Physiol.* 144:1305-1315.
213. Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P. **2002**. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288:129-138.

- tomato hypocotyls. **Plant J.** 12: 417-426.
- tomato hypocotyls. **Plant J.**12: 417-426.
214. Torres M.A., Dangl J.L. **2005**. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Curr. Opin. Plant Biol.** 8: 397-403.
 215. Vacca R.A., de Pinto M.C., Valenti D., Passarella S., Marra F., De Gara L. **2004**. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. **Plant Physiol.** 134:1100-1112.
 216. Vahala J., Keinanen M., Schutzendubel A., Polle A., Kangasjarvi J.**2003b**.Differential effects of elevated ozone on two hybrid aspen genotypes predisposed to chronic ozone fumigation. Role of ethylene and salicylic acid. **Plant Physiol.**132:196-205.
 217. Vahala J., Ruonala R., Keinanen M., Tuominen H., Kangasjarvi J.**2003a**. Ethylene insensitivity modulates ozone-induced cell death in birch. **Plant Physiol.**132:185-195.
 218. Vallelian-Bindschedler L., Schweizer P., Mosinger E., Mettraux J.P. **1998**. Heat-induced resistance in barley to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*) is associated with bursts of AOS. **Physiol. Plant Pathol.** 52: 165-199.
 219. Vani B., Saradhi P.P., Mohanty P. **2001**.Characterization of high temperature induced stress impairments in thylakoids of rice seedlings. **Indian J. Bioch. Biophys.** 38: 220–229.
 220. Vert G., Chory J. **2006**. Downstream nuclear events in brassinosteroid signaling. **Nature.** 441: 96–100.
 221. Verwijst T., Von Firks H.A. **1994**. Plant response to temperature stress is characterized by an asymmetric sigmoid function. **Env. Exp. Bot.** 34: 69-74.
 222. Vettakkorumakankav N.N., Falk D., Saxena P., Fletcher R.A. **1999**. A Crucial Role for Gibberellins in Stress Protection of Plants. **Plant Cell Physiol.** 40(5): 542-548.
 223. Vierling E. **1991**. The roles of heat proteins in plants. **Ann. Rev. Plant. Mol. Biol.** 42: 579-620.
 224. Vierling E. **2007**. Comunicación Personal. Department of Biochemistry. University of Arizona. USA.
 225. Wada Y., Katsumi M.**2005**. Brassinolide as a modulator of the activities of cell wall loosening proteins. **Plant Biotech.** 22(1):33–38.
 226. Wang X., Chory J. **2006**. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. **Science** 313: 1118-1122.
 227. Wang X., Goshe M.B., Soderblom E.J., Phinney B.S., Kuchar J.A., Li J., Asami T., Yoshida S., Huber S.C., Clouse S.D. **2005a**. Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. **Plant Cell** 17: 1685–1703.
 228. Wang X., Li X., Meisenhelder J., Hunter T., Yoshida S., Asami T., Chory J. **2005b**. Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. **Develop. Cell** 8(6): 855-865.
 229. Wang Z.Y., Nakano T., Gendron J. et al. **2002**. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. **Develop. Cell** 2: 505–513.
 230. Wang Z.Y., Seto H., Fujioka S., Yoshida S., Chory J. **2001**. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. **Nature** 410: 380–383.

231. Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E.E. **2004**. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. **Plant J.** 37(6): 877–888.
232. Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnov N. **1997**. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature** 393: 365-369.
233. Wiengweera A., Greenway H., Thomson C.J. **1997**. The use of agar nutrient solution to simulate lack of convention in waterlogged soils. **Annals of Botany.** 80:115-123.
234. Wilen R.W., Sacco M., Gusta L.V., Krishna P. **1995**. Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. **Physiol. Plant.** 95: 195-202.
235. Wu M.T., Wallner S.J. **1983**. Heat Stress Responses in Cultured Plant Cells. **Plant Physiol.** 72: 817-820.
236. Xu R.J., Guo Y.S., Zhao Y.J. **1990**. Epibrassinolide-induced changes in the elongation, endogenous GA₃, ABA and starch content of cucumber hypocotyls. **Acta Phytophysiol. Sinica.** 16: 125-130.
237. Yamamuro C., Ihara Y., Wu X., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. **2000**. Loss of function of a rice *brassinosteroid insensitive1* homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. **Plant Cell.** 12: 1591–1606.
238. Yi H.C., Joo S., Nam K.H., Lee J.S., Kang B.G., Kim W.T. **1999**. Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Plant Mol. Biol.** 41: 443–454.
239. Yin Y., Wang Z.Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T., Chory J. **2002**. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. **Cell** 109:181-191.
240. Yin Y.H., Vafeados D., Tao Y., Yoshida S., Asami T., Chory J. **2005**. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. **Cell** 120:249-259.
241. Yokota T., Higuchi K., Kosaka Y., Takahashi N. **1992**. Transport and metabolism of brassinosteroids in rice. **Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agri.** 13: 298-305.
242. Young J.C., Moarefi I., Hartl F.U. **2001**. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. **J. Cell Biol.** 154:267-273.
243. Zhao Y.J., Xu R.J., Luo W.H. **1990**. Inhibitory effects of abscisic acid on epibrassinolide-induced senescence of detached cotyledons in cucumber seedlings. **Chinese Sci. Bull.** 35: 928-931.
244. Zhu C., Zeng G.W., Liu F. **1996**. Effect of epi-brassinolide on the heat shock tolerance and antioxidant metabolism in cucumber seedling. **J. Zhejiang Agric. Univ.** 22 (3): 284-288.