

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**EFFECTO DE LA APLICACION DE INHIBIDORES DE LA EXPRESION
GENETICA SOBRE LA SENESCENCIA EN SEGMENTOS
DE RAMAS DE PITAYO (*Stenocereus queretaroensis*)**

TESIS PROFESIONAL

**PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

P R E S E N T A :

ALEXANDER DE LUNA FORS

GUADALAJARA, JAL. SEPTIEMBRE 1996



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

0178/96

C. ALEXANDER DE LUNA FORS
P R E S E N T E . -

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "EFECTOS DE LA APLICACION DE INHIBIDORES DE LA EXPRESION GENETICA SOBRE LA SENESCENCIA EN SEGMENTOS DE RAMAS DE PITAYO (Stenocereus queretaroensis) para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el Dr. Eulogio Pimienta Barrios.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
 Las Agujas, Zapopan, Jal., 01 de Marzo de 1996
EL DIRECTOR


M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ

EL SECRETARIO


OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

c.c.p.- Dr. Eulogio Pimienta Barrios.- Director de Tesis.- pte.
 c.c.p.- El expediente del alumno.

AEIR/SVM/mahs*

C.U.C.B.A.



DIV. DE CS.
BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS
Y AMBIENTALES DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

P R E S E N T E

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante **ALEXANDER DE LUNA FORS** código **091409585** con el título "**Efectos de la aplicación de inhibidores de la expresión genética sobre la senescencia en segmentos de ramas de pitayo (*Stenocereus queretaroensis*)**", consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 29 de julio de 1996



DR. EULOGIO PIMENTA BARRIOS
DIRECTOR DE TESIS



M.C. CECILIA NERI-LUNA
ASESOR

SINODALES

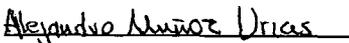
DRA. ANNE SANTERRE LUCAS



M.C. ARTURO OROZCO BAROCIO



M.C. ALEJANDRO MUÑOZ URIAS



Este trabajo se realizó en el Departamento de Ecología de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de Guadalajara (CUCBA), bajo la dirección del Dr. Eulogio Pimienta Barrios y asesoría de la M.C. Cecilia Neri Luna. Al mismo tiempo, forma parte del proyecto "Relación entre la actividad fotosintética, la variación estacional de carbohidratos y el esfuerzo reproductivo en poblaciones silvestres de pitayo (*Stenocereus queretaroensis* (Webber) Buxbaum)" auspiciado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 0568P-B9506).

AGRADECIMIENTOS

Ahora que he concluido este trabajo, tengo muy presentes a quienes de alguna u otra manera se vieron involucrados directamente en el mismo y sin cuya ayuda éste sencillamente no hubiera salido adelante. En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Pimienta, quien fue uno de mis mejores maestros y me dio la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, así como a Cecilia Neri por sus enseñanzas en el laboratorio y su invaluable apoyo durante las exhaustivas revisiones del manuscrito. A mis sinodales Dra. Anne Santerre y Arturo Orozco muchas gracias por sus atinados comentarios, esto pese a las prisas a las que fueron sometidos, y muy en especial a Alejandro Muñoz por su siempre amable apoyo en el análisis estadístico. En este sentido, también quiero agradecer a Salvador Velázquez por su ayuda en el manejo de los programas. También quiero expresar mi gratitud a quienes me precedieron en el trabajo dentro del laboratorio y quienes por lo tanto fueron mis maestros: Celia Robles, Lucila Méndez, y muy en especial Francisco Cuevas por su ayuda durante el desarrollo de nuestros experimentos. De la misma manera, agradezco ampliamente a Erick de la Barrera por todo el apoyo brindado durante las largas sesiones de trabajo experimental y los no pocos favores de mensajería, así como a Julia Zañudo, la compañera Esther Arceta y Gerardo Hernández Vera. Finalmente agradezco la agradable compañía de Blanca Ramírez, Martín Huerta y Alejandro Domínguez, también miembros del equipo de trabajo del Dr. Pimienta.

Por cuestiones que van más allá, quiero dar las gracias y expresar mi admiración por mis padres Rubén y Mary, y mis hermanos Erik y Karen. Del mismo modo agradezco a Paulina (quien además se vio involucrada en buena parte de los procedimientos necesarios para sacar esto adelante) y a mis amigos, particularmente a los marranos, los medievales y los bolcheviques. A todos se les extraña ahora que se está un poco más lejos. Como este trabajo representa el fin de una etapa, deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Miguel Méndez por los conocimientos que logramos durante la misma. Por último, no quiero desaprovechar la ocasión para dar las gracias a mi abuelo Alfonso Fors, por quién de alguna manera estoy en estas andanzas. A todos, otra vez, muchas gracias.

Este trabajo está dedicado a Luis Delaye, Jorge Schöndube, David Valenzuela, Luis Bernardo Vázquez, Arturo Becerra y Hugo A. Rivas; todos ellos biólogos orates de Jalisco.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
II.1. DESCRIPCIÓN E IMPORTANCIA DE LA ESPECIE	3
II.1.1. Descripción de las zonas áridas y semiáridas	4
II.1.2. Adaptación del pitayo a la aridez	5
II.2. EL PROCESO DE SENESCENCIA VEGETAL	8
II.2.1. Factores que causan senescencia	11
II.2.2. Aspectos celulares y del metabolismo durante la senescencia	12
II.2.3. Importancia fisiológica y ecológica de la senescencia	14
II.3. LA EXPRESIÓN GENÉTICA DURANTE LA SENESCENCIA	15
II.3.1. Localización celular de los genes del programa de senescencia	17
II.3.2. Regulación de los genes del programa de senescencia	18
II.3.3. Los inhibidores de la expresión genética	19
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1. OBJETIVO GENERAL	22
IV.1.1. Objetivos particulares	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
V.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y PROCEDENCIA	23
V.2. ESTABLECIMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS	23

V.3. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES ÓPTIMAS	24
V.4. FASE EXPERIMENTAL Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS	24
V.4.1. Extracción y determinación del contenido de clorofila total	25
V.4.2. Extracción y determinación del contenido de proteínas solubles	25
V.4.3. Aislamiento y determinación de la viabilidad de cloroplastos	26
V.5. EFECTO DE LA LUZ SOBRE EL CONTENIDO DE CLOROFILA	27
V.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
<u>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	29
VI.1. CONCENTRACIONES ÓPTIMAS	29
VI.2. SIGNOS VISIBLES DEL PROCESO DE SENESCENCIA	30
VI.3. CONDICIONES DE LUZ Y TEMPERATURA DURANTE LOS EXPERIMENTOS	32
VI.4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS EN LA FASE EXPERIMENTAL	33
VI.4.1. Determinación del contenido de clorofila total	33
VI.4.2. Determinación del contenido de proteínas solubles	36
VI.4.3. Determinación de la viabilidad de cloroplastos	38
VI.4.4. Implicaciones del efecto de los inhibidores de la expresión genética	40
VI.4.5. Efecto de la luz sobre el contenido de clorofila	43
<u>VII. CONCLUSIONES</u>	46
<u>VIII. LITERATURA CITADA</u>	47
<u>APÉNDICE A</u>	54
<u>APÉNDICE B</u>	55



ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

1. Condiciones de luz y temperatura prevalecientes durante la fase experimental.....	33
2. Análisis de varianza de los datos resultantes de la determinación de clorofila total durante la fase experimental.....	35
3. Análisis de varianza de los datos resultantes de la determinación de proteínas solubles durante la fase experimental.....	36
4. Análisis de varianza de los datos resultantes de la determinación de la viabilidad de cloroplastos a partir de la reacción de Hill durante la fase experimental.....	39
5. Comparación entre los distintos parámetros utilizados para evaluar la senescencia en segmentos de pitayo.....	43

FIGURAS

1. Aspecto de una rama de <i>Stenocereus queretaroensis</i> en la que se aprecia su fruto que es la pitaya.....	3
2. Regiones donde se comercializa <i>Stenocereus</i> spp. en México.....	4
3. Comparación fenológica del crecimiento reproductivo y vegetativo en pitayo (<i>Stenocereus queretaroensis</i>) y durazno (<i>Prunus perisca</i>).....	7
4. Rama de pitayo en proceso de senescencia, unas semanas después de haber sido transplantada.....	10
5. Clases de genes relacionados con la senescencia vegetal.....	16
6. Estructura química de la cicloheximida, inhibidor de ribosomas 80S; del cloramfenicol, inhibidor de ribosomas 70S; y de la actinomicina-D, inhibidor de la síntesis de ARN nuclear.....	19
7. Efecto de la dosis de CH, CMP y ACT sobre el contenido de clorofila total en segmentos de pitayo al cuarto día de inducido el proceso de senescencia.....	29

8. Efecto de distintos inhibidores de la expresión genética sobre los signos visibles del proceso de senescencia en segmentos de pitayo.....	31
9. Efecto de distintos inhibidores de la expresión genética sobre el contenido de clorofila total en segmentos de pitayo en proceso de senescencia.....	34
10. Efecto de distintos inhibidores de la expresión genética sobre el contenido de proteínas solubles en segmentos de pitayo en proceso de senescencia.....	37
11. Efecto de distintos inhibidores de la expresión genética sobre la viabilidad de cloroplastos aislados de segmentos de pitayo en proceso de senescencia, determinada según los mmoles de O ₂ liberado.....	39
12. Efecto de la CH sobre la viabilidad de cloroplastos aislados en proceso de senescencia, determinada a partir de la prueba histoquímica del lugol y la reacción de Hill.....	41
13. Efecto de la CH sobre el contenido de clorofila total en segmentos de pitayo en proceso de senescencia bajo condiciones de luz y de obscuridad durante ocho días.....	44

I. INTRODUCCIÓN

El pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) es una cactácea columnar nativa de las regiones subtropicales de México donde ha sido domesticada, llegando a constituirse como un cultivo importante para la agricultura de subsistencia en dichas regiones (Pimienta-Barrios y Nobel, 1994; Pimienta *et al.*, 1995). Debido a que prospera en ambientes áridos, el pitayo ha tenido que desarrollar una serie de modificaciones estructurales y estrategias fenológicas y fisiológicas que le han permitido adaptarse a las condiciones ambientales de estas zonas. Entre las principales adaptaciones se encuentran su cutícula gruesa, densidad baja de estomas, xilema altamente especializado, bajas tasas fotosintéticas, metabolismo ácido crasuláceo (CAM), su peculiar metabolismo de carbohidratos solubles y estrategias que involucran aspectos del desarrollo tales como crecimiento vegetativo lento y un crecimiento reproductivo asincrónico (Pimienta-Barrios y Nobel, 1995; Pimienta *et al.*, 1995). Actualmente, como respuesta a la baja productividad y problemas de desertificación que presentan las regiones áridas y semiáridas de México y del mundo, ha despertado un interés particular el potencial que presentan esta especie nativa adaptada a dichas regiones (Nobel, 1994).

Sin embargo, uno de los problemas que suelen presentarse durante el manejo del pitayo, es la senescencia de las ramas durante el establecimiento de una plantación, la cual se debe a la herida que se causa al momento en que éstas son separadas de la planta madre (Pimienta, comunicación personal¹). El fenómeno de senescencia es una parte integral del desarrollo de cualquier organismo vegetal, y se caracteriza por una secuencia de eventos bioquímicos y fisiológicos organizados y programados que comprende la etapa final del desarrollo, es decir, desde el estado maduro hasta la muerte (Smart, 1994). Este proceso es de suma importancia en las plantas, es por ello que se han realizado numerosos estudios al respecto (Beevers, 1976; Thimann, 1980; Thomas y Stoddart, 1980; Smart, 1994), sin embargo, éstos se han realizado siempre en especies vegetales de interés comercial con metabolismo fotosintético C-3 y C-4, dejándose a un lado el estudio de la senescencia en plantas con metabolismo CAM.

¹ Dr. Eulogio Pimienta Barrios. Departamento de Ecología, División de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de Guadalajara (CUCBA).

Como cualquier proceso integral de desarrollo, la senescencia se encuentra sujeta a un control genético directo, es decir, existen genes que regulan su manifestación (Smart, 1994). Para comprender el fenómeno de senescencia de manera global en la planta de nuestro interés, es necesario conocer las bases de la expresión genética durante el mismo, como se ha hecho en el caso de otras plantas en las que se han logrado avances sustanciales como son la identificación y el aislamiento de algunos de los genes involucrados en dicho proceso (Smart, 1994; Buchanan-Wollaston, 1994). Con el fin de conocer la localización celular de los genes que constituyen el programa de senescencia y los niveles en que su expresión es regulada en las plantas, se han utilizado diversos métodos bioquímicos, entre los que destaca el uso de inhibidores de la expresión genética, dado que éstos son sustancias que bloquean el flujo de la información en puntos específicos, retardando algunos de ellos la manifestación del síndrome (Martin y Thimman, 1972; Yu y Kao, 1981; Pjon, 1981; Cuello *et al.*, 1984; Park y Thimman, 1990).

Este trabajo se desarrolló con el fin de contribuir al conocimiento de la regulación genética de los procesos involucrados en el desarrollo del pitayo. La información obtenida sobre el fenómeno de senescencia en esta especie ayudará a desarrollar estrategias para el manejo del material vegetativo, particularmente en el evento de reproducción asexual.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1. Descripción e importancia de la especie

Stenocereus queretaroensis (Webber) Buxbaum, conocida con el nombre vulgar de "pitayo de Querétaro", es una cactácea arborescente que puede alcanzar hasta 8 m de altura, con un tronco bien definido y numerosas ramas (Figura 1). A esta forma característica debe su nombre el género (del latín *cereus*, cirio) y otros relacionados (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). Los tallos cilíndricos generalmente presentan ocho costillas prominentes y en la madurez muestran un diámetro de 13 a 18 cm. Las flores, que crecen a partir de la mitad más alta de la rama en las areolas, son de 10 a 14 cm de largo y rojas con un interior blanquecino. Los frutos muestran una gran variabilidad, ya que pueden ser de globosos a ovoides, de 6 a 8 cm de largo, con colores que van del amarillo al rojo y maduran en su mayoría durante los meses de mayo y junio, mientras que las semillas son numerosas, pequeñas, negras y frágiles (Pimienta y Tomas, 1994).



Figura 1. Aspecto de una rama de *Stenocereus queretaroensis* en la que se aprecia su fruto que es la pitaya (tomado de Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

De acuerdo con la clasificación taxonómica propuesta por Buxbaum (1962), *Stenocereus queretaroensis* pertenece a la subtribu Stenocereinae, tribu Pachycereae, dentro de la subfamilia Cactoidea, familia Cactaceae. Las cactáceas pertenecen a la orden de las Cariophyllales. El género *Stenocereus* cuenta con 24 especies distribuidas desde el sureste de los Estados Unidos hasta Venezuela y Perú. Las especies cultivadas más importantes son *Stenocereus queretaroensis*, *S. grisseus*, *S. stellatus* y *S. fricii*, en ese orden (Pimienta-Barrios y Nobel, 1994). En México, éstas se distribuyen en los ambientes semiáridos subtropicales en las vertientes del Pacífico y del Golfo de México (Figura 2).



Figura 2. Regiones donde se comercializa *Stenocereus* spp. en México. Las zonas rayadas muestran las regiones donde son nativas las especies y se cosecha el fruto de manera tradicional, mientras que las sombreadas corresponden a las localidades en las cuales se lleva a cabo una producción comercial (adaptado de Pimienta-Barrios y Nobel, 1994).

II.1.1. Descripción de las zonas áridas y semiáridas

Las regiones áridas y semiáridas ocupan una tercera parte de la masa terrestre y proporcionan alimento a una quinta parte de la población mundial. En dichas zonas, la extrema variabilidad en la precipitación pluvial y la alta tasa de evaporación, hacen



que los recursos acuíferos y la productividad vegetal sean bajos e impredecibles (UCAR, 1991). En estos ambientes el agua es el principal factor ambiental que limita la productividad de las plantas; sin embargo, otras características ambientales como vientos fuertes y secos, cambios bruscos de temperatura durante el día, deficiencias de nutrimentos minerales en el suelo y la presencia de sales y sustancias tóxicas agudizan este problema (Berry *et al.*, 1983). Debido a lo anterior, la principal vegetación que se presenta en las zonas áridas y semiáridas son los matorrales, los cuales están integrados por arbustos que crecen distanciados entre sí, tienen hojas de folios pequeños y con frecuencia son espinosos tanto los tallos como las hojas (Rzedowski, 1983).

Después del nopal (*Opuntia* spp.), el pitayo (*Stenocereus* spp.) se puede considerar como la segunda especie frutal nativa que ha sido domesticada en las zonas áridas de México, ambas han llegado a ser cultivos importantes para la agricultura de subsistencia de estas regiones (Pimienta *et al.*, 1995). En la actualidad, como respuesta a la baja productividad y a los problemas de desertificación que presentan las regiones áridas y semiáridas de México y el mundo, ha despertado un interés particular el potencial que presentan estas y otras especies vegetales nativas de las zonas áridas (Nobel, 1994). Además, un aspecto muy interesante lo constituye el hecho de que las plantaciones cultivadas reciben pocas atenciones, por lo que la producción de frutos se obtiene con la aplicación de bajos niveles de energía antropógena (Salcedo y Arreola, 1991).

II.1.2. Adaptación del pitayo a la aridez

Los organismos vegetales que prosperan en los ambientes semiáridos, como es el caso del pitayo, han desarrollado modificaciones estructurales y estrategias tanto fenológicas como fisiológicas que les han permitido adaptarse a las condiciones ambientales de estas zonas. A continuación se mencionan algunas de ellas:

Adaptaciones anatómicas

En comparación con miembros del subgénero *Opuntia*, el pitayo presenta menor número de modificaciones anatómicas que contribuyen a la adaptación a la aridez (Nobel, 1983a). En ambas especies, al igual que en otras cactáceas, se presenta densidad baja de estomas ($10-40$ estomas m^{-2}) con respecto a plantas C-3 y C-4 (Gibson y Nobel, 1986). La cutícula puede ser considerada gruesa, aunque es menor a la reportada en especies del subgénero *Opuntia* (Ramírez y Pimienta, 1995). Otro

aspecto distintivo de la anatomía del tallo de pitayo es la presencia de tejido de aerénquima localizada en la corteza debajo de la epidermis (Pimienta *et al.*, 1995). No es frecuente encontrar este tejido en especies que crecen en ambientes secos, puesto que dicha estructura anatómica se presenta comúnmente en angiospermas acuáticas, ya que tiene como función principal establecer un sistema de transporte de oxígeno de la atmósfera al sistema radical, facilitando la actividad metabólica de las raíces que se desarrollan bajo condiciones anaeróbicas en suelos anegados (Salisbury y Ross, 1992).

Estrategias fenológicas y que involucran el desarrollo

El comportamiento fenológico del pitayo es poco común, debido a que los crecimientos vegetativo y reproductivo ocurren durante la estación seca y no se traslapan (Figura 3). El crecimiento vegetativo se inicia a finales de verano y continúa durante el otoño; mientras que el reproductivo empieza a mediados del invierno y se prolonga durante la primavera. Este comportamiento contrasta con otras especies frutales como el nopal tunero (*Opuntia* spp.) y algunas plantas caducifolias (p.e. durazno, manzano, ciruelo, etcétera), en que los dos tipos de crecimiento ocurren durante la primavera, por tanto hay un traslape en tiempo (Pimienta, 1990; Ryugo, 1988). Se ha sugerido que con esta estrategia fenológica se reduce la competencia entre las demandas metabólicas vegetativas y reproductivas por fotosintetizados (Sachs y Hackett, 1983), lo que permite regular la distribución de los productos de la fotosíntesis, llegándose a constituir como una estrategia reproductiva que permite a *Stenocereus* optimizar sus recursos bajo las restricciones ambientales en las que se desarrolla.

El crecimiento reproductivo del pitayo es asincrónico, ya que es posible encontrar en una planta al mismo tiempo yemas florales en estadios iniciales de diferenciación, flores en antesis y frutos en desarrollo (Lomeli y Pimienta, 1993). La asincronía reproductiva es considerada como una estrategia ecológica ventajosa (Stephenson, 1981), ya que cuando las condiciones ambientales son adversas solamente una parte de las estructuras reproductivas son afectadas por factores bióticos y abióticos (p.e. temperaturas bajas, daños causados por insectos y depredadores). Aparentemente, los factores que regulan la floración y fructificación en *Stenocereus* contribuyen a lograr la mejor época para que las semillas sean dispersadas al suelo (Primack, 1987).

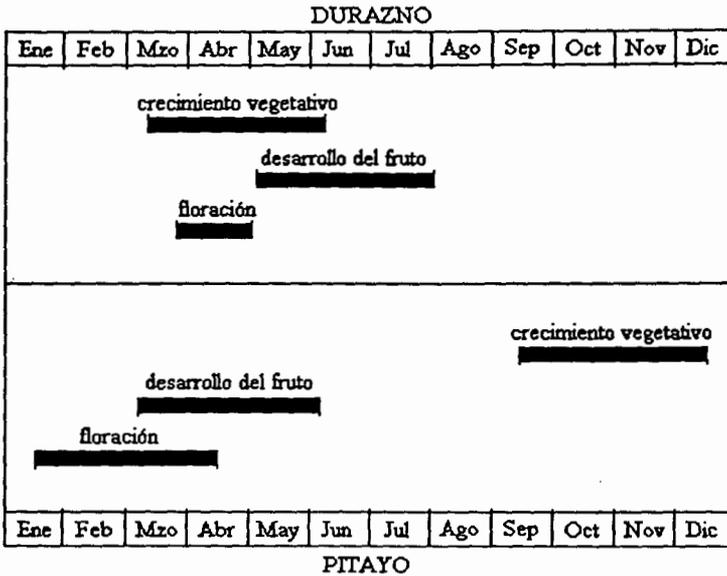


Figura 3. Comparación fenológica del crecimiento reproductivo y vegetativo en pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) y durazno (*Prunus perisca*) (adaptado de Pimienta *et al.*, 1995).

El crecimiento vegetativo primario del tallo de *S. queretaroensis* es lento, al igual que en otras cactáceas columnares que producen frutos comestibles (Nerd *et al.*, 1993). La tasa anual de crecimiento es de $0.027 \text{ cm día}^{-1}$ (Dominguez, 1995), que es significativamente inferior a la registrada en *Opuntia ficus-indica* ($0.567 \text{ cm día}^{-1}$) (Robles, 1994). El crecimiento axial de las ramas o brazos del pitayo empieza a mediados del verano y continua durante el otoño, ya que durante los meses de septiembre, octubre y noviembre es cuando ocurre el 85% del crecimiento anual. Posteriormente, reducen dicha tasa durante el invierno y la primavera. Este tipo de crecimiento es común en las especies silvestres con ciclo de vida largo que crecen en suelos infértiles, ya que se muestran patrones de crecimiento lento, bajas tasas fotosintéticas y de absorción de nutrimentos, que les permiten mantener su crecimiento aún en períodos excepcionalmente secos (Chapin, 1980).

Adaptaciones fisiológicas

El pitayo acumula azúcares solubles en dos periodos del año, durante la primera parte del verano y al inicio del invierno. La primera acumulación ocurre después de

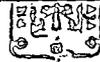
haber terminado el crecimiento reproductivo en la primavera y la segunda ocurre después de haber disminuido el crecimiento vegetativo al final del otoño (Robles, 1994). El inicio del crecimiento vegetativo es precedido por una disminución del contenido de azúcares totales e incremento en los azúcares reductores. El contenido de azúcares totales disminuye de junio a diciembre, mientras que los azúcares reductores presentan un patrón opuesto de variación estacional, ya que éstos se incrementan de junio a diciembre. Los azúcares reductores presentan solamente el 2.5% de los azúcares totales en junio, y en el mes de diciembre su porcentaje se incrementa hasta el 72% (Nobel y Pimienta-Barrios, 1995).

La asimilación neta de CO₂ en *S. queretaroensis* ocurre en la noche, como es característico de la mayoría de las cactáceas que presentan ruta metabólica MAC. La evaluación de la actividad fotosintética del pitayo revela que la tasa neta de asimilación de CO₂ en un período de 24 h es de 190 mmol m⁻² d⁻¹ y muestra una relación positiva directa con la intensidad de radiación fotosintética activa (PAR) que incide sobre la planta. La actividad fotosintética no se afecta considerablemente hasta que las temperaturas nocturnas se reducen a 8 °C o cuando el período de sequía es inferior a 15 días. En este sentido, cabe señalar que períodos de sequía superiores a 50 días reducen hasta el 90% la actividad fotosintética (Nobel y Pimienta-Barrios, 1995). Aunque *S. queretaroensis* se encuentra en condición cultivada, su actividad fotosintética es parecida a la reportada en especies MAC perennes silvestres. Finalmente, se considera que estas bajas tasas fotosintéticas relacionadas con el crecimiento vegetativo lento, son una adaptación a las condiciones ambientales limitantes (Pimienta *et al.*, 1995).

II.2. El proceso de senescencia vegetal

La senescencia es parte integral del desarrollo de cualquier organismo vegetal y se presenta a nivel de tejido, órgano u organismo. Este proceso se caracteriza por una secuencia de eventos bioquímicos y fisiológicos que comprenden la etapa final del desarrollo, desde la madurez hasta la muerte. Durante el fenómeno de senescencia las células se mantienen viables y muestran una estrecha regulación metabólica hasta el final del proceso (Smart, 1994).

El estudio de la senescencia vegetal no es nuevo, y podemos remontarlo a los estudios pioneros efectuados por Leopold desde finales de la década de los cincuenta



(Thimann, 1980; Thomas y Stoddart, 1980; Smart, 1994). Es importante señalar que desde 1957 Medawar (citado por Smart, 1994) hace una importante distinción entre senescencia y envejecimiento, al definir el fenómeno de envejecimiento como todos los cambios que ocurren en un organismo con el tiempo, sin hacer referencia a la muerte como una consecuencia, mientras que la senescencia siempre culmina con la muerte. Entre el gran número de trabajos que se realizan a partir de entonces, destacan los de Osborne en la década de los sesentas sobre el efecto de los reguladores del crecimiento (Thimann, 1980), los de Beevers sobre la bioquímica del proceso (Beevers, 1976) y los de Woolhouse sobre los aspectos celulares y metabólicos (Thomas y Stoddart, 1980). Posteriormente destacan los trabajos de Thimann (Thimann, 1980) y los de Thomas (Thomas y Stoddart, 1980), y más recientemente los de Matile (Smart, 1994).

En los trabajos citados, el fenómeno de senescencia ha sido sujeto de estudio principalmente en especies que representan cultivos comerciales importantes, siendo extensivamente estudiado en plantas con metabolismos C-3 y C-4. Por lo general, se ha dejado a un lado el estudio del proceso tanto en especies silvestres como en plantas MAC. En este grupo de plantas, sobre todo en ciertos tipos de cactáceas (Figura 4), no se presenta senescencia de manera inmediata cuando los órganos vegetativos son separados de la planta, como ocurre en especies C-3 y C-4.

Esta serie de observaciones, llevaron a García (1991) y a Neri-Luna *et al.* (1993) a estudiar los cambios fisiológicos que se producen durante el proceso de senescencia en cladodios jóvenes de nopal (*Opuntia ficus-indica*) bajo condiciones de luz difusa y obscuridad. Los resultados de estos trabajos revelaron que el proceso es más lento si se contrasta con el de otras especies. Además, se encontró a partir de los parámetros registrados, que la senescencia de los órganos vegetativos de esta especie se retarda más en condiciones de luz que de obscuridad.

Muy recientemente, Cuevas *et al.* (1995) estudiaron en segmentos de ramas de *Stenocereus queretaroensis*, el efecto de la aplicación de fitohormonas y de los niveles de almidón sobre el proceso de senescencia en esta planta. Tomando en cuenta la pérdida de polímeros como la clorofila, proteínas y azúcares solubles, se ha observado que el pitayo presenta tasas de senescencia mayores que las del nopal, y que esta especie es más sensible a los factores físicos como luz y temperatura en las condiciones estudiadas. Asimismo, se ha encontrado que la aplicación de citocininas por una parte, y niveles bajos de almidón por otra, retardan la manifestación del proceso.



Figura 4. Rama de pitayo en proceso de senescencia, tres semanas después de haber sido transplantada.

II.2.1. Factores que causan senescencia

Al nivel de planta completa, se han definido algunos tipos de senescencia: la monocárpica, la secuencial y la otoñal. La senescencia monocárpica parece ocurrir como consecuencia de la reproducción, la secuencial resulta de la competencia por recursos entre los órganos fotosintéticos según su posición, mientras que la senescencia otoñal de los árboles caducifolios se debe a una disminución en el fotoperíodo y la temperatura. Cualquiera que sea el detonante interno o externo, parece ser que los pasos en el control del proceso de senescencia de los órganos fotosintéticos al nivel molecular son los mismos (Smart, 1994).

Entre los factores internos que desencadenan la senescencia en distintos organismos vegetales destacan: a) reproducción, b) competencia por nutrientes, c) sombreado y d) los reguladores del crecimiento. La reproducción influye en gran medida sobre el tiempo de senescencia en las especies que representan cultivos anuales (Thomas y Stoddart, 1980). La competencia por nutrientes ocurre entre los diferentes órganos de las plantas y se conjuga con la pugna por el espacio y la luz, lo que genera una red de comunicación interna que controla las tasas de crecimiento y de senescencia. Las hojas localizadas por debajo del punto de compensación fotosintético son inducidas a senescer debido a la competencia establecida entre los órganos circundantes (Nobel, 1983b).

La interacción entre las diferentes concentraciones de los reguladores del crecimiento propician que éstos participen de forma activa en el control y la expresión del proceso de senescencia. Por ejemplo, la aplicación exógena de citocininas retarda la senescencia de las hojas e incluso puede promover el reverdecimiento de hojas amarillas de muchas especies (Dyer y Osborne, 1971; Clarke, *et al.*, 1994), mientras que las giberelinas pueden inhibir dicho efecto en el caso de las hojas de *Taraxacum* (Fletcher y Osborne, 1966). Por otra parte, las auxinas también presentan cierto efecto, por ejemplo el ácido naftalenacético retarda la senescencia en segmentos de hojas de *Rhoeo* y *Mesembryanthemum* (Sacher, citado por Smart, 1994). Otras fitohormonas como el etileno y el ácido abscísico comúnmente actúan como promotores de este síndrome (Thimann, 1980).

Entre los factores externos que influyen en la senescencia podemos considerar el fotoperíodo (horas de luz en un día), la energía luminosa incidente (cantidad y calidad de luz) y la exposición a temperaturas extremas (Caers *et al.*, 1985). También el agua y

las relaciones minerales pueden participar en el desarrollo de la senescencia, tal es el caso de las aguas salinas que promueven la senescencia en hojas de *Heliantus* y *Nicotiana*, la cual se acompaña por la degradación de proteínas (Salisbury y Ross, 1992). Otro factor importante que hay que tomar en cuenta es el daño físico o el ataque de patógenos que pueden desencadenar el proceso de senescencia acompañado del metabolismo de respuesta a la herida causada (Greenberg *et al.*, 1994).

II.2.2. Aspectos celulares y del metabolismo durante la senescencia

Smart (1994) señala que podemos considerar la senescencia de un órgano fotosintético como su "última voluntad y testamento" mediante los cuales una serie de compuestos en forma de monómeros son transportados al resto de la planta. Por esto, desde el punto de vista metabólico la senescencia se caracteriza por la degradación hidrolítica de pigmentos, polímeros de reserva y estructurales, y se acompaña por un incremento en la actividad respiratoria (Tetley and Thimann, 1974; Choe y Thimann, 1975). Así, el aparato fotosintético es desmantelado, lo que causa su inminente deterioro, y los nutrimentos son exportados a tejidos en desarrollo o a órganos de almacenamiento.

Es razonable asumir que la iniciación de la senescencia ocurre antes de que cualquier síntoma visible como lo es el amarillamiento sea obvio. Se pueden utilizar un amplio rango de parámetros tanto fisiológicos como moleculares para evaluar el proceso y detectar cuando los factores comienzan a alejarse significativamente de la norma en un órgano fotosintético maduro (Smart, 1994).

Senescencia al nivel molecular

El síntoma morfofisiológico más obvio de la senescencia es el cambio en la coloración durante el proceso, y éste se debe tanto a una degradación preferente de clorofilas comparada con la de carotenoides, como a la síntesis de nuevos compuestos sobre todo antocianinas y fenoles (Matile, 1992). El mecanismo de degradación de clorofilas no es muy claro (Hendry *et al.*, 1987), pero se han identificado *in vivo* varios productos de ruptura con un anillo de porfirina intacto, además se sabe que algunos pasos de dicho proceso son dependientes de enzimas clorofilasas y eliminadoras de Mg (Thomas *et al.*, 1989).

El contenido proteico de los tejidos decrece progresivamente durante la senescencia, debido a una disminución general en la síntesis de proteínas y un aumento

en su degradación mediante enzimas proteasas (Martin y Thimann, 1972). Durante el proceso se presentan cambios diferenciales en los índices de degradación y síntesis de las proteínas de cloroplasto, las más estudiadas en este caso. Las actividades relativas y la cantidad de la mayor parte de las enzimas del ciclo de Calvin, que incluye la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco E.C. 4.1.1.39), se disminuye considerablemente durante la senescencia. Existe de hecho, una alta correlación entre el decremento en los niveles de Rubisco, ribulosa 5-fosfato cinasa y clorofila, con la disminución de las tasas fotosintéticas (Crafts-Brandner *et al.*, 1990). La degradación protéica resulta en la formación de altos niveles de aminoácidos, sobre todo glutamina y asparagina que son las formas orgánicas en que la mayor parte del nitrógeno es trasladado en las plantas (Kar y Feierabend, 1984).

Los niveles de ADN nuclear se mantienen relativamente constantes durante la senescencia, mientras que el contenido de ARNr disminuye considerablemente conforme se va desmantelando la maquinaria celular para la síntesis de proteínas (Makrides y Goldthwaite, citado por Smart, 1994). Sin embargo, se considera que hay nueva síntesis de ARN, dado que se han encontrado cambios en los parámetros de los productos de la traducción *in vitro* de RNAm extraídos de tejido senescente en comparación con el tejido verde (Kawakami y Watanabe, 1993).

Los organelos durante la senescencia

El cloroplasto es uno de los sitios donde se manifiesta más tempranamente el catabolismo durante la senescencia del tejido fotosintético (Choe y Thimann, 1974). Se menciona que los cloroplastos senescentes se asemejan a los cromoplastos en cuanto a su composición de pigmentos, aunque los cloroplastos senescentes sólo se desarrollan a partir de cloroplastos maduros, no se pueden dividir y pierden rápidamente su capacidad biosintética y ADN (Thomson y Whatley, 1980), por lo que toda esta serie de diferencias ha llevado a la generación del término *gerontoplasto* (Sitte, 1977). La examinación del gerontoplasto al microscopio electrónico revela un incremento en el número y diámetro de globulos osmofílicos, una pérdida y desorientación de la grana y una dilatación de los tilacoides. Estos cambios estructurales se encuentran asociados tanto a una caída en las tasas fotosintéticas como a la capacidad para el transporte de electrones. Hay evidencias que sugieren que los constituyentes del cloroplasto son degradados *in situ*, sin ser transportados al citosol o a vacuolas para su degradación. Cabe mencionar que la cubierta del cloroplasto se mantiene intacta hasta las últimas etapas de la senescencia (Smart, 1994).

Observaciones efectuadas bajo el microscopio electrónico, han revelado que las mitocondrias parecen permanecer intactas hasta las últimas etapas de la senescencia (Peoples, citado por Smart, 1984). Generalmente se presenta un incremento en las tasas de respiración durante las primeras etapas de la senescencia, atribuyéndose un 30% a la respiración de aminoácidos, una parte menor a la de azúcares solubles y el resto a un desacoplamiento en la respiración de la fosforilación (Teatley y Thimann, 1974). La respiración resulta importante para la removilización de compuestos, ya que la fotosíntesis no puede seguir aportando la energía necesaria para este proceso. A partir de estos resultados se ha sugerido que el hecho de que se mantenga la integridad estructural y funcional de las mitocondrias aporta más evidencias a la concepción de la senescencia como un proceso programado y organizado (Smart, 1994).

Es importante señalar que conforme progresa la senescencia, se presentan considerables cambios en la composición y el estado físico del retículo endoplasmático tanto liso como rugoso. Los fosfolípidos disminuyen de manera coordinada, pero las variaciones en las actividades enzimáticas asociadas a membrana sugieren que éstas no son desmanteladas de manera uniforme. En cuanto al núcleo, se ha observado en el microscopio electrónico que dicha estructura se mantiene intacta hasta etapas avanzadas del proceso (Smart, 1994), y el hecho de que se detecten cambios en las poblaciones de ARNm (Kawakami y Watanabe, 1993) sugiere que el núcleo mantiene su integridad funcional durante la senescencia. Las vacuolas representan un sitio importante de degradación de las proteínas citosólicas, no obstante, el tonoplasto se mantiene intacto hasta las últimas etapas confiriendo turgencia a los órganos durante la mayor parte del proceso de senescencia (Smart, 1994).

II.2.3. Importancia fisiológica y ecológica de la senescencia

Leopold (1978) sugiere que el fenómeno de senescencia vegetal adquiere enorme valor para la sobrevivencia, la evolución y el reciclaje, ya que éste puede ser programado para ocurrir en una etapa del año en la cual el ambiente se esté volviendo limitante como consecuencia de factores como la temperatura, sequía o la competencia con otras plantas. Asimismo, las plantas escapan a los efectos de las adversidades estacionales al atravesar por la senescencia parcial o total en el caso de las especies anuales, dejando estructuras resistentes tales como brotes latentes, frutos o semillas que logran sobrevivir a las condiciones de estrés. Además, este autor postula que otra

función de la senescencia es la de actuar como "catalizador de la adaptabilidad evolutiva".

Leopold (1978), también hace referencia a que la senescencia de los órganos individuales tales como las hojas es una estrategia ventajosa de los vegetales, ya que permite que la mayor parte de los nutrimentos que contienen no se pierdan y sean transportados a otras áreas de la planta, representando un importante ahorro energético para la planta como un todo. Además, sugiere que este proceso puede mejorar la eficiencia de la planta para deshacerse de órganos que ya no son funcionales, como son las hojas sombreadas, y reemplazarlos por otros mejor adaptados a las condiciones prevalecientes.

En estudios básicos de biología vegetal, el proceso de senescencia ha llamado la atención debido a que es fundamental para la diferenciación de tejidos especializados como es el caso de los vasos y traqueidas del xilema (del griego ξυλόω, lignificarse) o las células de la cofia de las raíces (Beevers, 1976). En el caso de la diferenciación de los elementos del xilema, se requiere de la senescencia temprana del citoplasma de ciertas células para la formación de un espacio hueco en las mismas. Junto con esto, se considera que la muerte celular programada está involucrada en el desarrollo de anteras y megagametofitos, así como en la determinación sexual (Chasan, 1994). Además, la respuesta a fitopatógenos que provoca hipersensibilidad puede involucrar también este fenómeno como un sistema de defensa (Greenberg *et al.*, 1994).

II.3. La expresión genética durante la senescencia

La senescencia es una parte integral del desarrollo de cualquier órgano u organismo y se encuentra sujeta, como cualquier proceso de desarrollo, a un control genético directo (Thomas y Stoddart, 1980). Para que ésta se lleve a cabo, se requiere de células viables y de una nueva expresión genética. Además, existen otros grupos de genes cuya expresión puede afectar los patrones de senescencia, y en este sentido se pueden distinguir seis clases de genes (Figura 5) relacionados con la senescencia (Smart, 1994):

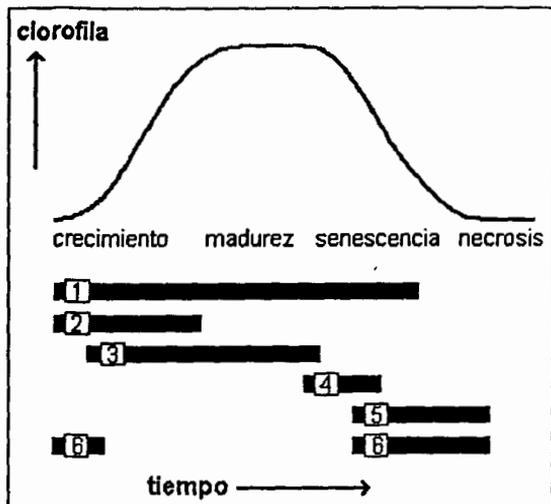


Figura 5. Clases de genes relacionados con la senescencia vegetal (tomado de Smart, 1994).

- 1) Genes constitutivos (expresados) en todo momento y que tienen que ver con las actividades metabólicas fundamentales de la célula madura, p.e. respiración, síntesis de proteínas y ARN.
- 2) Genes de expresión temprana cuyos efectos se hacen aparentes posteriormente, p.e. genes homeóticos, o genes que codifican para ARNm o proteínas que se activan en etapas tardías del desarrollo tales como algunos zimógenos.
- 3) Genes que codifican para componentes del crecimiento o de la asimilación de carbono y contribuyen al inicio de la senescencia al dejar de expresarse, p.e. genes nucleares y de cloroplastos para las enzimas que participan en el ciclo de Calvin o para proteínas tilacoidales.
- 4) Genes reguladores que son expresados al inicio de la senescencia y que controlan su progreso, a los cuales se les denomina *genes causales*.
- 5) Genes que codifican para ARN o proteínas inducidas *de novo* y cuya expresión es promovida durante la senescencia, p.e. enzimas para la degradación de pigmentos. Estos son los *genes consecuenciales*.
- 6) Genes que codifican para la removilización de productos de reserva, p.e. enzimas para la degradación de almidón. Estos genes también son activos en fases tempranas del desarrollo como la germinación.

Aunque existe información sobre la fisiología y la bioquímica de la senescencia, poco se sabe de los eventos moleculares que provocan y están involucrados en el proceso (Buchanan-Wollaston, 1994). Todos los genes relacionados con la senescencia vegetal que se han logrado aislar hasta la fecha parecen ser miembros de las clases 5 y 6, dado que éstos codifican para enzimas que participan en los síntomas de la senescencia, más que en el control de la iniciación del proceso (Smart, 1994).

II.3.1. Localización celular de los genes del programa de senescencia

El desarrollo de cualquier órgano fotosintético resulta de una íntima interacción entre los genomas del núcleo y el de los cloroplastos de las células de dicho órgano. Parte del objetivo de los estudios sobre la expresión genética durante la senescencia se ha basado en la localización celular y la posterior identificación de los genes que constituyen el programa de senescencia en una planta dada.

El genoma de los cloroplastos es sumamente activo durante el ensamblaje del plastidio, pero su expresión en general disminuye cuando se llega al estado maduro del órgano fotosintético, mientras que la del citosol se mantiene activa (Thomas y Stoddart, 1980). De hecho, buena parte del ADN de los cloroplastos ha desaparecido antes de que se inicie la degradación de clorofila en algunas plantas (Sodmergen *et al.*, citado por Smart, 1994). En una serie de experimentos, Yoshida (1961) demostró que la senescencia de cloroplastos de *Elodea* se encuentra bajo control nuclear, ya que las células del mesófilo fueron plasmolizadas y algunos de los protoplastos de estudio se dividieron en dos grupos: con núcleo y anucleados. Después de 8 días sólo senescieron los cloroplastos contenidos en los protoplastos nucleados.

El requerimiento de síntesis de proteínas codificadas en el núcleo para la senescencia es ampliamente aceptado, sin embargo el posible papel de la síntesis de proteínas en los cloroplastos bajo distintas condiciones es incierto (Thomas y Stoddart, 1980). Se ha encontrado un considerable retardo en la manifestación del síndrome de senescencia mediante la aplicación de inhibidores de la síntesis de proteínas en ribosomas 80S, como es el caso de la cicloheximida (CH) (Martin y Thimann, 1972; Thomas, 1976; Yu y Kao, 1981; Cuello *et al.*, 1984; Park y Thimann, 1990) y la 2-(4-metil-2,6-dinitroanilino)-*N*-metilpropionamida (MDMP) (Pjon, 1981), lo que nos habla de la necesidad de nueva expresión de genes nucleares para que se lleve a cabo la senescencia. Sin embargo, la aplicación de CH no parece tener efecto sobre la senescencia en hojas de *Hydrangea macrophylla* (Pjon, 1981) e incluso la acelera en el caso de hojas de tabaco desprendidas (Takegami, 1975).

Aunque el genoma de los cloroplastos maduros parece tener una influencia sobre el proceso de senescencia a través de su inactividad, más que de su expresión, en algunas plantas parece haber cierta síntesis de proteínas en dicho organelo que acelera el proceso. La aplicación de cloramfenicol (CMP), un inhibidor de la síntesis de

proteínas en ribosomas 70S característicos de células procariotes así como de cloroplastos y mitocondrias, retarda la senescencia en algunos casos (Sabater y Rodríguez, 1978; Yu y Kao, 1981; Cuello *et al.*, 1984), pero en otros no parece tener efecto alguno (Peterson y Huffaker, 1975; Cuello *et al.*, 1984; Park y Thimann, 1990).

II.3.2. Regulación de los genes del programa de senescencia

En cuanto a su reacción a distintos inhibidores de la síntesis tanto de ARN como de proteínas, la senescencia vegetal se asemeja a la germinación. La activación de la síntesis de proteínas en la semilla en germinación parece darse por una reincorporación de ARNm latentes en el citoplasma a los ribosomas. Aunque no se tiene evidencia directa de que esto suceda durante la senescencia y además de que recientemente se ha comprobado el requerimiento de nuevos ARNm durante el proceso (Kawakami y Watanabe, 1993), es posible que el ribosoma sea un sitio de control traduccional para algunos de los genes nucleares del programa de senescencia (Thomas y Stoddart, 1980).

Esta conclusión parece ser válida tanto para el genoma nuclear como para el de cloroplasto, al menos deducida de la aparente inefectividad de la actinomicina-D (ACT), inhibidor de la síntesis de ARN nuclear (Thomas y Stoddart, 1977; Yu u Kao, 1981), y de la rifampicina, inhibidor de la transcripción en células procarióticas y, por tanto, en cloroplastos y mitocondrias. Aún permanece la incertidumbre sobre el momento en que en la hoja se expresan los genes del programa de senescencia, además se ha encontrado que estos órganos deben tener cierta madurez para poder senescer (Thomas y Stoddart, 1980). A partir de estas características se ha deducido que existe una discontinuidad temporal entre la transcripción y la expresión de los genes específicos para la senescencia.

El empleo de la cordicepina como inhibidor de la poliadenilación postranscripcional del ARNm, muestra una marcada inhibición de la senescencia al aplicarse en hojas de *Nicotiana* (Takegami y Yoshida, 1975), lo mismo que en hojas de *Lolium* pero a una mayor concentración (Thomas y Stoddart, 1980). Sin embargo, se requiere de más estudios para obtener conclusiones sobre el papel de la poliadenilación del ARNm en la iniciación de la senescencia.

II.3.3. Los inhibidores de la expresión genética

Un inhibidor de la expresión genética es cualquier sustancia que interactúa a nivel molecular con la maquinaria celular encargada de llevar a cabo la síntesis de ARN, su modificación postranscripcional o la síntesis de proteínas (Lewin, 1994). Los inhibidores utilizados en este trabajo se muestran en la Figura 6.

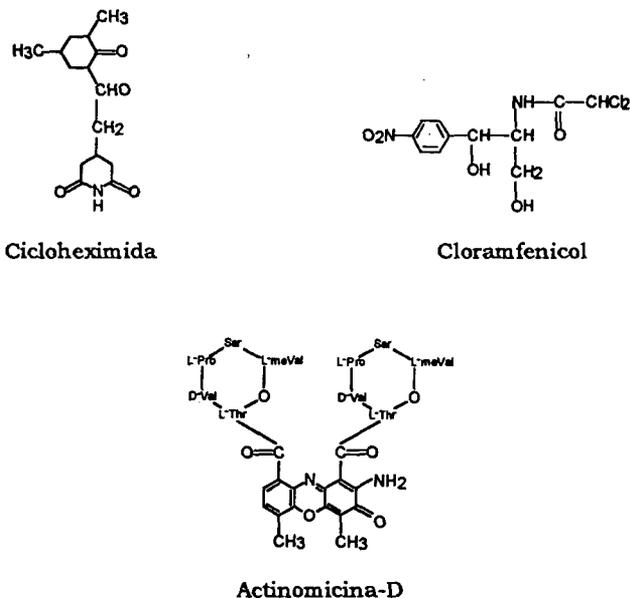


Figura 6. Estructura química de la cicloheximida, inhibidor de ribosomas 80S; del cloramfenicol, inhibidor de ribosomas 70S; y de la actinomicina-D, inhibidor de la síntesis de ARN nuclear. Sarcosina (Sar) es *N*-metilglicina, meVal representa metilvalina.

Cicloheximida

En la década de los sesenta los únicos inhibidores de la síntesis de proteínas en eucariotes que se conocían eran la puomicina, el fluoruro de sodio y la cicloheximida. Posteriormente, se han identificado toda una serie de sustancias citotóxicas y toxinas con el mismo efecto, aunque con distintos mecanismos. Existen inhibidores de la iniciación, traslocación y terminación de la cadena. La CH es un inhibidor de la traslocación, actúa específicamente en ribosomas 80S, y comparte sus propiedades biológicas con los antibióticos glutaramídicos (Grollman y Huang, 1976). Lin *et al.* (1966) proponen que CH inhibe tanto la iniciación como la elongación de la cadena

peptídica, aunque se ha observado que el poderoso efecto a altas concentraciones se debe a una acción sobre la traslocación. CH parece actuar específicamente sobre el factor de elongación EF-II (Grollman y Huang, 1976).

Los cloroplastos, mitocondrias y otras estructuras con ribosomas 70S como lo son las células procarióticas no son sensitivos a la inhibición por CH. Por esto, la posibilidad de inhibir selectivamente la síntesis de proteínas nucleares o de organelos en las células vegetales ha permitido estudiar los sitios de síntesis de proteínas en estas células (Hooper, 1976).

Cloramfenicol

El CMP es un inhibidor de la actividad peptidiltransferasa de los ribosomas 70S de células procariotes, junto con otros antibióticos como la anisomicina y la puromicina. Éstos impiden la función del ribosoma al unirse al centro activo donde suele llevarse a cabo la formación del enlace peptídico (Ballesta y Lazaro, 1990).

Existen cuatro estereoisómeros de CMP. De ellos, sólo el isómero *D-treo* es efectivo para la inhibición de la síntesis de proteínas en ribosomas 70S característicos de cloroplastos (Ellis, 1969). El hecho de que este efecto también se observe en células procarióticas así como en mitocondrias, es otra de las evidencias a la teoría endosimbiótica del origen de la célula eucariote (Margulis, 1993).

Actinomicina-D

La elongación de las cadenas de ARN puede ser inhibida en eucariotes por este antibiótico. La porción plana de esta molécula (Figura 6) se inserta en la doble hélice del ADN en los apareamientos sucesivos $G \equiv C$, deformando de esta manera al ADN. Esta alteración local impide el movimiento de la ARN polimerasa a través del molde que está transcribiendo (Lewin, 1994). Dado que ACT inhibe la elongación del ARN tanto en células intactas como en extractos celulares, ha resultado sumamente útil para la identificación de los procesos que dependen de la síntesis de ARN.

La acridina es una sustancia que inhibe la síntesis de ARN de una manera similar, dado que presenta la misma porción plana. La α -amanitina, que actúa de manera distinta, es un potente inhibidor específico para la síntesis de ARNm ya que se une a la ARN polimerasa II de las células eucariotes (Lewin, 1994).

III. HIPÓTESIS

Dado que existen genes involucrados en el proceso de senescencia del pitayo, es de esperarse que una vez inducido el síndrome por herida, la aplicación de distintos inhibidores de la expresión genética revelará la localización celular de dichos genes así como el sitio de regulación de los mismos, según el grado de retardo en la manifestación del proceso.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de distintos inhibidores de la expresión genética sobre la pérdida de clorofila, proteínas y de la viabilidad de cloroplastos durante el proceso de senescencia causada por herida mecánica en segmentos de tallo fotosintético de pitayo en condiciones de laboratorio.

IV.1.1. Objetivos particulares

- 1. Determinar la localización celular de los genes involucrados en el proceso de senescencia del pitayo mediante la aplicación de un inhibidor de la síntesis de proteínas en ribosomas 80S (cicloheximida), y de un inhibidor de ribosomas 70S (cloramfenicol).**
- 2. Determinar el sitio de regulación de los genes nucleares involucrados en la senescencia del pitayo mediante la aplicación de un inhibidor de la síntesis de ARN nuclear (actinomicina-D).**
- 3. Diferenciar el efecto de los factores bioquímicos del de factores físicos como la luz, los cuales provocan la pérdida de algunos polímeros (clorofila y proteínas solubles) durante el proceso de senescencia del pitayo.**

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Material biológico y procedencia

Para cada prueba fue seleccionada una rama de pitayo de 7 a 10 años de edad, la cual fue separada de la planta original. De las ramas utilizadas durante todo el trabajo se obtuvo un peso fresco medio de 6.81 ± 1.55 Kg, una longitud de 107.42 ± 21.66 cm, y un diámetro de 11.24 ± 1.13 cm. Para su elección se tomó como criterio el vigor, representado por las siguientes características: color verde brillante, complexión robusta y sin daños visibles causados por factores bióticos o abióticos adversos.

El material vegetal fue colectado un día antes de cada experimento, entre los meses de julio y noviembre de 1995, en una población silvestre ubicada al oeste de Zacoalco de Torres, Jalisco (subcuenca de Sayula), a los $20^{\circ}13'30''$ latitud Norte y $103^{\circ}35'$ latitud Oeste y 1380 m snm. La subcuenca de Sayula presenta temperaturas promedio extremas moderadas que varían de 8 a 34°C , con un promedio anual de 22°C . El mes de mayo se caracteriza por ser el más cálido del año, justo antes de que se inicie el período de lluvias. La precipitación promedio anual varía de 650-800 mm, ocurriendo principalmente durante el verano (Pimienta-Barrios y Nobel, 1994).

V.2. Establecimiento de los experimentos

En cada experimento, se empleó una rama de pitayo a la que previamente se le retiró las espinas y se lavó con agua corriente y jabón, evitando dañar la epidermis. Posteriormente, se seccionó con un cuchillo en pedazos de una longitud aproximada de 9 cm. Los segmentos (cilindros de 0.5×9 cm) fueron extraídos de la parte interna de la costilla con un sacabocados. De esta manera se obtuvieron muestras constituidas de clorénquima, y cabe señalar que con este paso se indujo el proceso de senescencia en este tejido a partir de la herida. Inmediatamente, se colocaron cinco segmentos por caja de Petri, a las cuales se les añadió 8 mL de una solución compuesta por agua y una concentración predeterminada del inhibidor a evaluar (CH, CMP y ACT). Esto se realizó por duplicado para cada uno de los tratamientos, además del testigo (agua destilada). Por lo tanto, se prepararon ocho cajas (cuatro determinaciones por duplicado) para cada tratamiento. Finalmente, las cajas fueron marcadas, selladas con

cinta adhesiva y colocadas bajo las condiciones de experimentación que se explican más adelante (Sección V.4.). Durante los pasos anteriormente descritos se trabajó en condiciones asépticas en campana de flujo laminar para evitar al máximo la contaminación del tejido de pitayo.

V.3. Determinación de las concentraciones óptimas

Antes de iniciar el trabajo experimental fue necesario llevar a cabo un experimento piloto con la finalidad de conocer las concentraciones óptimas de cada inhibidor a ser utilizadas. Para tal fin, se probaron concentraciones de 10^{-7} a 10^{-3} M para CH (Sigma C-7698) y CMP (Sigma C-0378), y de 10^{-9} a 10^{-6} M para ACT (Sigma A-4262); basadas éstas en los trabajos efectuados por Yu y Kao (1981), Pjon (1981), Cuello *et al.* (1984), y Park y Thimann (1990). Esto permitió la obtención de una curva dosis-respuesta para cada inhibidor. En esta prueba piloto se determinó únicamente el contenido de clorofila total al cuarto día de iniciado el experimento, por ser éste un parámetro sensible, confiable y fácil de emplear para la evaluación del proceso de senescencia en el pitayo (Cuevas *et al.*, 1995).

Con base a los resultados obtenidos en esta prueba, las concentraciones con que se trabajó en los experimentos subsecuentes fueron de 10^{-3} M en el caso de CH, 10^{-4} para CMP y 10^{-7} M en los tratamientos con ACT.

V.4. Fase experimental y pruebas bioquímicas

En cada experimento se dio seguimiento por ocho días al tejido en proceso de senescencia. Durante este tiempo, las cajas de Petri permanecieron bajo una iluminación constante y homogénea registrada cada 6 h con un sensor cuántico LI-COR modelo LI-189. También se registraron dentro de la campana las temperaturas diarias con ayuda de un termómetro de máximas y mínimas (los datos se muestran en el Cuadro 1, Sección VI.3.).

Las evaluaciones visibles y bioquímicas se hicieron cada 48 h desde el inicio del experimento. Después de registrar los cambios visibles que se observaron en cuanto a la coloración y a la consistencia del tejido, se llevó a cabo la determinación bioquímica

de las siguientes variables: a) contenido de clorofila total; b) contenido de proteínas solubles; y c) viabilidad de cloroplastos.

V.4.1. Extracción y determinación del contenido de clorofila total

A 2 g de tejido se le adicionó 8 mL de acetona (80%) fría y se homogeneizó con la ayuda de una varilla de cristal. El homogeneizado se centrifugó a 12 000 g (centrífuga Hermle mod. ZK-380, rotor 220.76-VO1) por 10 min a -4°C. El sobrenadante se colectó en una probeta fría y cubierta con papel aluminio, mientras que al precipitado se le agregó nuevamente 8 mL de acetona (80%) fría, se homogeneizó y centrifugó utilizando la velocidad y el tiempo previamente mencionados. Se colectó el sobrenadante en la misma probeta y se tomó el volumen final (Castelfranco, 1977). De la muestra, se tomó por triplicado una alícuota (4 mL) con la cual se midió la absorbencia a 645 y 663 nm contra un blanco de acetona en un espectrofotómetro (Sequoia Turner mod. 340). Con las lecturas obtenidas se calculó el contenido de clorofila total empleando la fórmula desarrollada por Bruinsma (1963)

$$\text{Clorofila total} = 8.02 (A_{663\text{nm}}) + 20.2 (A_{645\text{nm}}) = \mu\text{g/mL}$$

Posteriormente, se calculó los μg de clorofila total por gramo de peso fresco.

V.4.2. Extracción y determinación del contenido de proteínas solubles

Para la extracción de proteínas se utilizó el método descrito por Choe y Thimann (1975), con algunas modificaciones. Al final del proceso de extracción de clorofila, se obtuvo un precipitado que se empleó para continuar la extracción de proteína insoluble en acetona. A éste se le agregó 8 mL de ácido tricloroacético (10%) frío y se almacenó a -10°C por una hora. Posteriormente se agitó en un vortex y se centrifugó a 12 000 g (centrífuga Hermle mod. ZK-380, rotor 220.76-VO1) durante 20 min a -4°C. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le adicionó 3.2 mL de NaOH (1N). Después se colocó la muestra en un baño de María a 80°C por 20 min, se dejó enfriar y posteriormente se midió el volumen final.

Después de filtrar las muestras con el fin de eliminar el mucílago remanente, se estimó el contenido de proteína insoluble en acetona (80%) con el método de Lowry *et al.* (1951). La curva de calibración se realizó con albúmina de suero bovino (ver Apéndice A).

V.4.3. Aislamiento y determinación de la viabilidad de cloroplastos

Los segmentos fueron cortados en trozos pequeños y a 10 g de los mismos se les adicionó 50 mL de medio de aislamiento ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaHPO}_4$ 0.05 M pH 6.8, sacarosa 0.34 M, KCl 0.01 M). El tejido se homogeneizó dos veces en una licuadora doméstica por dos lapsos de 15 seg a máxima velocidad. El homogeneizado se filtró a través de dos capas de manta de cielo. El filtrado se centrifugó a 29 000 g por 20' min a 4°C (centrífuga Beckman mod. J2-21, rotor JA-20.1). Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 25 mL de medio de aislamiento, agitando suavemente con la ayuda de un pincel de pelos de camello. Este homogeneizado se centrifugó a 12 000 g durante 10 in a 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante y los cloroplastos aislados fueron resuspendidos en 10 mL de medio de aislamiento.

Inmediatamente se procedió a la determinación de la integridad de los cloroplastos aislados por medio de la reacción de Hill (ver Apéndice B) y mediante la prueba histoquímica del lugol. Para realizar la evaluación espectrofotométrica de la reacción de Hill, se tomó 2 mL de la suspensión de cloroplastos en una cubeta del espectrofotómetro cubierta con papel aluminio y se les agregó 0.002 g de ácido ascórbico y 1 mL de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) 0.12 mM; esta preparación sirvió como blanco. En una segunda cubeta se adicionó 2 mL de suspensión y 1 mL de DCPIP, sin ácido ascórbico e inmediatamente se leyó la absorbencia a 620 nm y enseguida se iluminó directamente con una lámpara de luz incandescente con una energía luminosa incidente de $192 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A partir de entonces se registró cada 2 min la absorbencia a la misma longitud de onda, hasta que se llevó a cabo una reducción del 80% del DCPIP. Con los datos obtenidos se calcularon los mmoles de DCPIP reducidos por mg de clorofila por hora. Para cuantificar la liberación asociada de oxígeno, se calculó los mmoles de O_2 por mg de clorofila por hora, tomando en consideración que la reducción de dos moles de DCPIP requiere de una molécula de O_2 (Castelfranco, 1977).

En el primer experimento se determinó la integridad de cloroplastos por medio de la prueba de reacción al lugol, con el fin de comparar la efectividad de ambas pruebas. Para esto se tomaron unas gotas de suspensión de cloroplastos, las cuales fueron colocadas en un hematocitómetro, se mezclaron con unas gotas de solución de lugol (I KI), sustancia que reacciona con el almidón contenido en los cloroplastos, y se observaron al microscopio óptico a 400 aumentos. Así, se efectuó el recuento de

cloroplastos con reacción positiva y negativa al lugol en 10 campos ópticos, y se obtuvo el porcentaje de cloroplastos viables.

V.5. Efecto de la luz sobre el contenido de clorofila

Para evaluar el efecto de la luz sobre la pérdida de clorofila durante el proceso de senescencia y contrarrestarlo con el de CH se realizó una prueba durante la fase experimental en la que se trabajó en condiciones de luz y de oscuridad. El experimento se estableció bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, trabajándose con un tratamiento testigo y un tratamiento con CH, pero en este caso la mitad de las cajas fueron cubiertas al inicio del experimento con papel aluminio, siendo ésta la condición de oscuridad.

Al igual que en las pruebas anteriores, se determinó el contenido de clorofila total cada 48 h durante ocho días.

V.6. Análisis estadístico

En el caso de la prueba piloto, se desarrolló para cada una de las curvas dosis-respuesta obtenidas un análisis de correlación y regresión lineal.

En lo que respecta a la fase experimental se empleó un diseño de bloques completamente al azar. Éstos estuvieron conformados por los datos obtenidos con los distintos tratamientos (CH, CMP, ACT y testigo), en los distintos días (0, 2, 4, 6 y 8). Las repeticiones fueron cinco para el testigo, tres para CH y CMP y dos para ACT, en cinco experimentos. Con esto se obtuvieron media y error estándar, los cuales fueron graficados para cada prueba bioquímica considerándose únicamente los bloques significativos. En este sentido, se realizó un análisis de varianza ($p \leq 0.05$), y en los casos en que se encontró una diferencia significativa, se procedió al análisis multifactorial (prueba de Tukey, $p \leq 0.05$).

Los datos de las condiciones de luz y temperatura de cada experimento fueron tabulados, obteniéndose media y desviación estándar, y sometidos a un análisis de varianza ($p \leq 0.05$). Posteriormente, a los datos correspondientes al testigo en cada uno

de los experimentos se realizó un análisis de varianza adicional con el fin de conocer el posible efecto de la variación en las condiciones físicas sobre los resultados observados.

Es importante mencionar que los datos expresados en forma de porcentaje de un valor inicial fueron ajustados mediante una transformación angular ($\text{sen}^{-1}\sqrt{x}$) antes de ser sometidos a los análisis de varianza. El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda de los programas Statgraphics Plus vers. 7.0 y Microcal Origin vers. 3.73.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1. Concentraciones óptimas

La evaluación de las variaciones del contenido de clorofila total en función del tiempo como resultado de la aplicación de diferentes dosis de los tres inhibidores de la expresión genética, cuatro días después de su aplicación y del inicio del proceso de senescencia, revelaron una respuesta positiva directa para CH ($r=0.096$) y CMP ($r=0.91$), con una tasa de cambio de 5.86 y 3.66 respectivamente. No se encontró una relación clara en la aplicación de las diferentes concentraciones de ACT evaluadas (Figura 7).

El tejido tratado con CH conservó mayor cantidad de clorofila que el testigo incluso en el caso de las dosis más bajas, y la recta presentó la tendencia a una mayor conservación del pigmento conforme se incrementó la dosis de inhibidor. Debido a que no se encontró una concentración óptima, se consideró como tal la más alta utilizada (10^{-3} M). Park y Thimann (1990) reportan una concentración óptima de entre 1 y 3×10^{-4} M con el fin de retardar el proceso de pérdida de clorofila durante la senescencia de hojas desprendidas de cebada, mientras que Pjon (1981) encuentra una dosis de 10^{-5} M para maíz, pero trabajando en condiciones de obscuridad.

En el caso de los tratamientos con CMP se observó una caída drástica en el contenido de clorofila con la dosis más alta de inhibidor (10^{-3} M), la cual puede deberse a un efecto tóxico a dicha concentración y/o a un efecto acelerador del proceso de pérdida de clorofila, como sucede en hojas desprendidas de cebada en condiciones de luz tratadas con CMP a concentraciones de 10^{-3} a 10^{-2} M (Cuello *et al.*, 1984). Cabe mencionar que en este caso sí se obtuvo una curva dosis-respuesta, ya que hasta que se atravesó un umbral se presentó un efecto directamente proporcional a la dosis, relación que llegó a un óptimo después del cual se observó una caída drástica (Bradford y Trewavas, 1994). Por tanto, 10^{-4} M es la concentración óptima de CMP, lo cual coincide con los reportes de 3×10^{-4} M para discos de soya en condiciones de luz (Yu y Kao, 1981), y de 10^{-4} M para hojas desprendidas de cebada bajo las mismas condiciones (Cuello *et al.*, 1984; Park y Thimann, 1990).

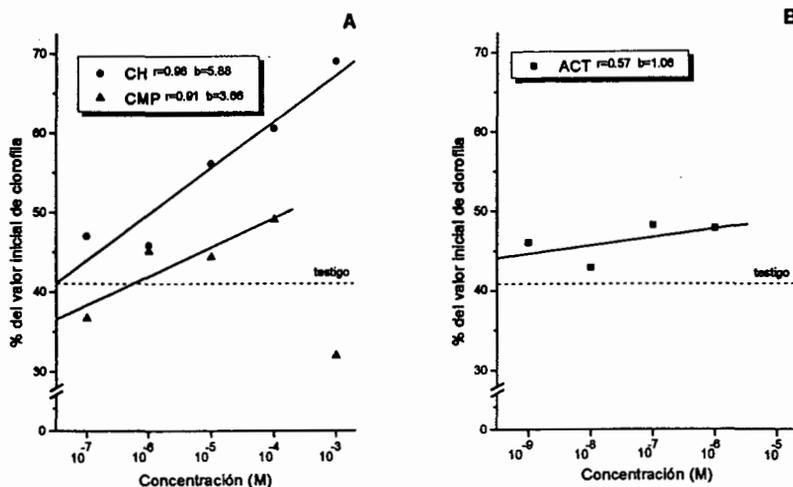


Figura 7. Efecto de la dosis de a) CH, CMP y b) ACT sobre el contenido de clorofila total en segmentos de pitayo al cuarto día de inducido el proceso de senescencia. Se muestran los índices de correlación lineal (r) y las pendientes (b) para la curva resultante de cada inhibidor.

Los resultados obtenidos a partir de las distintas concentraciones de ACT se mantuvieron ligeramente por encima del tratamiento testigo y sin mucha diferencia aparente entre ellos, por lo que se dedujo que la conservación de clorofila no es dependiente de la dosis de este inhibidor. A partir de esta observación se decidió usar la concentración que arrojó el valor más alto de clorofila (10^{-7} M), ya que además es cercano al de 10^{-6} M reportado por Yu y Kao (1981) para discos de soya.

VI.2. Signos visibles del proceso de senescencia

Durante la fase experimental, se observaron y registraron los principales signos visibles de la manifestación del proceso de senescencia, como son los cambios en la coloración y la consistencia del tejido de pitayo.

La observación visual del tratamiento testigo reveló una disminución del color verde en función del tiempo. Además, a partir de las 24-48 h apareció en la superficie de los segmentos un color pardo-rojizo que se fué haciendo cada vez más notorio. El

tejido testigo mantuvo su consistencia hasta el día 6, pero a partir de entonces ésta fue cada vez más blanda. De manera visible, no se encontraron diferencias considerables entre los tratamientos con CMP y ACT con respecto al testigo. En contraste con lo anterior, en el tratamiento con CH la diferencia visual fue obvia desde las 24 h (Figura 8), dado que los segmentos conservaron el color asta el último día del experimento y presentaron en ningún momento la coloración pardo-rojiza. Sin embargo, el tejido tratado con CH adquirió una consistencia cada vez más blanda desde las 48 h.

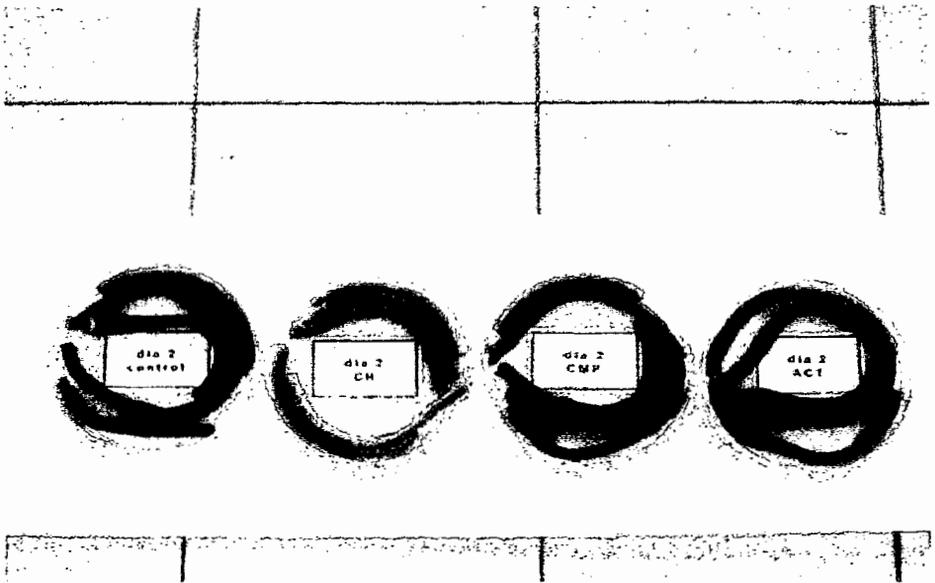


Figura 8. Efecto de distintos inhibidores de la expresión genética sobre los signos visibles del proceso de senescencia en segmentos de pitaya.

La coloración pardo-rojiza presente en la superficie de los segmentos se puede atribuir en parte a la oxidación de compuestos fenólicos como respuesta a la herida causada. Aunque en general se desconoce la función de muchos de estos compuestos aromáticos del metabolismo secundario, generalmente se reconoce su participación como químicos de defensa, y suele considerarse que uno de los primeros fenómenos en respuesta al daño mecánico consiste precisamente en la rápida oxidación de fenoles que se da cuando la separación organizada de estos compuestos y sus oxidasas es alterada (Hendry, 1993). Las observaciones efectuadas en este trabajo nos hablan también de un

importante proceso bioquímico para que esta oxidación y/o remolvilización se lleve a cabo, pues el hecho de que el tejido de pitayo tratado con CH no haya presentado la coloración sugiere la necesidad de la síntesis de una o varias enzimas codificadas en el núcleo para que este tipo de metabolismo de respuesta al daño mecánico se lleve a cabo normalmente. En este sentido habría que considerar la importancia de toda una serie de mensajeros secundarios que podrían estar involucrados en este complejo proceso. Más aún, el hecho de que el tejido tratado con CH haya mostrado una consistencia blanda desde fases iniciales del experimento sugiere la importancia de los compuestos fenólicos durante la respuesta a la herida, ya que en este caso parecen estar ausentes. En este sentido, sabemos que compuestos fenólicos como la suberina y afines son capaces de conferir consistencia dura a tejidos vegetales en el sitio de la herida (Salisbury y Ross, 1992).

El retraso en la pérdida gradual de clorofila, el ablandamiento del tejido de pitayo y la no expresión de colores no atribuidos a pigmentos fotosintéticos en el tejido tratado con CH, nos revela la complejidad del proceso de senescencia causada por herida y al mismo tiempo nos sugiere que esta complejidad metabólica se encuentra en última instancia bajo el control del genoma nuclear.

VI.3. Condiciones de luz y temperatura durante los experimentos

En el Cuadro 1 se presentan los promedios de energía luminosa incidente y de temperaturas máxima y mínima registradas durante los cinco experimentos realizados en este trabajo. Con excepción del primer experimento que se llevó a cabo del 4 al 12 de julio, en el resto de las fechas los valores de energía luminosa se mantuvieron alrededor de un promedio de $31.8 \pm 0.34 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sin embargo, sí se encontraron diferencias notables en la temperatura máxima, con un rango de 7.05 °C, siendo esta variación menor para las temperaturas mínimas (3.53 °C), alrededor de promedios de 26.4 °C y 20.8 °C respectivamente. Para evaluar el efecto de estas diferencias sobre los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se llevó a cabo un análisis de varianza a los datos obtenidos de los tratamientos testigo de cada uno de los cinco experimentos. En este caso no se encontró diferencia entre los datos de ninguna de las pruebas, por lo que se deduce que las diferencias en las condiciones físicas prevaecientes en cada uno

de los experimentos no tuvieron efecto sobre la pérdida de clorofila, proteínas o de la viabilidad de los cloroplastos evaluadas durante los mismos.

Cuadro 1. Condiciones de luz y temperatura prevalecientes durante la fase experimental.

EXPERIMENTO	E. LUMINOSA INCIDENTE ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)			
	\bar{x}	ds (\pm)	MÁXIMA		MÍNIMA	
	\bar{x}	ds (\pm)	\bar{x}	ds (\pm)	\bar{x}	ds (\pm)
I (4-12julio)	34.87 a†	3.62	30.72 a	1.21	21.18 a	1.33
II (7-15sept.)	31.48 b	2.31	27.08 b	1.04	22.63 b	1.02
III (21-29sept.)	31.81 b	2.67	26.61 b	1.34	21.77 ab	1.79
IV (7-15nov.)	32.36 b	1.86	23.82 c	0.86	19.10 c	0.92
V (21-29nov.)	31.61 b	2.51	23.67 c	0.81	19.19 c	1.11

†: medias seguidas de la misma letra no son diferentes, según Tukey ($p \leq 0.05$)

VI.4. Pruebas bioquímicas en la fase experimental. Efecto de los inhibidores de la expresión genética y de la luz

V.4.1. Determinación del contenido de clorofila total

Las observaciones sobre el contenido del pigmento clorofila cada dos días después del inicio de la senescencia y la aplicación de los inhibidores de la expresión genética, apoyan el hecho de que la estabilidad de este pigmento durante la senescencia se encuentra regulada por los genes codificados en el núcleo, ya que con el tratamiento de CH se conservó el pigmento en mayor grado que en cualquiera de los demás. En cuanto al seguimiento del proceso, se observó en todos los tratamientos una fuerte caída en el contenido de clorofila durante las primeras 48 h, seguida de un período de estabilidad del día 2 al 6, y que finalizó en otra caída entre los días 6 y 8. Lo anterior se vió reflejado en el análisis estadístico (Cuadro 2), ya que los días 2,4 y 6 resultaron ser iguales entre sí, mientras que los días 0 y 8 fueron distintos a éstos y entre sí. El análisis de varianza entre los tratamientos evaluados reveló que sólo CH es estadísticamente distinto con respecto a los demás.

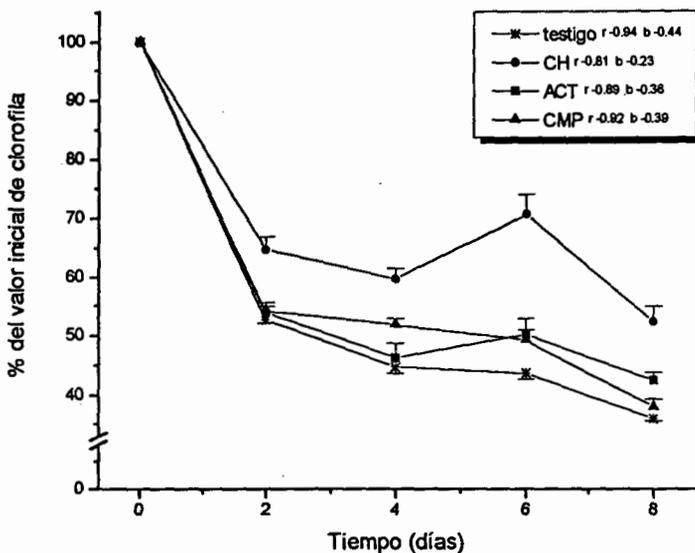


Figura 9. Efecto de distintos inhibidores de la expresión genética sobre el contenido de clorofila total en segmentos de pitayo en proceso de senescencia. Se muestran los índices de correlación semilogarítmica (r) así como los exponentes (b) para cada tratamiento.

Los puntos obtenidos en esta prueba se ajustaron mejor a una curva de correlación semilogarítmica que a una correlación lineal, lo cual es también un reflejo de la fuerte caída inicial en el contenido de clorofila. Esta correlación nos permite observar la tendencia general de cada tratamiento durante los ocho días y comparar los exponentes de regresión (b) (Figura 9). Es importante señalar que a mayor valor negativo del exponente, más pronunciada la caída inicial y mayor la pérdida de clorofila durante los ocho días de prueba.

Cuadro 2. Análisis de varianza de los datos resultantes de la determinación de clorofila total durante la fase experimental.

DÍA	$\mu\text{g ml}^{-1}$	TRATAMIENTO	$\mu\text{g ml}^{-1}$
0	91.99 a†	CH	62.60 a
2	51.76 b	CMP	53.37 b
4	46.28 b	ACT	54.46 b
6	48.28 b	testigo	50.92 b
8	38.38 c		

†: variables seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes, según Tukey ($p \leq 0.05$)

Si comparamos los porcentajes de pérdida de clorofila obtenidos con los resultados de otros trabajos en los que se induce senescencia por herida o corte de hojas, encontramos que en diversas especies vegetales la pérdida de clorofila después de varios días es más o menos similar. En este trabajo se observó una pérdida del 56% en el testigo sobre el valor inicial después de seis días, mientras que después de este lapso hay una pérdida del 66% en discos de hojas de soya (Yu y Kao, 1981), 70% en discos de hojas de maíz, 50% en discos de hojas de *Hydrangea macrophylla* (Pjon, 1981), y 63% en hojas desprendidas de *Elodea* (Makovetski y Goldschmidt, 1976). Sin embargo, es importante hacer notar que en casi todos estos casos la caída en el contenido de clorofila es lineal, de tal suerte que mientras en *S. queretaroensis* se observó una caída del 47% sobre el valor inicial 48 h después del corte, tenemos que la caída en otras especies después de este lapso suele ser menor, 40% en el caso de soya al igual que en *H. macrophylla*, 10% en *Elodea*, y otros casos como brócoli en el que esta caída inicial es del 29% (Clarke *et al.*, 1994), o trigo en el que ésta es solamente del 5% (Shaw *et al.*, 1965). En el caso de maíz sucede algo similar que en pitayo, en donde Pjon (1981) encuentra que a los dos días el pigmento se ha degradado en un 50% del valor inicial. Algo muy distinto sucede en nopal, ya que a los 8 días de desprendidos los cladodios mantienen el 100% del valor inicial de clorofila (García, 1991, Neri-Luna *et al.*, 1993), aunque en estos casos se trabajó con órganos completos.

El proceso es sumamente complejo, dado que no se encuentra una regla general, y las diferencias se pueden atribuir tanto a la condición fisiológica del organismo en particular como a las condiciones de experimentación. Lo que es importante hacer notar es que la clorofila parece ser sumamente lábil en el pitayo durante los primeros días después de la herida, situación que posteriormente se estabiliza. Más aún, esta caída inicial parece estar favorecida por factores físicos como la luz y la temperatura

como lo sugirió Cuevas *et al.* (1995) más que por una degradación enzimática, dado que las diferencias entre el testigo y el tratamiento con CH no son tan notorias sino hasta después de las 48 h. Sin embargo, es importante considerar las condiciones de experimentación en este caso, ya que es de esperarse encontrar resultados distintos si se trabaja con órganos completos, con segmentos compuestos de tejido o directamente con organelos celulares, como se discute más adelante.

V.4.2. Determinación del contenido de proteínas solubles

El tratamiento con CH mostró tener un efecto retardador sobre la pérdida de proteínas insolubles en acetona (Figura 10), lo cual va de acuerdo con la idea que se tiene en otras especies de que se requiere una nueva síntesis de enzimas para llevar a cabo la degradación de proteínas que se da durante la senescencia. Se observó en esta prueba que la degradación de este polímero es mucho menos marcada que la del pigmento clorofila, ya que no se presentó la fuerte caída inicial y la pérdida de proteínas solubles nunca llegó a ser mayor que un 35% del valor inicial, aún en el caso del tratamiento testigo. En este sentido es importante considerar que el efecto de factores físicos no está involucrado directamente en este caso, ya que las proteínas *in vivo* no son susceptibles a la degradación a partir de factores como la luz o la temperatura.

Cuadro 3. Análisis de varianza de los datos resultantes de la determinación de proteínas solubles durante la fase experimental.

DÍA	mg ml ⁻¹	TRATAMIENTO	mg ml ⁻¹
0	1.34 a†	CH	1.33 a
2	1.14 a	CMP	1.04 b
4	1.00 b	ACT	0.92 b
6	0.89 b	testigo	1.07 b
8	1.09 *		

†: variables seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes, según Tukey ($p \leq 0.05$)

*: no significativo

El análisis estadístico entre los distintos días de prueba (Cuadro 3) reveló una diferencia significativa entre el día 0 con los días 4 y 6, lo que nos habla nuevamente de la mayor estabilidad de las proteínas solubles con respecto a la clorofila total ya que este último se observó una diferencia desde el día 2 seguida por un período de

estabilidad en los días 4 y 6. En cuanto al análisis por tratamiento todos los datos fueron significativos, pero solo CH resultó estadísticamente distinto a los demás, mientras que CMP y ACT resultaron iguales al testigo. Los datos se ajustaron a una correlación lineal con pendientes poco pronunciadas.

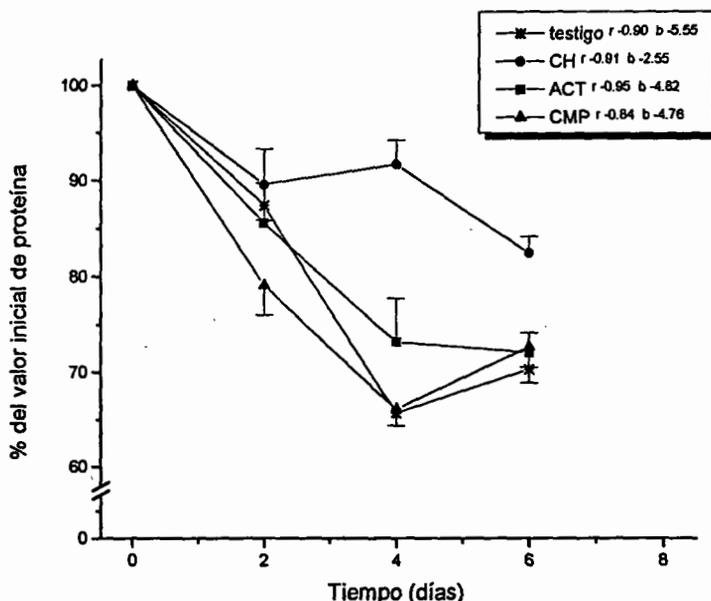


Figura 10. Efecto de distintos inhibidores de la expresión genética sobre el contenido de proteínas solubles en segmentos de pitayo en proceso de senescencia. Se muestran los índices de correlación lineal (r) así como las pendientes (b) para cada tratamiento. Solo se consideran los bloques significativos (ver Cuadro 3).

Llama la atención la estabilidad de las proteínas solubles en *S. queretaroensis* en comparación con otras plantas estudiadas. Mientras que en pitayo se observó en el tratamiento testigo una pérdida del 30% sobre el valor inicial en el contenido de proteínas solubles después de seis días, se tienen reportes de un 62% para discos de soya (Yu y Kao, 1981), y 50% para espinaca (Thimann, 1980), así como maíz (Pjon, 1981). Por otra parte, en el caso de cladodios de nopal, las proteínas se mantienen durante un largo lapso de tiempo, ya que a los 43 días de desprendidos los cladodios, el

tejido mantiene el 100% del su valor inicial de proteínas (García, 1991; Neri-Luna *et al.*, 1993).

Es importante considerar en los órganos fotosintéticos la presencia de enzimas proteasas y del metabolismo del nitrógeno, ya que sus cantidades aumentan durante la senescencia; así como dejar claro que aunque aumente la síntesis de estas enzimas, su peso es mucho menor al de las proteínas estructurales que están degradando por lo que el contenido global de proteínas se ve reducido durante la senescencia. Un gran número de actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo del nitrógeno muestran una tendencia a aumentar, tales como la glutamato deshidrogenasa que aumenta un 400% en hojas de espinaca, aminotransferasas e hidrolasas (Thimann, 1980). Todo esto promueve la degradación de proteínas y la desaminación, lo cual resulta en altos niveles de glutamina y asparagina, las principales formas orgánicas en que el nitrógeno es trasladado en las plantas (Kar y Feierabend, 1984). Cuando los órganos sufren daño mecánico o infección por parásitos, la respiración se ve incrementada con el respectivo metabolismo de carbohidratos. Esto sucede principalmente para proveerse de los precursores de la síntesis de fenoles, ya que la mayor parte de estos compuestos son sintetizados a partir de aminoácidos aromáticos, derivados de intermediarios de la ruta de la glucólisis y de las pentosas-fosfato. En este sentido, un gran número de las enzimas de estas rutas metabólicas muestran un incremento en sus actividades y/o síntesis (Ireland, 1990). Además de éstas, existe toda una serie de proteínas que se expresan específicamente durante el proceso de respuesta a herida y senescencia, aunque poco se sabe sobre su identidad (Buchanan-Wollaston, 1994).

V.4.3. Determinación de la viabilidad de cloroplastos

Los resultados sobre la pérdida de la integridad de la membrana de los cloroplastos determinada a partir de la reacción de Hill se muestra en la Figura 11, así como los índices de correlación lineal de los tratamientos. La caída en este caso fue pronunciada, sobre todo a partir del día 2, ya que en muchos de las pruebas se llegó a la inactividad total de los cloroplastos aislados al octavo día de prueba. El análisis estadístico reveló una diferencia entre todos los días salvo entre las determinaciones de los días 0 y 2, así como 4 y 6, entre los cuales se presentó por tanto una pequeña fase de estabilidad. En cuanto a los tratamientos tenemos nuevamente que CH fue el único distinto a los demás.

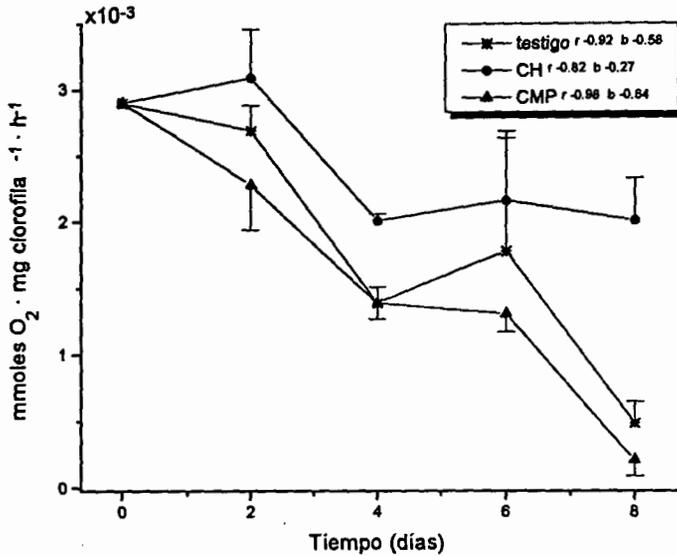


Figura 11. Efecto de distintos inhibidores de la expresión genética sobre la viabilidad de cloroplastos aislados de segmentos de pitayo en proceso de senescencia, determinada según los mmoles de O₂ liberado. Se muestran los índices de correlación lineal (r) así como las pendientes (b) para cada tratamiento. Solo se consideran los bloques significativos (ver Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza de los datos resultantes de la determinación de la viabilidad de cloroplastos a partir de la reacción de Hill durante la fase experimental.

DÍA	mmoles O ₂ mg cl ⁻¹ h ⁻¹	TRATAMIENTO	mmoles O ₂ mg cl ⁻¹ h ⁻¹
0	2.90 a	CH	2.38 a
2	2.74 a	CMP	1.65 b
4	1.62 b	ACT	1.87 *
6	1.56 b	testigo	1.79 b
8	0.78 c		

†: variables seguidas de la misma letra no son estadísticamente diferentes, según Tukey ($p \leq 0.05$)

*: no significativo

Los resultados de esta prueba nos dan una idea del proceso de senescencia de una manera integral, y no sólo a partir de la determinación bioquímica del contenido de un polímero, ya que es importante evaluar el funcionamiento y la viabilidad de un organelo como el cloroplasto que en las plantas es el principal sitio de catabolismo durante la senescencia (Choe y Thimann, 1974). En este sentido, encontramos que avanzado el proceso de senescencia, cuando todavía hay cantidades considerables tanto de clorofila como de proteínas, los cloroplastos muestran poca viabilidad. Sin embargo, resulta interesante el hecho de que los cloroplastos en este tipo de plantas se mantienen funcionales por más tiempo que los de muchas otras especies vegetales con metabolismos C-3 y C-4, sobre todo en cactáceas como el nopal en el cual los cloroplastos se mantienen activos 37 días después de iniciada la senescencia en condiciones de luz (Neri-Luna *et al.*, 1993). Esto es aún más marcado cuando se trata de la senescencia de cloroplastos aislados, ya que mientras en plantas como la avena los cloroplastos aislados pierden su viabilidad después de seis días, en nopal se mantienen activos hasta después de los 40 días de haber sido aislados (Robles, comunicación personal²). El que la senescencia de cloroplastos aislados sea más lenta, sugiere nuevamente la necesidad de enzimas sintetizadas en citoplasma para que ésta se lleve a cabo. El efecto de la CH que retarda la pérdida de integridad de cloroplastos de pitayo, sobre todo a partir de los seis días de senescencia, nos indica algo similar, así como el momento en que las enzimas codificadas en núcleo comienzan a surtir efecto sobre los cloroplastos.

La viabilidad de los cloroplastos aislados se evaluó en uno de los experimentos mediante la prueba histoquímica del lugol. Comparando este resultado con el que arrojó la reacción de Hill en el mismo experimento (Figura 12), se puede proponer a partir de la tendencia general observada en ambos casos que la prueba es efectiva para la determinación de la viabilidad de cloroplastos, al menos para los tratamientos evaluados en este caso, siendo ésta una manera útil, sencilla y práctica de obtener información.

V.4.4. Implicaciones del efecto de los inhibidores de la expresión genética

La CH mostró un efecto retardador de la pérdida de clorofila, proteínas y de la integridad de cloroplastos, por lo que se concluye que ésta retarda el síndrome de

² Biol. Celia Robles Murguía. Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional.

senescencia en los segmentos de pitayo. En ningún caso los tratamientos con CMP y ACT mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo.

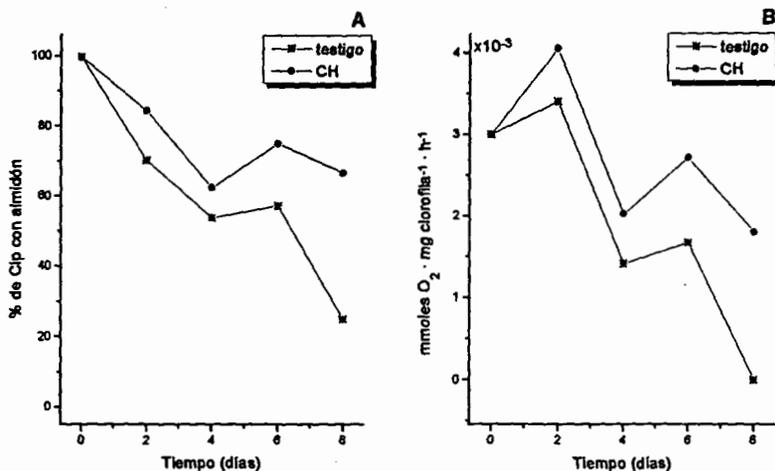


Figura 12. Efecto de la CH sobre la viabilidad de cloroplastos aislados de segmentos de pitayo en proceso de senescencia, determinada a partir de a) la prueba histoquímica del lugol y b) la reacción de Hill. Los datos corresponden al experimento I.

Se puede discutir en contra del uso de inhibidores de la síntesis de proteínas para conocer la localización y sitios de regulación de los genes del programa de senescencia con el argumento de que estos compuestos pueden interferir en sistemas metabólicos y fisiológicos distintos a la síntesis de proteínas. En el caso de los inhibidores de ribosomas 70S, esto se ha resuelto probando un testigo a base del estereoisómero inactivo *L-threo*-CMP (Cuello, *et al.*, 1984). Con CH esto no es posible, ya que no existe un estereoisómero inactivo. Sin embargo, Thomas (1976) ha trabajado con D-MDMP, inhibidor de ribosomas 80S y con su estereoisómero *L*-MDMP inactivo, encontrando que la pérdida de clorofila es retardada utilizando D-MDMP, mientras que el tratamiento con *L*-MDMP no muestra ninguna diferencia con el testigo. Con esto podemos estar seguros de que el efecto de estos compuestos sobre el proceso de senescencia se da por su acción como inhibidores de la síntesis de proteínas y no por su efecto en otros aspectos del metabolismo celular.

Al igual que en otras plantas estudiadas, el efecto de la CH nos habla de la necesidad de una nueva síntesis de proteínas para que se lleve a cabo el metabolismo característico de la senescencia en el pitayo. Aunque la identidad de estos genes es desconocida, podemos deducir que la mayoría se encuentran codificados en núcleo y no en los cloroplastos, debido a los efectos respectivos de CH y CMP. El hecho de que el tratamiento con ACT haya sido inefectivo para retardar el síndrome sugiere mecanismos de control traduccional en la síntesis de estas proteínas. Así, estaríamos hablando de una regulación en los ribosomas y no en el núcleo de buena parte de estos genes, lo que implica la traducción de RNAm latentes en el citoplasma, los cuales tuvieron que haber sido transcritos antes de que se iniciara el proceso de senescencia. Sin embargo, este último punto ha de revisarse, ya que Kawakami y Watanabe (1993), entre otros, han comprobado el requerimiento de nuevos ARNm durante el proceso de senescencia usando técnicas de Northern Blot, por lo que podría ser necesario utilizar otro inhibidor más efectivo y específico para la síntesis de ARNm.

Si comparamos los resultados obtenidos a partir de los distintos parámetros utilizados para evaluar el proceso de senescencia (Cuadro 5), resulta interesante el hecho de que avanzada la senescencia (día 8), cuando todavía se presenta un contenido considerable de clorofila y de proteínas, los cloroplastos del testigo han perdido la mayor parte de su viabilidad. Esto nos muestra que el contenido de los polímeros puede no ser un parámetro suficiente para evaluar el proceso de senescencia. Sin embargo, llama la atención que no sucede lo mismo en el tejido tratado con CH, ya que en este caso los cloroplastos mantienen relativamente su viabilidad. Así pues, el efecto de las enzimas codificadas en núcleo durante la senescencia va más allá de la simple degradación de clorofila y proteínas, por lo que debemos considerar más bien la pérdida de toda una organización estructural y funcional.

Otra cuestión interesante resulta al comparar los valores del contenido de clorofila y el de proteínas (Cuadro 5). Tanto en el tratamiento testigo como en CH llama la atención el hecho de que la pérdida de clorofila es mucho mayor que la de proteínas. Mientras que el pigmento sumamente lábil, puede estar siendo degradado por el efecto de factores físicos como la luz y la temperatura, las proteínas tienen que ser hidrolizadas precisamente por medio de enzimas, muchas de ellas sintetizadas *de novo* durante la senescencia. Aunque en ambos casos la CH muestra un efecto retardador de la pérdida del polímero en cuestión, éste se hace más notorio hasta avanzado el proceso de senescencia. Por lo anterior, podemos pensar que, además de los procesos

bioquímicos característicos durante la senescencia de cualquier organismo vegetal, en los segmentos de pitayo es marcado el efecto de los factores físicos como fue sugerido por Cuevas *et al.* (1995), sobre todo durante las primeras fases del proceso de senescencia.

Cuadro 5. Comparación entre los distintos parámetros utilizados para evaluar la senescencia en segmentos de pitayo. Todos los datos representan el porcentaje de un valor inicial.

DÍA	CONTENIDO DE CLOROFILA		CONTENIDO DE PROTEÍNAS		VIABILIDAD DE CLOROPLASTOS	
	testigo	CH	testigo	CH	testigo	CH
0	100		100		100	
2	52.6	64.6	87.4	89.6	92.9	106.6
4	44.7	59.5	65.7	91.6	47.9	69.3
6	43.6	70.6	70.3	82.4	61.2	74.3
8	35.9	52.4	77.5 *	89.7 *	16.7	69.3

* : no significativo

Con todo lo anterior podemos decir que el retraso en la pérdida de clorofila, proteínas y la viabilidad de cloroplastos, y la no síntesis de compuestos fenólicos como efecto del bloqueo del genoma nuclear, nos ilustra la complejidad bioquímica de este fenómeno, a la que debemos aunar los efectos producidos directamente por factores físicos. Esta complejidad se debe en parte a que en este caso la senescencia es inducida en forma brusca y no por un cambio gradual en el ambiente, como es el caso de la senescencia foliar en plantas caducifolias, por lo que se presentan toda una serie de cambios metabólicos en respuesta a una expresión genética orientada a reparar un daño mecánico, de ahí que se genere una gran complejidad de reacciones en forma permanente.

VI.4.5. Efecto de la luz sobre el contenido de clorofila

Para evaluar el efecto de la luz sobre la pérdida de clorofila durante el proceso de senescencia, y contrastarlo con el de la CH, se realizó la prueba bajo condiciones de luz y de obscuridad cuyos resultados se muestran en la Figura 13. Podemos observar que la pérdida de clorofila se retardó en la condición de obscuridad de manera similar a como sucedió en el tratamiento con CH en condiciones de luz, y que este efecto fue mucho más notorio cuando se trata el tejido con CH en condiciones de obscuridad, demostrándose así que la luz tiene un efecto acelerador del proceso de pérdida de

clorofila bajo las condiciones de estudio. Llama la atención el hecho de que a los dos días de senescencia el contenido de clorofila fué muy similar en los cuatro tratamientos, aunque se observó una mayor cantidad de clorofila en los dos tratamientos en condiciones de obscuridad que en condiciones de luz, independientemente del tratamiento. Posteriormente, el efecto de la CH se hizo notar, sobre todo comparado con el testigo en condiciones de luz.

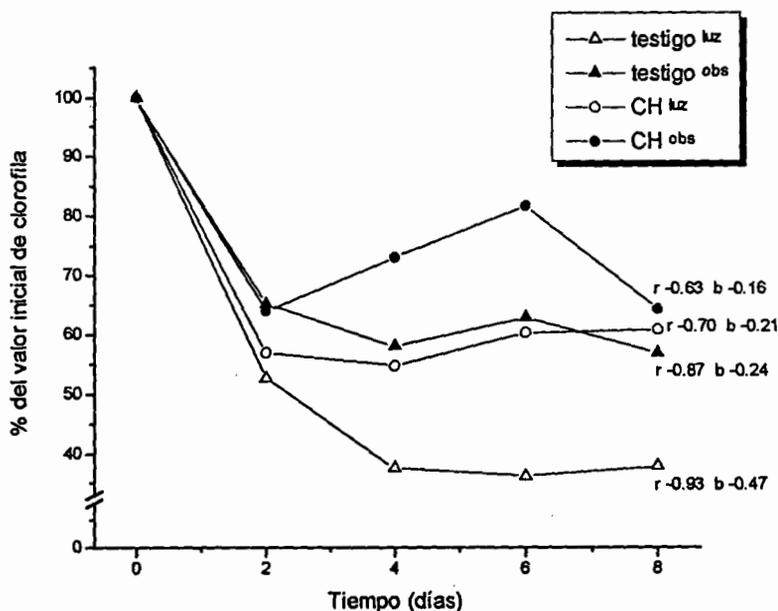


Figura 13. Efecto de la CH sobre el contenido de clorofila total en segmentos de pitayo en proceso de senescencia bajo condiciones de luz y de obscuridad durante ocho días. Se muestran los índices de correlación semilogarítmica (r) así como los exponentes (b) para cada tratamiento.

Las conclusiones acerca de esta prueba no pueden ser definitivas, ya que las condiciones de experimentación pueden estar favoreciendo el marcado efecto de la luz sobre la senescencia al verse favorecida la fotooxidación de la clorofila expuesta en los segmentos de pitayo. Sin embargo, en campo también se ha observado una notoria sensibilidad y un alto índice de senescencia en la planta después de la herida (Pimienta,

comunicación personal³), lo cual puede deberse precisamente al efecto de los factores físicos que prevalecen en los ambientes donde se desarrolla el pitayo. Además, Cuevas *et al.* realizaron pruebas en condiciones de luz y oscuridad determinando además la integridad de cloroplastos, observando una respuesta similar. Pese a todo, es necesario realizar otros estudios en los que se trabaje con órganos completos



³ Dr. Eulogio Pimienta Barrios. Departamento de Ecología, División de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de Guadalajara (CUCBA).

VII. CONCLUSIONES

1. De los inhibidores de la síntesis de proteínas utilizados, la CH resultó efectiva en el retardo de la pérdida tanto de clorofila y proteínas, como de la viabilidad de cloroplastos, mientras que los tratamientos con CMP no mostraron dicho efecto. Con esto se concluye que existe una participación de genes codificados en núcleo, más que de cloroplasto, durante el proceso de senescencia del pitayo.
2. La aplicación de ACT no resultó en el retardo de la manifestación del síndrome de senescencia. Se concluye con esto que el citoplasma (ribosoma) es el principal sitio de regulación de los genes nucleares involucrados en el proceso de senescencia del pitayo.
3. El contenido de clorofila cayó rápidamente, sobre todo durante los primeros días, mientras que las proteínas se mantuvieron estables. Además, la luz aceleró el proceso de pérdida de clorofila, mientras éste se vio retardado en condiciones de obscuridad, con lo que se concluye que los factores físicos como la luz y la temperatura influyen más que los procesos bioquímicos de hidrólisis enzimática durante las primeras fases del proceso de senescencia causada por herida en el pitayo.
4. El pitayo respondió a la herida mecánica mediante la síntesis de pigmentos tanto en el caso del testigo como en los tratamientos con CMP y ACT, pero no en el caso del tratamiento con CH. Se sugiere que el metabolismo de estos compuestos está relacionado en última instancia con el genoma nuclear y que su expresión se encuentra regulada en el citoplasma.
5. Los cloroplastos de pitayo se mantuvieron relativamente viables durante el proceso de senescencia, sobre todo al ser tratados con CH. Los resultados obtenidos en la prueba histoquímica del lugol fueron similares a los obtenidos a partir de la Reacción de Hill al determinar la viabilidad de los cloroplastos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Arnon, I.D. 1991. Photosynthetic electron transport: emergence of a concept, 1949-1945. *Photosyn. Res.* 29:117-131.
- Ballesta, J.P.G. and E. Lazaro. 1990. Peptidyltransferase inhibitors: structure-activity relationship analysis by chemical modification. *In: Hill, W.E., A. Dahlberg, R.A. Garrett, P.B. Moore, D. Schlessinger, and J.R. Warner (eds.). The Ribosome: Structure, Function and Evolution. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 502-510 pp.*
- Beevers, B. 1976. Senescence. *In: Bonner, J. and J.E. Varner (eds.). Plant Biochemistry. Academic Press, London. 771-796 pp.*
- Berry, I.P., P. Ting, and E. Zeiger. 1983. The Biology of Desert Plants: Opportunities and Needs for Basic Research. American Society of Plant Physiologists, Rockville MD. 3-5 pp.
- Bradford, K.J. and A.J. Trewavas. 1994. Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. *Plant Physiol.* 105:1029-1036.
- Bravo-Hollis, H. y L. Sheinvar. 1995. El Interesante Mundo de las Cactáceas. Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 233 p.
- Bruinsma, J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Phytochem. Phytobiol.* 2:241-439.
- Buchanan-Wollaston, V. 1994. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 105:839-846.
- Buxbaum, F. 1962. Das phylogenische system der cactaceae. *In: Die Kakteen. Stuttgart. 1-87 pp.*
- Caers, M., P. Rudelsheim, H.V. Onclenen, and S. Horemans. 1985. Effect of heat stress on photosynthetic activity and chloroplast ultrastructure in correlation with cytokinin concentration in maize seedlings. *Plant. Cell Physiol.* 26:47-52.
- Castelfranco, P. 1977. Laboratory Notes. Advanced course of plant physiology. Botany 206-B, Botany Department, University of California Davis.
- Chapin, S.F. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 11:233-260.
- Chasan, R. 1994. Tracing tracheary element development. *Plant Cell* 6:917-919.

- Choe, H. and K.V. Thimann. 1974. The senescence of isolated chloroplasts. *Planta* 121:201-203.
- * Choe, H. and K.V. Thimann. 1975. The metabolism of oat leaves durin senescence. III. The senescence of isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 55:828-834.
- Clarke, S.F., P.E. Jameson, and C. Downs. 1994. The influence of 6-benzylaminopurine on post-harvest senescence of floral tissues of brocoli (*Brassica oleracea* var *italica*). *Plant Growth Reg.* 14:21-27.
- Crafts-Brandner, S.J., M.E. Salvucci, and D.B. Egli. 1990. Changes in ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase and ribulose 5-biphosphate kinase abundances in photosynthetic capacity during leaf senescence. *Photosyn. Res.* 23:223-230.
- * Cuello, J., M.J. Quiles, and B. Sabater. 1984. Role of protein synthesis and light in the regulation of senescence in detached barley leaves. *Physiol. Plant.* 60:133-138.
- * Cuevas P., F.J., E. Gutiérrez V., A. De Luna F. y C. Neri L. 1995. Efecto de la aplicación de fitohormonas e inhibidores de la expresión nuclear en la senescencia del pitayo (*Stenocereus queretaroensis* (Webber) Buxbaum). In: Pimienta-Barrios, E., C. Neri-Luna, A. Muñoz-Urias, y F.M. Huerta-Martínez (comps.). Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Memorias del 6to Congreso Nacional y 4to Internacional. Universidad de Guadalajara, México. 195-199 pp.
- Domínguez, T.A. Efecto del suministro de agua en el desarrollo y el esfuerzo reproductivo del pitayo *Stenocereus queretaroensis* (Webber) Buxbaum. Tesis profesional. Universidad de Guadalajara. 67 p.
- Dyer, T.A. and D.J. Osborne. 1971. Leaf nucleic acid. II. Metabolism senescence and the effect of kinetin. *Jour. Exp. Bot.* 22:552-560.
- Ellis, R.J. 1969. Chloroplast ribosomes: stereospecificity of inhibition by chloramphenicol. *Science* 163:477-478.
- Fletcher, R.A. and D.J. Osborne. 1966. Gibberellin as a regulator of protein and ribonucleic acid synthesis during senescence in leaf cells of *Taraxacum officinale*. *Can. Jour. Bot.* 44:739-745.
- García, S.M.L. 1991. Evaluación del proceso de senescencia en pencas jóvenes de nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller). Tesis Profesional. Universidad de Guadalajara. 75 p.
- Gibson, C.A. and P.S. Nobel. 1986. The Cactus Primer. Harvard University Press, Cambridge. 286 p.

- Greenberg, J.T., G. Ailan, D.F. Klessig, and F.M. Ausubel. 1994. Programmed cell death in plants: a pathogen triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77:551-563.
- Grollman, A.P. and M.T. Huang. 1976. Inhibitors of protein synthesis in eukaryotes. *In*: McConkey, E.H. (ed.). *Protein Synthesis*. Vol. 2. Marcel Dekker, New York. 125-167 pp.
- Hendry, G.A.F., J.D. Houghton, and S.B. Brown. 1987. The degradation of chlorophyll - a biological enigma. *New phytol.* 107:225-302.
- Hendry, G.A.F. 1993. Plant pigments. *In*: Lea, P.J. and R.C. Leegood. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley & Sons Ltd. 181-196 pp.
- Hind, G. 1988. Conversión de la energía por la fotosíntesis. *In*: Coombs, J., D.O. Hall, S.P. Long, y J.M.O. Scurbuck (eds.). *Técnicas en Fotosíntesis y Bioproduktividad*. Editorial Futura, Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de México. 111-115 pp.
- Hooper, J.K. 1976. Protein synthesis in chloroplasts. *In*: McConkey, E.H. (ed.). *Protein Synthesis*. Vol. 2. Marcel Dekker, New York. 169-248 pp.
- Huzisige, H. and Y. Yamamoto. 1973. Analysis of photosystem II using particle II preparations. Action spectra for Hill activities and fluorescence properties of various treated particle II preparations. *Plant Cell Physiol.* 14:953-963.
- Ireland, R. 1990. Amino acid and ureide biosynthesis. *In*: Dennis, D.T. and D.H. Turpin (eds.). *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Group, UK. 407-433 pp.
- Kar, M. and J. Feierabend. 1984. Changes in the activities of enzymes involved in amino acid metabolism during the senescence of detached wheat leaves. *Physiol. Plant.* 62:39-44.
- Kawakami, N. and A. Watanabe. 1993. Translatable mRNAs for chloroplast-targeted proteins in detached radish cotyledons during senescence in darkness. *Plant Cell Physiol.* 34:697-704.
- Leopold, A.C. 1978. The biological significance of death in plants. *In*: Behnke, J.A., C.E. Finch, and G.B. Moment. *The Biology of Aging*. Plenum Press, New York. 101-114 pp.
- Lewin, B. 1994. *Genes V*. Oxford University Press, New York. 1272 p.



- Lomeli, M.E. y E. Pimienta. 1993. Demografía reproductiva del pitayo *Stenocereus queretaroensis* (Weber) Buxbaum. *Cact. Suc. Mex.* 38:13-19.
- ✧ Lowry, O.H., N.J. Roseborough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 27(2):203-209.
- Makovetski, S. and E.E. Goldschmidt. 1973. A requirement for cytoplasmic protein synthesis during chloroplast senescence in the aquatic plant *Ancharis canadensis*. *Plant Cell Physiol.* 51:793-797.
- Margulis, L. 1993. Symbiosis in Cell Evolution. W.H. Freeman, New York, 2nd ed. 452 p.
- Martin, C. and K.W. Thimman. 1972. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. I. The formation of protease. *Plant Physiol.* 49:64-71.
- Matile, P. 1992. Chloroplast senescence. In: Baker, N. and H. Thomas (eds.). Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants. Elsevier, Amsterdam. 413-440 pp.
- Nerd, A.E., E. Rareh, and Y. Mizrahi. 1993. Adaptation of five columnar species to various conditions in the Neveg Desert of Israel. *Econ. Bot.* 47:304-311.
- Neri-Luna, C., E. Pimienta-Barrios, y C. Robles-Murguía. 1993. Cambios fisiológicos durante el proceso de senescencia en cladodios jóvenes de nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller). *Agrociencia serie Fitociencia* 4:7-18.
- Nobel, P.S. 1983a. Nutrient levels in cacti in relation to nocturnal accumulation and growth. *Amer. J. Bot.* 70:1244-1253.
- Nobel, P.S. 1983b. Biophysical Plant Physiology and Ecology. W.H. Freeman, New York. 306 p.
- ✧ Nobel, P.S. 1994. Remarkable Agaves and Cacti. Oxford University Press, New York. 270 p.
- Nobel, P.S. and E. Pimienta-Barrios. 1995. Monthly stem elongation for *Stenocereus queretaroensis*: relationship to environmental conditions, net CO₂ uptake and seasonal variations in sugar content. *Environ. Exp. Bot.* 35:17-24.
- ✧ Park, J. and K.W. Thimann. 1990. Senescence and stomatal aperture as affected by antibiotics in darkness and light. *Plant Physiol.* 92:696-702.
- Peterson, L.W. and R.C. Huffaker. 1975. Loss of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase and increase in proteolytic activity during senescence of primary barley leaves. *Plant Physiol.* 55:1009-1015.
- Pimienta, E. 1990. El Nopal Tunero. Universidad de Guadalajara, México. 246 p.

- Pimienta-Barrios, E., M.N. Loera-Quezada, y L.O. López-Amezcuca. 1993. Estudio anatómico comparativo en colectas del subgenero *Opuntia*. *Agrociencia* 4:1-18.
- ✧ Pimienta-Barrios, E. and P.S. Nobel. 1994. Pitaya (*Stenocereus* spp., Cactaceae): An ancient and modern fruit crop of Mexico. *Econ. Bot.* 48(1):76-83.
- ✧ Pimienta-Barrios, E. and P.S. Nobel. 1995. Reproductive characteristics of pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) and their relationships with soluble sugars and irrigation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120(6):1082-1086.
- ✧ Pimienta, B.E., C. Robles M., P.S. Nobel, F.M. Huerta M., y A. Domínguez T. 1995. Ecofisiología y productividad de *Stenocereus queretaroensis* (Weber) Buxbaum. In: Pimienta-Barrios, E., C. Neri-Luna, A. Muñoz-Urías, y F.M. Huerta-Martínez (comps.). Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Memorias del 6to Congreso Nacional y 4to Internacional. Universidad de Guadalajara, México. 179-185 pp.
- Pimienta, B.E. y V.M.L. Tomas. 1994. Caracterización en el peso y la composición química del fruto en variedades de pitayo (*Stenocereus queretaroensis*). *Revista Soc. Mex. Cact.* 38:82-88.
- ✧ Pjón, C.J. 1981. Effects of cycloheximide and light on leaf senescence in maize and hydrangea. *Plant Cell Physiol.* 22:847-854.
- Primack, B.R. 1987. Relationships among flowers, fruits and seeds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18:409-430.
- Ramírez, A.J.P. y E. Pimienta B. 1995. Efecto del grado de aridez en la anatomía de cladodios de morfoespecies de nopal (*Opuntia* spp.). In: Pimienta-Barrios, E., C. Neri-Luna, A. Muñoz-Urías, y F.M. Huerta-Martínez (comps.). Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Memorias del 6to Congreso Nacional y 4to Internacional. Universidad de Guadalajara, México. 90-96 pp.
- Robles, M.C. 1994. Estudio anatómico-fisiológico comparativo entre el nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) y el pitayo (*Stenocereus queretaroensis* (Webb.) Buxbaum). Tesis profesional. Universidad de Guadalajara. 44 p.
- Ryugo, K. 1988. Fruit Culture. John Wiley & Sons, New York. 262 p.
- Rzedowski, J. 1983. Vegetación de las zonas áridas y semiáridas de México. In: Molina, J. (ed.). Recursos Naturales de Zonas Áridas de México. Colegio de Postgraduados, Chapingo, Edo. de México. 48-59 pp.

- Sabater, B. and M.T. Rodríguez. 1978. Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase levels. *Physiol. Plant.* 43:274-276.
- Sachs, M.R. and W.P. Hackett. 1983. Source-sink relationships and flowering. In: Meudt, W.J. (ed.). BARC Symposium, Strategies of Plant Reproduction. Allanheld, Osmum, Totowa. 263-272 pp.
- Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1992. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Co. Inc. Belmont, California, 682 p.
- Shaw, M., P.K. Bhattachayra, and W.A. Quick. 1965. Chlorophyll, protein and nucleic acid levels in detached, senescing wheat leaves. *Can. J. Bot.* 43:739-746.
- Sitte, P. 1977. Chromoplasten -bunte Objekte der modernen Zellbiologie. *Biologie in unserer Zeit* 7:65-74.
- *Smart, C.M. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126:419-448.
- Stephenson, G.A. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 12:253-279.
- Takegami, T. 1975. A study on senescence in tobacco leaf disks. V. Inhibition by benzylaminopurine of decrease in protein level. *Plant Cell Physiol.* 16:407-416.
- Takegami, T. and K. Yoshida. 1975. Remarkable retardation of the senescence of tobacco leaf discs by cordycepin, an inhibitor of RNA poliadenilation. *Plant Cell Physiol.* 16:1163-1166.
- *Thimann, V.K. 1980. The senescence of leaves. In: Thimann, V.K. (ed.). Senescence in Plants. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 85-115 pp.
- Thomas, H. 1976. Delayed senescence in leaves treated with the protein synthesis inhibitor MDMP. *Plant Sci. Lett.* 6:369-377.
- Thomas, H. and J.L. Stoddart. 1977. Biochemistry of leaf senescence in grasses. *Ann. Appl. Biol.* 85:461-463.
- *Thomas, H. and J.L. Stoddart. 1980. Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:83-111.
- Thomas, H., K. Bortlik, D. Rentsch, M. Schellenberg, and P. Matile. 1989. Catabolism of chlorophyll *in vivo*: significance of polar chlorophyll catabolites in a non-yellowing senescence mutant of *Festuca pratensis* Huds. *New Phytol.* 11:3-8.

Thomson, W.W. and J.M. Whatley. 1980. Development of nongreen plastids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:375-394.

UCAR. 1991. Arid ecosystem interaction workshop on recommendations of dryland research in the global changes research program. Boulder, Colorado.

Yoshida, K. 1961. Nuclear control of chloroplast activity in *Elodea* leaf cells. *Protoplasma* 54:476-492.

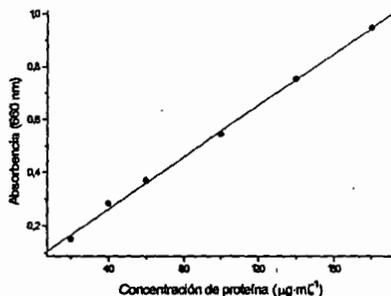
Yu, S.M. and C.H. Kao. 1981. Retardation of leaf senescence by inhibitors of RNA and protein synthesis. *Physiol. Plant.* 52:207-210.

APÉNDICE A

Elaboración de una curva estándar para la determinación de proteínas

Para generar una curva estándar a partir de la cual se determinó el contenido de proteína en una muestra, se preparó una solución stock con una concentración de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ de albúmina de suero bovino, de la cual se tomaron distintas alícuotas con el fin de obtener una serie de concentraciones conocidas de proteína. A estas muestras se realizó la prueba de determinación de proteínas con el método de Lowry, obteniéndose así una serie de puntos que fueron correlacionados de manera lineal, para posteriormente realizar las regresiones de las muestras problema en la recta obtenida.

alícuota (mL)	x	f(x)
	concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Absorbencia (660 nm)
0.025	20	0.150
0.050	40	0.285
0.075	60	0.370
0.125	100	0.544
0.175	140	0.753
0.225	180	0.947



Del análisis de correlación se obtuvo que

$$r = 0.9989$$

$$a = 0.0702$$

$$b = 0.0049$$

donde r es el coeficiente de correlación, a el intercepto con el eje y , y b el intercepto con el eje x . Con esto se generó la ecuación de la recta

$$y = 0.0702 + 0.0049x$$

de la cual se despejó x para efectuar las regresiones con las absorbencias de las muestras problema (y), obteniéndose así la concentración de proteína (x).

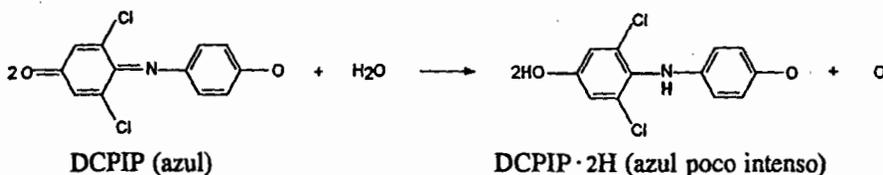
$$x = \frac{y - 0.0702}{0.0049}$$

APÉNDICE B

Fundamentos y cálculos para la reacción de Hill

Los estudios de Hill y colaboradores en 1951 sobre las reacciones parciales durante el proceso fotosintético en fracciones de cloroplastos, produjo información valiosa al descubrirse que el O_2 liberado durante la fotosíntesis podía ser separado de la fijación del CO_2 en la presencia de una sal férrica. Los cloroplastos liberan O_2 en presencia de reactivos que pueden aceptar los electrones que son extraídos del agua durante la fase fotoquímica de la fotosíntesis. A esta actividad del cloroplasto se le conoce como la "Reacción de Hill" (Castelfranco, 1977; Arnon, 1991).

Uno de los colorantes que se utiliza con más frecuencia como aceptor artificial de electrones en la reacción de Hill es el 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP); el empleo de este reactivo se debe a su capacidad de aceptar electrones a partir del PS-IIb. (Huzisige y Yamamoto, 1973). En la reacción que se muestra enseguida, se observa que el DCPIP es azul cuando está oxidado (forma quinona); cuando acepta electrones y se reduce, adquiere un azul menos intenso (forma fenólica) y es en función a esta reacción como se mide colorimétricamente el índice de la reacción de Hill, el cual está asociado directamente con el de producción de O_2 .



La función de la ruta fotosintética de transferencia de energía es convertir la luz a energía química, la cual se almacena como reductor en forma de NADPH y como potencial de fosforilación en ATP. Para remover los electrones del agua y efectuar la reducción del $NADP^+$ a NADPH, así como fosforilar el ADP a ATP, se requiere de la operación en secuencia de dos fotosistemas. Sin embargo, el transporte de electrones normalmente está limitado por la tasa a la cual la fijación de CO_2 regenera $NADP^+$ y ADP. La liberación asociada de O_2 proporciona una medida conveniente de la tasa de transporte de electrones y de asimilación del carbono, y por tanto de la integridad de los cloroplastos (Hind, 1988).

Para calcular los mmoles de DCPIP reducidos durante la reacción de Hill, se realizan los siguientes cálculos (Castelfranco, 1977):

$$A_{620/\text{min}} = \frac{\text{Absorbencia inicial} - \text{Absorbencia final}}{\text{Tiempo que dura la reacción}}$$

$$A = EBC, \text{ de donde } C = A/EB$$

Donde:

A = Absorbencia

E = Coeficiente de extinción del DCPIP

B = Longitud del diámetro de la cubeta del espectrofotómetro

El resultado del cálculo de concentración equivale a 1 L, por lo que éste ha de ajustarse al contenido de la cubeta del espectrofotómetro. Con esto se obtiene al final los mmoles de DCPIP reducidos.

En seguida, se procede a calcular los mmoles de DCPIP reducidos por mg de clorofila por hora.

$$\text{mmoles DCPIP reducidos} \cdot \text{mg Clf}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} = \frac{(1000 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}) (60 \text{min} \cdot \text{h}^{-1})}{\mu\text{g Clf}_T \quad \text{min}}$$

Finalmente, para cuantificar la liberación asociada de oxígeno se calculan los mmoles de O₂ por mg de clorofila por hora, tomando en cuenta que la reducción de dos moles de DCPIP requiere de una molécula de oxígeno

$$\text{mmoles O}_2 \cdot \text{mg Clf}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} = \frac{\text{mmoles DCPIP reducidos} \cdot \text{mg Clf}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}{2}$$