

**Muerte celular inducida por condiciones ambientales adversas en
Calibrachoa parviflora (Petunia)
(Cell death induced by adverse environmental conditions in
Calibrachoa parviflora (petunia))**

Daniela Montes-Berrueta^{1,2}, Sofía Dugarte-Da Silva¹, Nathaly Rojas-Duque¹, Siham Salmen², Lisbeth Berrueta² ✉

¹ Unidad Educativa Madre Teresa Titos, Mérida, Venezuela. ² Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

[ARTICULO ORIGINAL]

Recibido: 27 de Noviembre de 2011. Aceptado: 13 de Diciembre de 2011.

Resumen

Se ha descrito que condiciones ambientales extremas tales como altas temperaturas, luz ultravioleta y el efecto invernadero, alteran la tasa de crecimiento de las plantas. En este trabajo se investigó el efecto agudo de dos condiciones ambientales extremas tales como la limitación de nutrientes y la acidificación del suelo con ácido sulfúrico, un compuesto comúnmente depositado en los suelos como consecuencia de la llamada lluvia ácida, sobre la tasa de muerte y proliferación celular en petunias (*Calibrachoa parviflora*). Para tales efectos, grupos de petunias fueron sometidas a tres condiciones diferentes: grupo A o control, mantenida en condiciones óptimas y de suministro de nutrientes, grupo B en ausencia de nutrientes y de luz natural, y grupo C expuestas a agua acidificada con ácido sulfúrico. En un seguimiento hasta 72 horas, se analizaron muestras de pétalos, hojas y tallos de cada una de las plantas y, posterior a la extracción de los núcleos, estos fueron teñidos con yoduro de propidio, un agente intercalante del ADN, y analizados mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Los resultados muestran que ambas condiciones extremas generan un desbalance en el proceso de muerte/sobrevivencia de las petunias, pero a diferencia de las plantas del grupo B, las plantas del grupo C no incrementaron la tasa de proliferación celular. Estos resultados sugieren que las plantas que crecen en suelos ácidos pierden la capacidad compensatoria ante la señal de estrés que se genera a consecuencia de la exposición aguda a concentraciones tóxicas de ácido sulfúrico.

Palabras clave

Muerte Celular, degradación de cromatina, lluvia ácida, plantas, efecto invernadero.

Abstract

It has been previously reported that extreme environmental conditions such as high temperatures, ultraviolet light and the greenhouse effect, alter the rate of growth in plants. In this study we investigated the acute effect of two extreme environmental conditions: nutrient deprivation and soil acidification with sulfuric acid, a compound commonly deposited in the soil, as a result of acid rain, on the rate of death and cell proliferation in petunias (*Calibrachoa parviflora*). For this purpose, a group of petunias was subjected to three different conditions: group A or control, kept in optimum conditions and nutrient supply, group B in the absence of nutrients and natural light and group C, exposed to water acidified with sulfuric acid. In continuous observations for up to 72 hours, samples from petals, leaves and stems of each plant were analyzed and after nuclei extraction; these were treated with propidium iodide, a DNA intercalator compound, and analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy. The results show that both extreme conditions generate an imbalance in the process of death/survival of petunias, but unlike plants from group B, plants in group C, did not increase their rate of cell proliferation. These results suggest that plants growing in acid soils lose their ability to compensate the stress signal generated as a result of acute exposure to toxic concentrations of sulfuric acid.

Keywords

Cell death, chromatin degradation, acid rain, plants, greenhouse effect.

Introducción

Al igual que todo organismo, las plantas están formadas por células, las cuales representan la unidad más pequeña, estructural y funcional de todos los seres vivos. Las plantas cumplen con procesos muy importantes tanto para su existencia como para el resto de los seres vivos; el más claro ejemplo de esto es la fotosíntesis (1). Al igual que en otros seres vivos, los fenómenos de crecimiento, desarrollo y diferenciación están controlados por un equilibrio entre la sobrevivencia y la muerte celular programada; esta última consiste en una cascada de eventos cuya función es mantener la integridad del organismo al eliminar células defectuosas o envejecidas (2), pero que puede resultar en un blanco de agentes externos que afectan la fisiología del organismo (3). La muerte celular juega un papel importante en procesos como resistencia a condiciones ambientales desfavorables como carencia de nutrientes, temperaturas exageradas, estrés oxidativo entre otros (4).

En el ecosistema donde los organismos vegetales se encuentran y se adaptan para desarrollarse, inciden factores ambientales que pueden alterar consecuentemente su ciclo de vida (5, 6). Entre los factores más notables tenemos el calentamiento global y la lluvia ácida, cuyas características logran afectar enormemente al reino vegetal, bien sea por efecto de la pérdida de nutrientes, como por la acidificación o alteración de los suelos, entre otros (7, 8). Además de los factores ambientales, también se encuentra el efecto causado por la intervención del hombre como factor importante que genera condiciones de peligro para el planeta ya que éste contribuye en gran medida con la contaminación del ambiente y a la alteración del equilibrio climático (9). La muerte celular programada (MCP) es esencial para mantener la homeostasis tisular en muchas formas de vida (7). En las plantas, de igual forma que en los animales, la MCP es el mecanismo por el cual se regulan una serie de procesos fisiológicos; en plantas, estos incluyen la germinación, diferenciación, crecimiento, reproducción y desarrollo de semillas. La MCP también juega un papel importante en otros procesos como la resistencia a condiciones ambientales desfavorables tales como falta de nutrientes, temperaturas extremas, hipoxia, ataque por patógenos y agentes tóxicos (10, 11).

La adaptación de las plantas a las condiciones ambientales adversas permite la manifestación de otros modelos tradicionales de MCP. Por ejemplo,

cuando las raíces carecen de O_2 , como sucede cuando el suelo se inunda, las plantas sobreviven al fomentar la formación del parénquima, un tejido poroso cuya función es facilitar el transporte del O_2 del vástago a las células de la raíz. La formación del parénquima implica la muerte orquestada de células normales, dando lugar a la formación de cavidades que facilitan el intercambio gaseoso mientras se reduce el número de células que requieren O_2 . La hipoxia aumenta la producción del etileno, que induce la formación del parénquima; a nivel celular, este tipo de muerte programada se acompaña de una importante vacuolización (12).

Un efecto ambiental que resulta como consecuencia de la contaminación inducida por la mano del hombre es la llamada lluvia ácida, la cual se forma cuando el agua en el aire (la humedad) se combina con los óxidos de nitrógeno y el dióxido de azufre emitidos por fábricas, centrales eléctricas y vehículos que queman carbón o productos derivados del petróleo. En interacción con el vapor de agua, estos gases forman ácido sulfúrico y ácido nítrico. Finalmente, estas sustancias químicas caen a la tierra acompañando a las precipitaciones, constituyendo así la llamada lluvia ácida (13). Los contaminantes atmosféricos primarios que dan origen a la lluvia ácida pueden recorrer grandes distancias, y ser trasladados por los vientos cientos o miles de kilómetros antes de precipitar en forma de rocío, lluvia, llovizna, granizo, nieve, niebla o neblina. Cuando se produce la precipitación, ésta puede provocar deterioros importantes en el ambiente (14).

Estudios previos han demostrado que en plantas sometidas a condiciones extremas tales como altas temperaturas, luz UV y exceso de agua, se altera la tasa de crecimiento la cual se ve asociada a un incremento en la emisión foliar de metano (CH_4), componente que se correlaciona con el incremento del efecto invernadero (15). Además, el efecto invernadero conduce a la acumulación de diferentes compuestos en la atmósfera que causa secuelas adversas en el ecosistema. La acumulación de CO_2 (otro de los gases acumulados durante el efecto invernadero), en asociación con las altas temperaturas, también tiene un efecto negativo sobre la fotosíntesis una función vital para las plantas (16).

Las plantas además son capaces de responder frente a estos factores ambientales extremos (altas temperaturas) con un incremento de especies reactivas del oxígeno como el óxido nítrico (NO), sustancia que bajo condiciones fisiológicas ejerce funciones de defensa (plantas-microorganismos) y control del metabolismo celular; sin embargo, su

acumulación y producción de manera exagerada y descontrolada pudiera tener efectos deletéreos sobre estos organismos (17), como por ejemplo hacerlas más susceptibles a sufrir muerte celular.

La muerte celular ha sido estudiada en pétalos de *Petunia* híbrida utilizando como parámetros la degradación del ADN y cambios en la morfología nuclear. Estos análisis se han llevado a cabo mediante la tinción del ADN con yoduro de propidio y por citometría de flujo (18).

En este trabajo se evaluaron los efectos de condiciones ambientales adversas como la privación de nutrientes y el depósito ácido sulfúrico (H_2SO_4) en el suelo, en plantas de *petunia* (*C. parviflora*) midiendo señales de muerte y sobrevivencia, utilizando técnicas como la citometría de flujo y la tinción del ADN nuclear con yoduro de propidio.

Metodología

Condiciones de cultivo de las plantas: Se emplearon 3 plantas de *petunia* (*C. parviflora*) por cada subgrupo, cada uno de los cuales posteriormente fue sometido a tres condiciones diferentes: un primer grupo (grupo A) se mantuvo bajo condiciones control con suplemento de nutrientes y exposición a la luz del día, el segundo grupo (grupo B) se mantuvo en la oscuridad y sin nutrientes, y un tercer grupo (grupo C) se mantuvo en un ambiente rico en ácido sulfúrico (2 mM, pH=2,5), el cual fue agregado al agua corriente y aplicado diariamente a las plantas. Las plantas fueron crecidas en condiciones de laboratorio, empleando tierra abonada orgánicamente como sustrato y mantenidas en un rango de temperatura entre 22 y 24 °C durante el día y entre 18 y 20 °C durante la noche; se utilizó iluminación natural con alternancia de ciclos de luz y oscuridad (excepto para el grupo B). Las plantas fueron evaluadas diariamente durante 72 horas (3 días), haciendo observaciones tanto macroscópicas como microscópicas, las cuales fueron anotadas cada 24 horas. Se tomaron muestras de diferentes partes de las plantas (flores, hojas y tallos) a fin de evaluar la muerte celular a través de la degradación del ADN mediante tinción con yoduro de propidio.

Homogeneización del tejido vegetal y purificación de núcleos: Los pétalos, las hojas y los tallos fueron cortados en trozos diminutos para permitir la separación apropiada de los núcleos usando un bisturí en presencia del amortiguador de extracción (45 mM de cloruro de magnesio, 30 mM de citrato de

sodio, 20 mM de MOPS (4-sulfonato de morpholinopropano), 0,1% de Triton X-100, pH 7,0). El extracto obtenido por cada sección de la planta, en el total de las 9 plantas, fue filtrado a través de una malla de nylon para luego ser teñido con yoduro de propidio (10 µg/ml), e incubado durante 30 minutos, protegido de la luz, para luego proceder al análisis mediante citometría de flujo.

Detección de la fragmentación del ADN: Las muestras fueron analizadas a través de un citómetro de flujo FACSCAN, Becton and Dickinson, y se capturaron un total de 10.000 eventos por cada muestra cada 24 horas hasta 72 horas de observación. Para el análisis de los resultados, se establecieron dos ventanas: una correspondiente a los parámetros de tamaño y complejidad de partículas, y el otro para analizar la fluorescencia de las partículas emitida por el yoduro de propidio en el canal FL2, ésta se representó en histogramas y se tomaron como núcleos en degradación (reflejando muerte celular) todas aquellas partículas que se ubicaron detrás del pico G0-G1 en el perfil de ADN en el ciclo celular, y como señal de proliferación el pico ubicado por delante de la fase S, llamado G2/M. Se utilizó el programa CellQuest proporcionado por la casa comercial Becton and Dickinson (San José de California, USA). Adicionalmente, una porción de la muestra se montó en una laminilla portaobjeto, la cual se visualizó y documentó en el microscopio de fluorescencia.

Análisis estadísticos: Los parámetros evaluados se expresaron usando la media \pm desviación estándar (DS). Las diferencias entre los promedios de los grupos estudiados se analizaron usando la prueba t-student calculada con el programa Statgraphic Centurion XV.II. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados

Observaciones macroscópicas: Los tres grupos de plantas fueron evaluadas cada 24 horas durante un periodo de 72 horas, tomándose documentación fotográfica de cada una de estas observaciones. En la figura 1 se puede observar que en el tiempo 0, al inicio de los experimentos, no existen diferencias macroscópicas entre los 3 grupos estudiados. En la figura 2 se evidencia que a las 72 horas de observación, las plantas muestran características distintivas entre los 3 grupos analizados. A saber: el grupo A, o grupo control,

mantuvo las flores, la turgencia en los tejidos, y la coloración característica comparable a la observada al inicio de los experimentos. En el grupo B se observó disminución en el número de flores con discreta opacidad en la coloración de las hojas, sin cambios en la turgencia de las mismas. En contraste, las plantas del grupo C mostraron pérdida de las flores, pérdida de la turgencia y opacidad de hojas y tallos.



Figura 1. Detalles macroscópicos de las plantas de *Calibrachoa parviflora* al inicio del estudio (tiempo 0). Grupo A: Control, Grupo B: Privado de nutrientes y en ausencia de luz natural, y Grupo C: presencia de ácido sulfúrico en el suelo.

Análisis mediante citometría de flujo: Los suspensiones de núcleos obtenidos de cada sección de las plantas: flores, hojas y tallos, por cada grupo analizado (un total de 27 muestras cada 24 horas), fueron analizadas mediante citometría de flujo. En la figura 3a se destaca el proceso de degradación del ADN nuclear en los pétalos de las plantas de los 3 grupos analizados, expresado en cifras porcentuales. Puede observarse que existe una tendencia al incremento en la degradación de los núcleos tanto en las condiciones de carencia de nutrientes (grupo B) como en las sometidas al ácido sulfúrico (grupo C). En la figura 3b se observa la tinción de partículas correspondiente a la fase G2/M del ciclo celular; es decir, a la duplicación del contenido de ADN. Es interesante que puede observarse que en los pétalos

del grupo de plantas sometidas a privación de nutrientes (grupo B) existe un incremento importante en la intensidad de fluorescencia en la fase G2/M, en contraste con lo observado en el grupo C en donde este pico de fluorescencia está ausente y sugiere un impacto importante en la capacidad de crecimiento celular. Estas observaciones se repiten en las hojas (figura 4a, 4b) y en los tallos (figura 5a, 5b). Las figuras 3c, 4c y 5c son imágenes representativas del análisis realizado en las diferentes partes de las plantas entre los 3 grupos analizados. Las mismas se han solapado para efectos de comparación entre grupos y destacadas en colores distintos. En estas figuras se destaca el incremento de la muerte inducida por la exposición al H_2SO_4 , (línea naranja) y la duplicación del ADN compensatoria en las plantas sometidas a privación de nutrientes (línea verde).

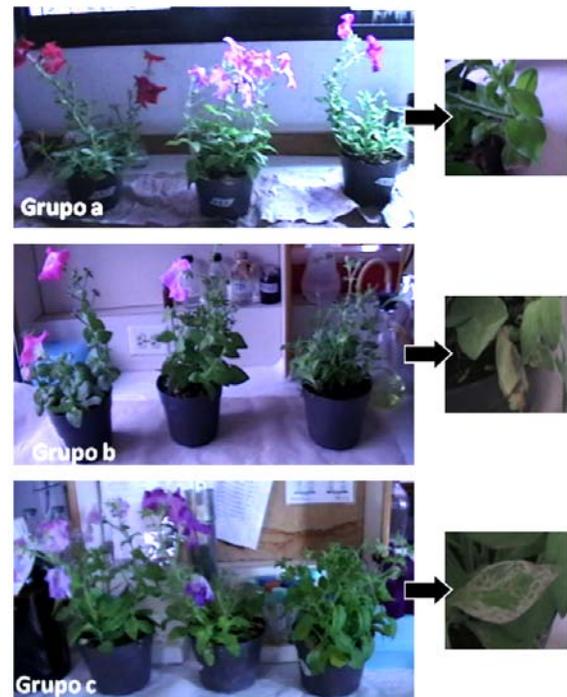


Figura 2. Detalles macroscópicos de las plantas de *Calibrachoa parviflora* después de 72 horas expuestas a las condiciones experimentales. Grupo A: Control, Grupo B: Privado de nutrientes y en ausencia de luz natural, y Grupo C: presencia de ácido sulfúrico en el suelo.

Estos hallazgos fueron además confirmados a través de microscopía de fluorescencia (figura 6), donde se muestra un incremento del brillo de los núcleos teñidos con ioduro de propidio en las plantas del grupo B (figuras 6b, 6e, 6h), en comparación con el grupo A (figuras 6a, 6d, 6g), mientras que en el grupo

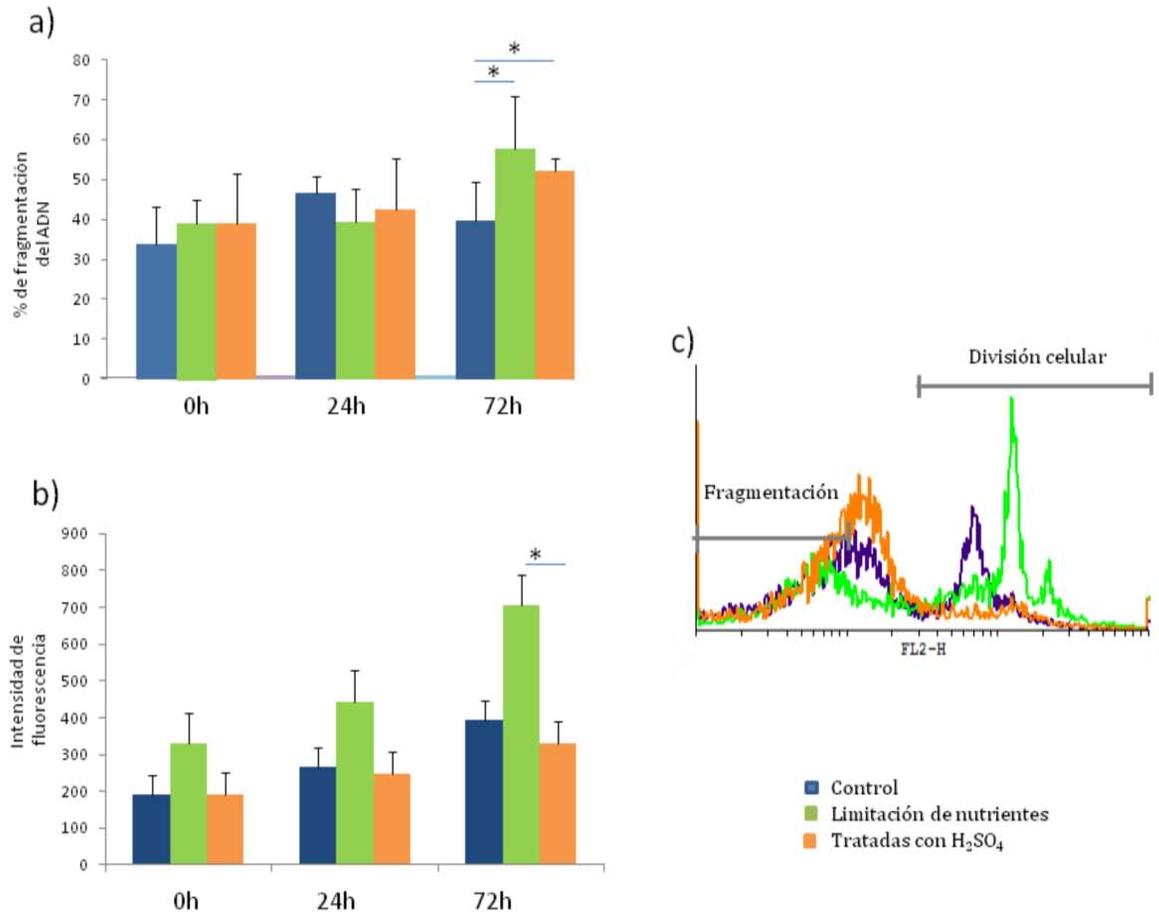


Figura 3. Análisis de la fragmentación del ADN en pétalos de plantas de *Calibrachoa parviflora*. a. Porcentaje de fragmentación del ADN analizado mediante citometría de flujo correspondiente al material genético detrás del pico G1. b. Medición de la duplicación del contenido del ADN a través de la determinación de la intensidad de la fluorescencia en la fase G/2M. c. Solapamiento de histogramas representativos de las tres condiciones, mostrando fragmentación del núcleo celular y división celular en pétalos de plantas de *Calibrachoa parviflora*. * indica diferencias estadísticamente significativas.

C, se evidencia fundamentalmente fragmentación nuclear (figuras 6c, 6f, 6i), característica básica de la muerte celular.

Discusión

Los procesos de muerte y división celular son fundamentales en la fisiología de los seres vivos, y debe existir, tanto en las células animales como en las plantas, un equilibrio entre ambos que permitan el crecimiento, desarrollo y diferenciación de los tejidos (19, 20). En este estudio se han utilizado herramientas como la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia para analizar los efectos que pueden ocasionar condiciones ambientales adversas, tales como la carencia de nutrientes y la acidificación de los suelos, sobre plantas de *C. parviflora*, las cuales han sido previamente estudiadas mediante esta técnica,

para cuantificar el fenómeno de muerte celular programada (21).

Como aspecto más resaltante a destacar es la pérdida del equilibrio entre la muerte y la proliferación celular en aquellas plantas sometidas a condiciones adversas. Así, en el grupo de plantas tratadas con ácido sulfúrico (grupo C) se pudo observar que además de una tendencia a incrementar la degradación de la cromatina en las estructuras analizadas, en particular pétalos y tallos, se observó disminución marcada de la proliferación celular como lo demuestra la reducida duplicación del ADN. Por otro lado, en el grupo B de plantas en oscuridad y sin nutrientes, además de una tendencia a una mayor degradación del ADN en todas las muestras analizadas, se observó de manera muy notoria un incremento en la intensidad de la fluorescencia en el área correspondiente al pico G2/M, lo que se traduce en incremento en la proliferación

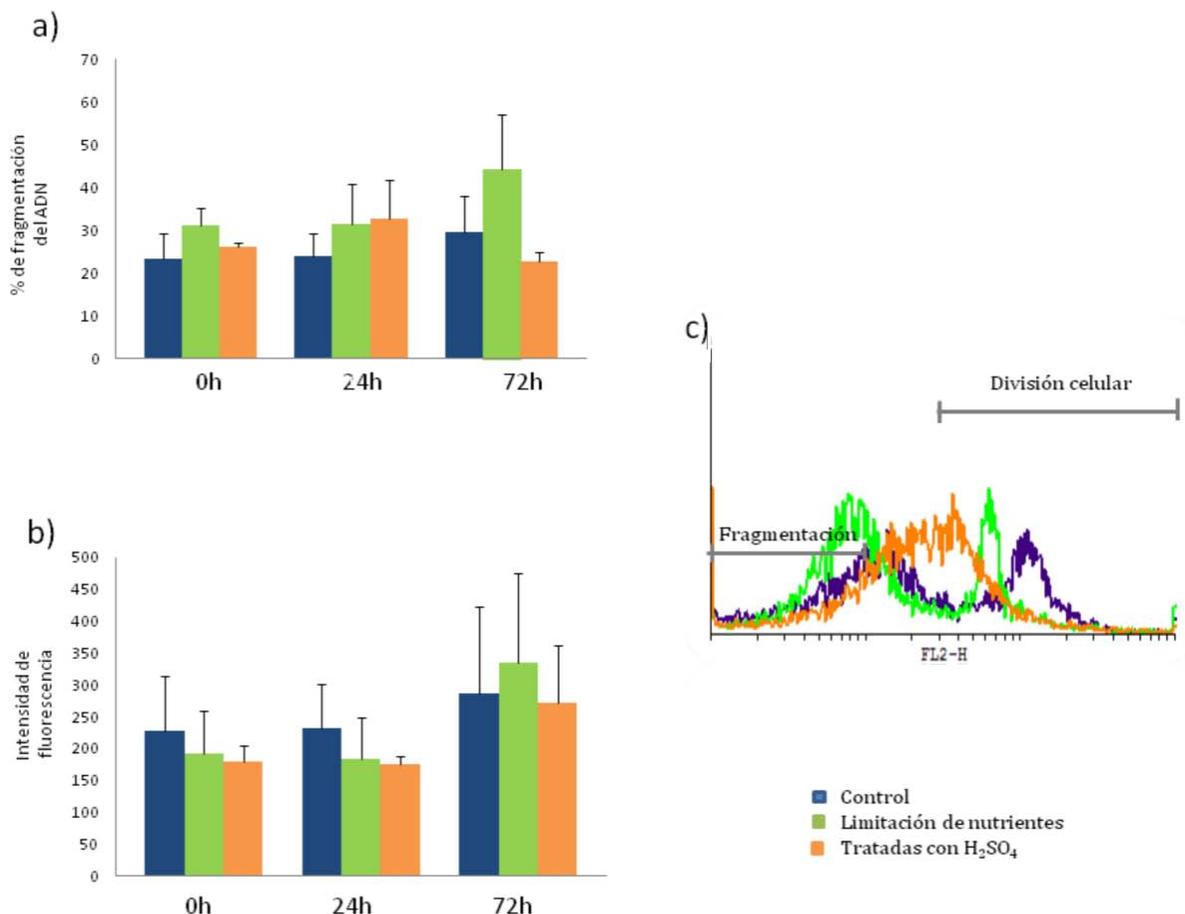


Figura 4. Análisis de la fragmentación del ADN en hojas de plantas de *Calibrachoa parviflora*. a. Porcentaje de fragmentación del ADN analizado mediante citometría de flujo correspondiente al material genético detrás del pico G1. b. Medición de la duplicación del contenido del ADN a través de la determinación de la intensidad de la fluorescencia en la fase G/2M. c. Solapamiento de histogramas representativos de las tres condiciones, mostrando fragmentación del núcleo celular y división celular en hojas de plantas de *Calibrachoa parviflora*. * indica diferencias estadísticamente significativas.

celular. Estos resultados sugieren que mientras que en el grupo B, se pone en marcha un mecanismo compensatorio como lo es la proliferación celular dentro de las 72 horas de observación, en el grupo C con tratamiento ácido del suelo, este mecanismo compensatorio se pierde desde las primeras 24 horas indicando un efecto deletéreo muy prominente y agudo. Estos resultados pudieran extrapolarse a lo que sucede en los suelos y en la vida vegetal expuesta a desechos industriales y productos de combustión, puesto que las concentraciones de ácido sulfúrico utilizadas son las consideradas como tóxicas para vegetales (15, 16, 20).

En este trabajo además se observaron cambios de color y turgencia de los pétalos de las plantas en estudio; cambios que fueron evidenciados fundamentalmente en los pétalos de las plantas sometidas a H₂SO₄. Estos cambios semejan a la

senescencia floral, acelerada en el grupo C. Se ha descrito que estos cambios macroscópicos se asocian a fenómenos bioquímicos que incluyen un aumento en las enzimas hidrolíticas, la degradación de las macromoléculas, y un aumento en la actividad respiratoria (ROS) - eventos que preceden a la muerte celular programada (28) -, asociado con la ruptura de la membrana y la fragmentación del ADN (29); este último fue evidenciado en los pétalos de las petunias tratadas con H₂SO₄. Así, la senescencia de los pétalos es considerada como otra forma de muerte celular programada en las plantas (29).

El proceso de muerte en las plantas puede ser activado por diversos eventos (22). Uno de ellos es producto de la acción de agentes patógenos que pueden inducir la muerte celular programada en los sitios de infección a través de un mecanismo conocido como respuesta hipersensible (HR), la cual le permite a

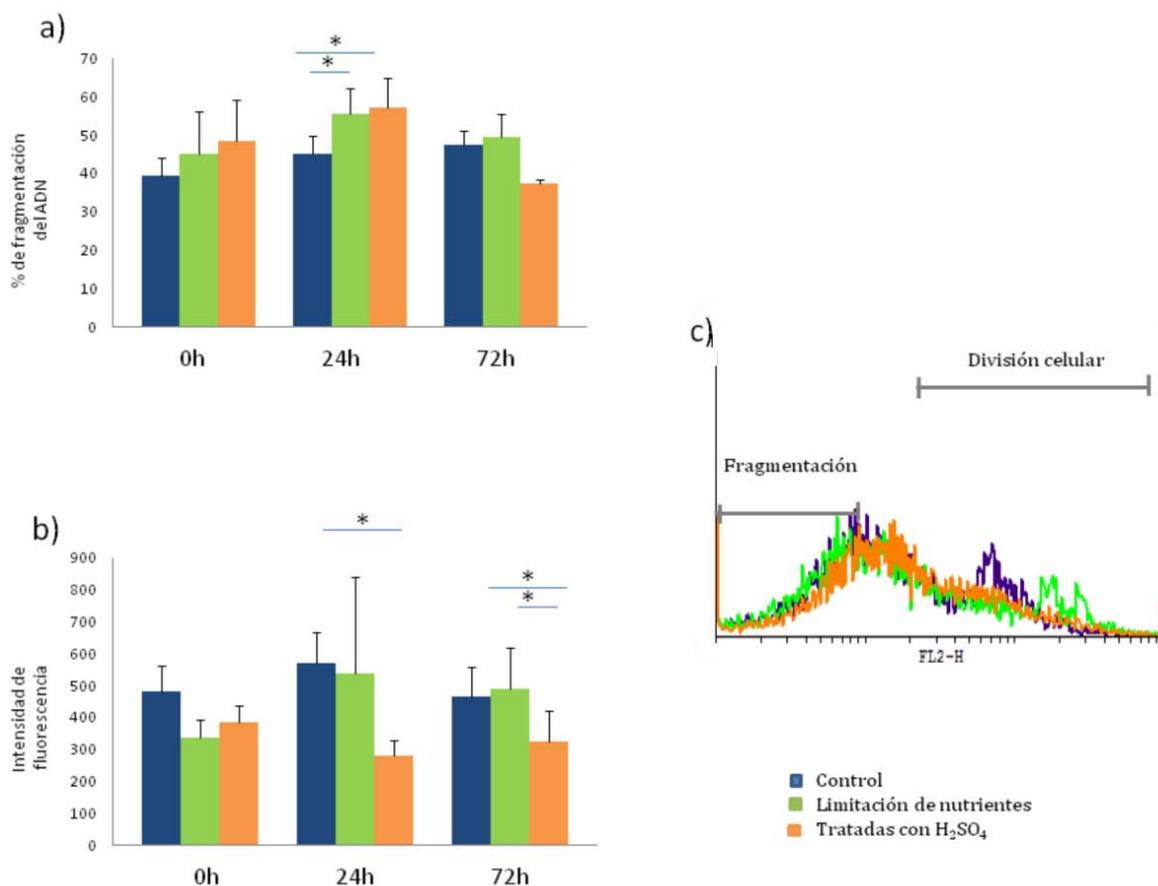


Figura 5. Análisis de la fragmentación del ADN en tallos de plantas de *Calibrachoa parviflora*. a. Porcentaje de fragmentación del ADN analizado mediante citometría de flujo correspondiente al material genético detrás del pico G1. b. Medición de la duplicación del contenido del ADN a través de la determinación de la intensidad de la fluorescencia en la fase G/2M. c. Solapamiento de histogramas representativos de las tres condiciones, mostrando fragmentación del núcleo celular y división celular en tallos de plantas de *Calibrachoa parviflora*. * indica diferencias estadísticamente significativas.

la planta aislar al patógeno, limitando así su dispersión y un daño mayor e incluso la muerte de toda la planta (23). Otra vía de activación de la muerte celular se produce en respuesta a la hipoxia, lo que determina la degradación de ciertas células del parénquima de las raíces (24), o como consecuencia de estrés abiótico (estrés por calor, ozono, etc.) (25, 26). Los contaminantes como el aluminio también han sido implicados en la activación de la muerte celular en las plantas a través de la inducción de la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del daño mitocondrial (27).

Los ROS son producidos en las plantas en respuesta a estímulos de estrés o como resultado de la reducción de O₂ durante procesos metabólicos/fisiológicos. Sin embargo, cuando ocurre un desbalance en su producción, estos son perjudiciales (30) debido a su capacidad para provocar daño oxidativo del ADN, que inevitablemente inducen la muerte celular (4), y en la actualidad son

considerados como mediadores clave de este proceso en plantas.

En base a estos antecedentes, es importante profundizar en los mediadores que se asocian con la muerte celular en los dos modelos utilizados en este estudio: cuando las plantas fueron privadas de nutrientes, a pesar de activarse el proceso de muerte fundamentalmente en los pétalos y tallos, se dispara el proceso de duplicación del ADN a fin de compensar el daño tisular, a diferencia de lo observado en las plantas sometidas al H₂SO₄, donde este evento compensatorio no ocurre.

Finalmente, es importante evaluar el papel de los ROS y de las mitocondrias en los fenómenos acá reportados, además de someter a las plantas a un periodo de observación más extenso a fin de contribuir a comprender con mayor claridad la naturaleza de este fenómeno.

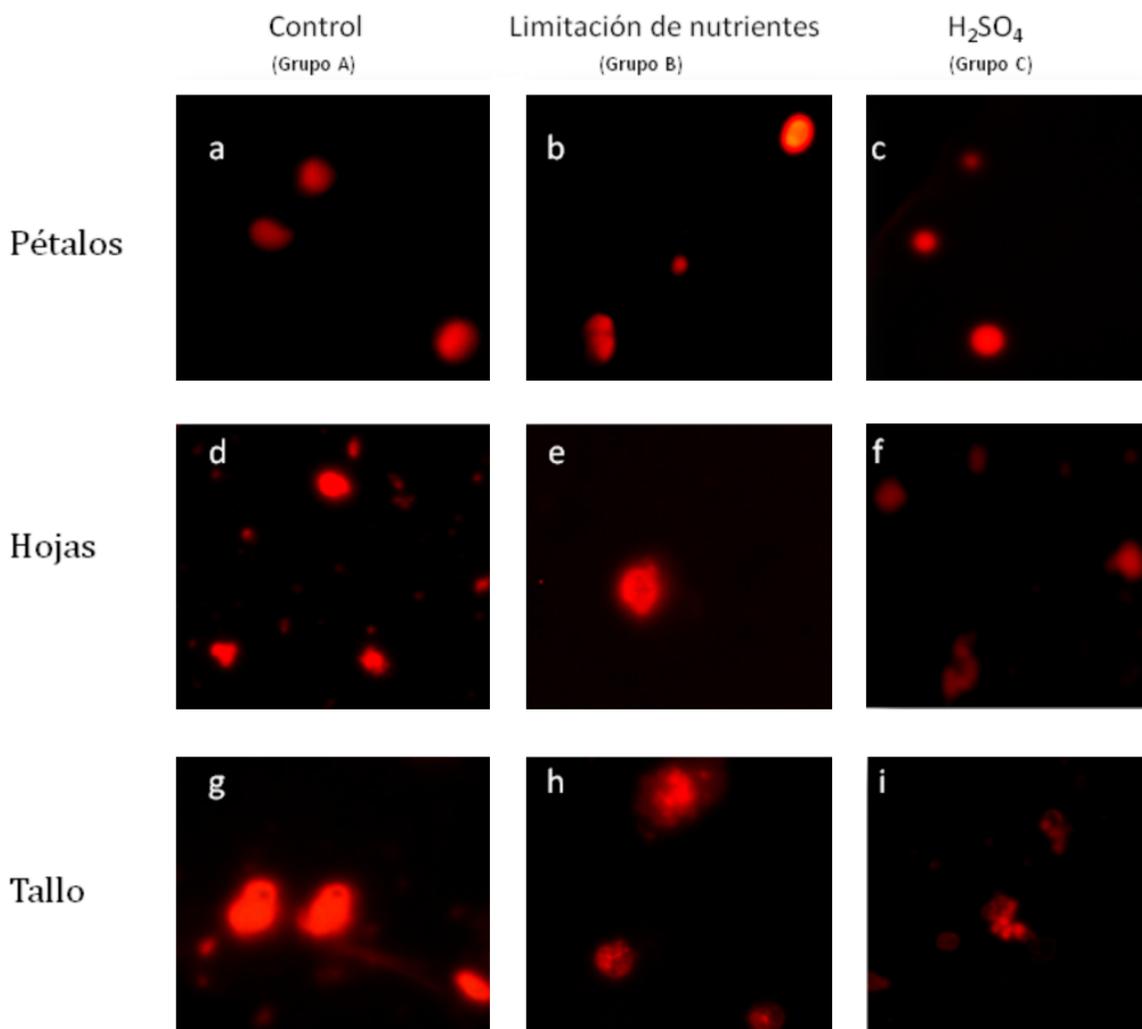


Figura 6. Evaluación por microscopía de fluorescencia de los núcleos purificados de de las plantas *Calibrachoa parviflora*. Figuras 6a, 6d y 6g, corresponden a los núcleos teñidos con ioduro de propidio de los pétalos, hojas y tallos del grupo A. Figuras 6b, 6e y 6h, corresponden a los núcleos teñidos con ioduro de propidio de los pétalos, hojas y tallos del grupo B. Figuras 6c, 6f y 6i, corresponden a los núcleos teñidos con ioduro de propidio de los pétalos, hojas y tallos del grupo C.

Referencias

1. Eveland AL, Jackson DP, Sugars, signalling, and plant development. *J Exp Bot* 2011. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LA, Petersen M, Smertenko A, Taliensky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV, Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ* 2011; 18: 1241-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Vanyushin BF, Bakeeva LE, Zamyatnina VA, Aleksandrushkina NI, Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *Int Rev Cytol* 2004; 233: 135-79. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. De Pinto MC, Locato V, De Gara L, Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant Cell Environ* 2011; 10. 1111: 1365-3040. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Baslam M, Pascual I, Sanchez-Diaz M, Erro J, Garcia-Mina JM, Goicoechea N, Improvement of nutritional quality of greenhouse-grown lettuce by arbuscular mycorrhizal fungi is conditioned by the source of phosphorus nutrition. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 11129-40. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Buck-Sorlin G, de Visser PH, Henke M, Sarlikioti V, van der Heijden GW, Marcelis LF, Vos J, Towards a functional-structural plant model of cut-rose: simulation of light environment, light absorption, photosynthesis and

- interference with the plant structure. *Ann Bot* 2011; 108: 1121-34. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Qu GQ, Liu X, Zhang YL, Yao D, Ma QM, Yang MY, Zhu WH, Yu S, Luo YB, Evidence for programmed cell death and activation of speciWc caspase-like enzymes in the tomato fruit heat stress response. *Planta* 2009; 229: 1269–79. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 8. Wagstaff C, Bramke I, Breeze E, Thornber S, Harrison E, Thomas B, Buchanan-Wollaston V, Stead T, Rogers H, A specific group of genes respond to cold dehydration stress in cut *Alstroemeria* flowers whereas ambient dehydration stress accelerates developmental senescence expression patterns. *J Exp Bot* 2010; 61: 2905–21. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 9. Cruz M, Características generales del reino Plantae. Plan de Estudios de Bachillerato Tecnológico en Informática Administrativa, 2008.
 10. Lin KC, Sun PC, Lin PL, Production of reactive oxygen species and induction of signaling pathways for the ACO gene expressions in tomato plants triggered by the volatile organic compound ether. *Plant Cell Rep* 2011; 30: 599–611. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 11. Lord CE, Gunawardena AH, Environmentally induced programmed cell death in leaf protoplasts of *Aponogeton madagascariensis*. *Planta* 2011; 233: 407–21. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 12. Cao M, Li X, Die for living better. Plants modify root system architecture through inducing PCD in root meristem under severe water stress. *Plant Signal Behav* 2010; 5: 1645-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 13. Singh A, Agrawal M, Acid rain and its ecological consequences. *J Environ Biol* 2008; 29: 15-24. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 14. Cohen JE, Population and climate change. *Proc Am Philos Soc* 2010; 154: 158-82. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 15. Qaderi MM, Reid DM, Methane emissions from six crop species exposed to three components of global climate change: temperature, ultraviolet-B radiation and water stress. *Physiol Plant* 2009; 137: 139-47. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 16. Wang D, Heckathorn SA, Barua D, Joshi P, Hamilton EW, LaCroix JL, Effects of elevated CO₂ on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C₃, C₄, and CAM species. *Am J Bot* 2008; 95: 165-76. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 17. Bouchard JN, Yamasaki H, Heat Stress Stimulates Nitric Oxide Production in *Symbiodinium microadriaticum*: A Possible Linkage between Nitric Oxide and the Coral Bleaching Phenomenon. *Plant Cell Physiol* 2008; 49: 641-52. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 18. Loureiro L, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C, Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Ann Bot* 2006; 98: 515-27. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 19. Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C, Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *C R Biol* 2010; 333: 382-91. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 20. Reape TJ, McCabe PF, Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis* 2010; 15: 249-56. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 21. Yamada T, Ichimura K, van Doorn WG, DNA degradation and nuclear degeneration during programmed cell death in petals of *Antirrhinum*, *Argyranthemum*, and *Petunia*. *J Exp Bot* 2006; 57: 3543-52. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 22. Giuliani C, Consonni G, Gavazzi G, Colombo M, Dolfini S, Programmed cell death during embryogenesis in maize. *Ann Bot* 2002; 90: 287-92. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 23. Greenberg JT, Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 12094-7. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 24. Drew MC, He CJ, Morgan PW, Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* 2000; 5: 123-7. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 25. Locato V, Gadaleta C, De Gara L, De Pinto MC, Production of reactive species and modulation of antioxidant network in response to heat shock: a critical balance for cell fate. *Plant Cell Environ* 2008; 31: 1606-19. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 26. Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, Ederli L, Della Torre G, Ferranti F, Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol* 2003; 133: 1122-34. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 27. Li Z, Xing D, Mitochondrial pathway leading to programmed cell death induced by aluminum phytotoxicity in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*; 5: 1660-2. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 28. Xu Y, Hanson MR, Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in *petunia*. *Plant Physiol* 2000; 122: 1323-33. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 29. Wingler A, Brownhill E, Pourtau N, Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. *J Exp Bot* 2005; 56: 2897-905. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 30. Moller IM, Jensen PE, Hansson A, Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007; 58: 459-81. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]