



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

DOCTORADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN FRUTO DE AGUACATE

(Persea americana Mill. Cv. Hass).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL.

Sustenta

M. en C. Araceli Arreola Cortés

Tutor: D.C. Ernesto García Pineda

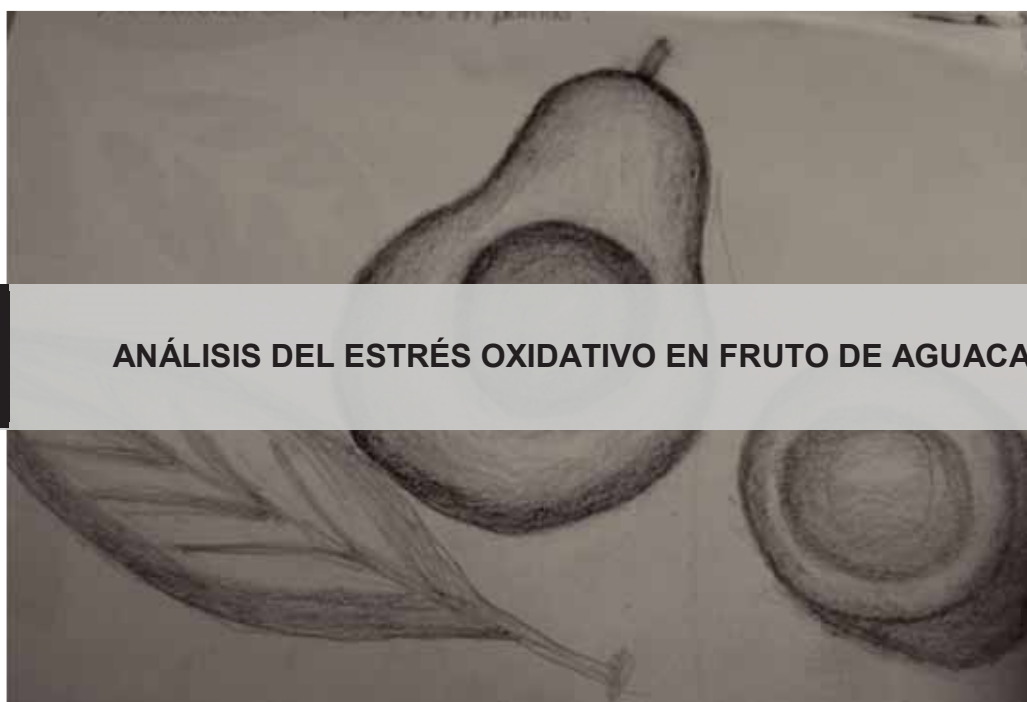
Co-Tutor: D.C. Edmundo Lozoya Gloria

Febrero 2012

Morelia, Michoacán, México.

IIQB-
UMSNH

ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN FRUTO DE AGUACATE.



ÍNDICE	Página
1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
3.1 Mecanismos de defensa en plantas	3
3.1.1 Defensas preformadas	4
3.1.1.1 Barreras estructurales	4
3.1.1.2 Bordes de las células de la raíz	4
3.1.1.3 Barreras químicas	5
3.1.2 Respuestas inducidas	5
3.1.2.1. Señales locales	5
3.1.2.2 Muerte celular programada	6
3.1.2.3 Barreras estructurales inducidas	6
3.1.2.4 Fitoalexinas	6
3.1.2.5 Proteínas relacionadas con la patogénesis	7
3.1.2.6 Patrones moleculares asociados con el patógeno (PAMPs)	8
3.2 Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas	8
3.3 Producción de ERO durante la patogénesis	10
3.3.1 Función de las ERO durante la patogénesis	11
3.4 Producción de ERO durante el daño por herida en plantas	13
3.5 Producción de ERO por PAMPs	14
3.6 Producción de ERO por efecto de bajas temperatura	15
3.7 Destoxificación de ERO en plantas	16
4. Justificación	17
5. Hipótesis	18
6. Objetivos	19
6.1. Objetivo General:	19
6.2. Objetivos particulares	19

7. Estrategia experimental	20
8. Resultados	21
Capítulo I	22
Estrés oxidativo en fruto de aguacate durante el daño por herida y tratamiento con <i>C. gloeosporioides</i>	
Capítulo II	45
Estrés oxidativo en fruto de aguacate durante almacenamiento y maduración	
Capítulo III	54
Superoxido dismutasa en fruto de aguacate durante el daño por herida	
Capítulo IV	63
Respuestas de defensa en raíces de aguacate infectadas con <i>P.</i> <i>cinnamomi</i>	
Capítulo V	76
Superoxido dismutasa en plantas	
Capítulo VI	87
ERO en fruto de chile	
9. Discusión	96
10. Conclusión	104
11. Bibliografía	105

1. RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) peróxido de hidrógeno y anión superóxido son producidas a todos los niveles de las reacciones de resistencia en las plantas. El estrés oxidativo en plantas es causado por factores bióticos (patógenos como: virus, bacterias y hongos) y abióticos (alta intensidad de luz, radiación UV o temperaturas extremas).

Se observó un incremento en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el fruto maduro de aguacate y una disminución en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual participa en la destoxificación de ERO, con respecto al fruto verde. Por otro lado, el perfil de ácidos grasos no mostró cambios en su acumulación durante el estadio maduro, en tanto que la peroxidación de lípidos se observó aumentada. El efecto de las temperaturas de almacenaje (4°C y 24°C) en el fruto mostró incremento en la acumulación de ERO y un decremento en la actividad de SOD. Bajo estas condiciones, el perfil de ácidos grasos mostró incremento en la concentración de ácido oléico (18:1) y la detección del ácido esteárico (18:0) en el tratamiento a 4°C.

La acumulación de ERO en el mesocarpo de aguacate aumentó durante el daño por herida y al tratamiento con el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, además de incrementar la actividad de la enzima SOD. Utilizando al inhibidor de la enzima SOD, difenil ioduro, se sugiere a la enzima NADPH oxidasa de membrana plasmática como la fuente principal de producción de ERO durante el daño por herida en fruto de aguacate. El perfil de ácidos grasos durante el estrés por herida y la infección por *C. gloeosporioides* se modificó con respecto al fruto no tratado, sobresaliendo la detección de los ácidos esteárico (18:0) y gadolénico (20:1), sugiriendo que estos ácidos grasos podrían producirse durante estos tipos de estrés.

2. ABSTRACT

The reactive oxygen species (ROS) as hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) are produced at all levels of the resistance reactions in the plants. The oxidative stress in plants is caused by biotic (pathogens as: virus, bacteria, and fungi) and abiotic factors (high intensity, UV light, or extreme temperatures).

An increase in the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and decrease in the superoxide dismutase enzyme activity (SOD), which is involved in the detoxification of ROS, were observed in mature avocado fruit compared with unripe fruit. On the other hand, the fatty acids profile showed no changes in their accumulation in the mature stage, whereas lipid peroxidation increased. Fruits of stored different temperatures (4°C y 24°C) showed an increase in the accumulation of ROS and a decrease in the SOD activity. Under same conditions, the fatty acid profile showed an increase in the accumulation of oleic acid (18:1) in the 4°C .

The ROS accumulation in the mesocarp of avocado increased in response to wounding and treatment by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, besides an increase in SOD enzyme activity. Using the SOD inhibitor, diphenylene iodonium, an NADPH oxidase enzyme of plasma membrane was suggested as the principal source of ROS production in response to wounding in avocado fruit. The fatty acids profile were modified in response to wounding and pathogen's infection in relation to untreated fruit; being the stearic acid (18:0) and gadoleic acid (20:1) predominantly detected, suggesting that these fatty acids could be produced during these types of stress.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Mecanismos de defensa en plantas

Las plantas como organismos sésiles están expuestas a factores ambientales como temperaturas extremas, alta intensidad de luz y/o sequía o a factores bióticos como virus, bacterias u hongos. Para tales daños las plantas cuentan con mecanismos para percibir y responder.

Así como los patógenos han evolucionado para colonizar a las plantas, éstas también han desarrollado medidas para prevenir o tolerar su presencia. Muchas plantas son resistentes a diversos microorganismos y generalmente sólo algunos de ellos han desarrollado la capacidad de sobrepasar las defensas de la planta. Clásicamente se han definido dos niveles de resistencia: la resistencia no huésped y la resistencia huésped (Mishina y Zeier, 2007). La resistencia no huésped es en la cual una especie de planta o género es resistente y por lo tanto no es huésped para un patógeno en particular. Por ejemplo: el trigo no es infectado por el oomiceto *P. infestans* patógeno de la papa, por lo que el trigo es un “no huésped”. Por otro lado la resistencia huésped es en la cual dentro de una especie de individuos han desarrollado genéticamente rutas metabólicas para defenderse contra un organismo que causa enfermedad en otros individuos dentro de la misma especie de la planta. Por ejemplo, el trigo es infectado por *Phytophthora striiformis*, pero ciertos genotipos serán resistentes a razas específicas del oomiceto. Los mecanismos de resistencia en plantas pueden ser subdivididos en dos categorías: pasivos (constitutivos) y activos (inducidos) (Ent y Koornnef, 2009). Los mecanismos pasivos involucran elementos estructurales tales como la cutícula y los bordes celulares de la raíz, así como compuestos químicos antimicrobianos preformados dentro de la planta denominados fitoanticipinas. Esta forma inicial de protección es una barrera contra el ataque de microorganismos. Una vez que esta barrera es traspasada, la planta cuenta con mecanismos de respuesta inducibles o activos dentro de los que se incluyen la respuesta hipersensible (muerte celular localizada de células de la planta) y la inducción específica de la expresión de genes de la planta, incluyendo genes involucrados

en el reforzamiento de la pared celular y/o reparación de estructuras de defensa, genes para la biosíntesis de compuestos antimicrobianos adicionales a los preexistentes y la inducción de genes que codifican para enzimas hidrolíticas y otras proteínas relacionadas con la defensa. En adición a la inducción de respuestas de defensa, hay mecanismos que inducen resistencia en otras partes de la planta a través de señales sistémicas como la resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés) (Shah, 2009) y la resistencia sistémica inducida (IRS de sus siglas en inglés). Las plantas pueden transmitir su señal a las plantas vecinas a través de compuestos volátiles (Park y Peak, 2007).

3.1.1 Defensas preformadas

3.1.1.1 Barreras estructurales

La primera barrera pasiva que defiende a la planta contra los microorganismos es la capa de cera presente en la cutícula de las hojas y frutos, que forma una superficie repelente al agua y que previene la formación de estancamientos de agua necesarios para el ingreso de las bacterias y la posterior germinación de esporas. Los pelos en la superficie de las hojas poseen una función similar. La capa de la cutícula compuesta de cutina, celulosa y pectina en combinación con la pared o células epidérmicas, forman adicionalmente otra barrera contra todos los patógenos. Las aperturas naturales de las hojas como los estomas, son las estructuras más débiles y algunos hongos esperan a la apertura de éstos para ingresar a la planta (Guest y Brown, 1997).

3.1.1.2 Bordes de las células de la raíz

Las puntas de la raíz se elongan y se dirigen hacia donde se encuentran los nutrientes y el agua en el suelo. El rápido crecimiento, la síntesis de nuevo tejido y la capacidad de daño abrasivo la hace vulnerable al ataque de microorganismos. En estas células, las defensas inducibles tales como la muerte celular programada podría no ser una defensa efectiva ya que podría terminar con el crecimiento de la raíz. Sin embargo, la punta de la raíz ha desarrollado mecanismos de defensa

como las células que rodean a la punta de la raíz que son células somáticas denominadas “células borde”, y que efectivamente guardan la punta de la raíz del ataque de patógenos (Dickinson, 2003)

3.1.1.3 Barreras químicas

Las barreras químicas en plantas han sido generalmente clasificadas como fitoanticipinas o fitoalexinas dependiendo de si son preformadas o son producto de la síntesis *de novo* seguida del ataque por patógenos; sin embargo, esta distinción es algunas veces arbitraria porque pueden ser compuestos que en una planta son preexistentes y en otra son inducidos (Nürnberger y Lipka, 2005).

3.1.2 Respuestas inducidas

Las respuestas inducidas en plantas pueden ser activadas por un amplio número de factores y la naturaleza exacta de la respuesta varía dependiendo del factor. Hay evidencia de que algunas defensas son inducidas por la presencia física de esporas de hongo en la superficie de la hoja, y otras donde se requiere que el patógeno penetre la superficie antes de la inducción. La inducción de la respuesta puede ser por activadores no específicos (respuesta inmune innata) o puede seguir la resistencia gen por gen, del modelo clásico descrito por Flor (1940), modelo que experimenta la resistencia no huésped, donde la resistencia inducible es producida por el reconocimiento del producto del gen específico de resistencia en la planta, a un estimulador específico proveniente del patógeno. Éste induce respuestas de resistencia que pueden ser muy similares a las respuestas que ocurren cuando la planta es dañada por herida, pero no son idénticas (Park y Paek, 2007).

3.1.2.1. Señales locales

Una de las primeras respuestas activadas en muchas interacciones incompatibles antes de la inducción de la expresión de genes y la síntesis de proteínas, es el flujo de iones, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la producción de óxido nítrico (ON) y las cascadas de señalización. Éstas son

reconocidas como importantes mecanismos de señalización en muchos organismos (Ry, 2005; Shah, 2009).

3.1.2.2 Muerte celular programada

Unas de las más visibles respuestas de las plantas al ataque por patógenos es la respuesta hipersensible (RH), que es la muerte celular localizada en las células de la planta. Éste es un mecanismo espacial y temporalmente coordinado que limita la cantidad de tejido huésped invadido por el patógeno. Además de que restringe el ingreso de patógenos biótros que requieren células vivas como su fuente de nutrientes. La muerte celular programada generalmente se describe como la inducción de la muerte suicida de células que ocurre en el organismo. Se ha mostrado este fenómeno que ocurre como parte de la respuesta hipersensible en plantas (Park y Peak, 2007).

3.1.2.3 Barreras estructurales inducidas

Las plantas tienen un número de barreras estructurales inducidas, la primera de éstas es el citoesqueleto, basada en rechazar el ataque de patógenos potenciales antes de la penetración de éstos, involucra la percepción del desarrollo del patógeno en la superficie de la planta. Este mecanismo ha sido observado en el moho de la cebada, en el sistema arroz-*Botrytis spp.* y arroz-*M. grisea* (Park y Peak, 2007).

3.1.2.4 Fitoalexinas

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos que incluyen una diversa serie de metabolitos secundarios de bajo peso molecular (estos no son esenciales para el metabolismo básico) y generalmente actúan en contra de un amplio rango de patógenos. Dentro de estos compuestos se incluyen a los derivados terpenoides (sesquiterpenos), saponinas, derivados de ácidos alifáticos, fenoles y fenilpropanoides, alcaloides (sintetizados a partir de aminoácidos) y compuestos inorgánicos que contienen sulfuro. Muchos de estos compuestos son derivados de las rutas de isoprenoides, fenilpropanoides, alcaloides o ácidos grasos/policétidos.

Algunos genes que codifican para enzimas involucradas en estas rutas, son la fenilalanina amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés) y la chalcona sintasa (CHS) que han mostrado ser inducidas durante la respuesta de defensa en asociación con la respuesta hipersensible (Hammond-Kosack, y Jones, 1996). Además, algunas especies de plantas dentro de una misma familia tienden a utilizar la misma estructura química como antimicrobiano, por ejemplo: los sesquiterpenos son ampliamente encontrados en *Solanaceae*. Muchos compuestos antimicrobianos se encuentran almacenados en la planta como precursores inactivos o son sintetizados y acumulados en vesículas especializadas que son liberadas en el sitio de la infección microbiana, algunos antimicrobianos son secretados fuera de la célula a través de transportadores ABC (de Wit, 2007).

3.1.2.5 Proteínas relacionadas con la patogénesis

Adicionalmente a la muerte celular programada, el reforzamiento de defensas estructurales y la producción de fitoalexinas, varias proteínas son inducidas durante el ataque por patógenos, éstas son denominadas como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Estas proteínas son expresadas a bajos niveles cuando la planta se encuentra sana, pero ciertas isoenzimas son inducidas durante el ataque por patógenos local y sistémicamente; hay evidencia de que secuencias específicas en las regiones promotoras de los genes que codifican para estas son importantes para la inducción (Ent y Koornneef, 2009). Las proteínas inducidas han sido agrupadas en 14 clases de PRs acorde a su serología y homología aunque no todas son inducibles en todas las interacciones ni en todas las especies de plantas. La función bioquímica de muchas de estas proteínas han sido determinadas; por ejemplo: las quitinasas (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11), las cuales han sido clasificadas por su actividad específica en diferentes sustratos, hidrolizan quitina de la pared celular de hongos. Otras proteínas relacionadas con defensa incluyen a las lectinas y se postula que éstas se unen a quitina (Odjakova y Hadjiivanova, 2001).

3.1.2.6 Patrones moleculares asociados con el patógeno (PAMPs)

Las plantas están expuestas a microorganismos potencialmente patógenos, pero éstas poseen un sistema de inmunidad innata que eficientemente detecta y dirige las defensas contra el microorganismo potencialmente patógeno. La primera parte de este sistema está basado en la percepción del patógeno o de los patrones moleculares asociados con el patógeno (PAMPs o MAMPs, por sus siglas en inglés) a través de receptores de reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos (PRRs, de sus siglas en inglés) en la superficie de las células de la planta (Vlot *et al.*, 2009). Así, la inmunidad disparada por PAMPs (PTI) formalmente llamada resistencia basal, confiere niveles bajos de resistencia a patógenos virulentos. Sin embargo, las plantas también poseen una inmunidad disparada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés), formalmente denominada resistencia mediada por genes *R*. Una de las manifestaciones de la ETI es la respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés), en donde se desarrollan lesiones necróticas en el sitio de entrada al patógeno. ETI es usualmente asociada con la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la activación de diversos grupos de genes relacionados con la defensa, incluyendo varias familias de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, por sus siglas en inglés); después del desarrollo de RH y la expresión de genes *PR* se presenta el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) (Vlot *et al.*, 2009).

3.2 Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas

Las plantas como organismos sésiles están sujetas a condiciones de estrés por factores ambientales tales como intensidad de luz, sequía, exceso de agua, herbicidas, daño mecánico y el ataque por patógenos. Para su sobrevivencia, las plantas cuentan con mecanismos para percibir y responder a diversos tipos de estrés, tanto biótico (virus, bacterias y hongos) como abiótico (temperaturas extremas, daño mecánico, luz UV entre otros). Generalmente el estrés abiótico es crónico por la exposición prolongada o recurrente por un largo período de tiempo (Apel y Hirt, 2004). Las respuestas celulares a estrés son un mecanismo universal

que representa las reacciones de defensa de la célula al daño causado por el ambiente. La exposición a un agente estresante frecuentemente dispara mecanismos de defensa que protegerán a la planta o alterará su respuesta a subsecuentes estreses, alterando su metabolismo e involucrando varios mecanismos de defensa entre los que se encuentra la producción de especies reactivas de oxígeno (llamado explosión oxidativa) tales como anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) entre otros (Ahmad *et al.*, 2008). Las ERO son constantemente producidas durante procesos metabólicos como la fotosíntesis o la glicólisis. La producción de ERO en altas concentraciones ha sido descrita como letal para la integridad celular. Sin embargo altos niveles de ERO son también necesarios para la defensa en la planta (explosión oxidativa, necrosis) (Imlay, 2008). Las especies reactivas de oxígeno tienen un papel multifacético dentro de la señalización mediante el establecimiento de múltiples respuestas como moléculas señal durante el crecimiento celular, el control del cierre de estomas (Pei *et al.*, 2000), en la interacción planta-patógeno (Apel y Hirt, 2004), la muerte celular programada (Gechev y Hille, 2005) y respuestas a estrés en plantas (Laloi *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008).

ERO tales como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $OH^{\bullet}$ son producidas en todos los organismos aerobios y normalmente existe en la célula un balance entre las especies reactivas de oxígeno y los moléculas antioxidantes. El estrés oxidativo ocurre cuando el balance crítico se interrumpe debido a la disminución de antioxidantes o al exceso en la acumulación de ERO o ambos. Un claro y rápido indicador de estrés oxidativo es la inducción de respuestas antioxidantes y un incremento en los niveles de ERO endógenos. La producción de ERO puede ser acelerada como consecuencia de varios tipos de estrés como la radiación de luz UV, alta intensidad de luz, exposición a herbicidas, temperaturas extremas, toxinas como aflatoxinas, contaminantes en el aire, metales, daño por herida y xenobióticos. Muchos de los inductores de estrés oxidativo son conocidos como carcinógenos, mutágenos y toxinas. La producción de ERO y su acumulación es un común denominador en muchas enfermedades y daños severos del ambiente que

conducen a severos daños celulares, disfunción fisiológica y muerte celular (Ahmad *et al.*, 2008).

Aunque el metabolismo del oxígeno es similar en plantas y animales, hay varios aspectos únicos en las plantas, como el transporte de electrones durante la fotosíntesis y que durante el metabolismo normal se producen especies reactivas de oxígeno. En la fotosíntesis, los carotenoides del cloroplasto son importantes para la regulación de los niveles del singulete de oxígeno ($O^{\cdot}$); bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno y anión superóxido son esenciales para mantener la actividad fotosintética. Otros procesos únicos en plantas que involucran la participación de ERO son: la lignificación de la pared celular que es importante durante el crecimiento, durante la patogénesis y en la senescencia. Las ERO son esenciales, durante la maduración del fruto y producción de semilla. La explosión oxidativa en plantas estresadas fue considerada como una señal del sistema innato de inmunidad en la planta ya que las ERO se producen durante el estrés por patógenos y el estrés abiótico como la radiación UV y herida entre otros (Liu *et al.*, 2005).

3.3 Producción de ERO durante la patogénesis

Las plantas han desarrollado sofisticados sistemas de defensa para el reconocimiento de patógenos o de patrones moleculares asociados al patógeno. Los patógenos a su vez utilizan diferentes vías para acceder al tejido de la planta; las bacterias comúnmente ingresan a través de heridas y estomas, mientras que los hongos ingresan a través del haustorio penetrando la epidermis. El resultado es la respuesta de defensa, la cual ha sido clasificada en: defensas preexistentes y/o activadas; ambas incluyen la producción de ERO. Además, las ERO están también involucradas durante la respuesta hipersensible y respuesta sistémica adquirida (Bolwell y Daudi, 2009).

El oxígeno reactivo es producido en células de plantas en reconocimiento a patógenos invasores. La producción de especies reactivas de oxígeno ha sido monitoreada en varios tejidos de la planta incluyendo hojas intactas, células en

suspensión y protoplastos. Durante la patogénesis las principales ERO son el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Las células vegetales han mostrado la producción de ERO durante interacciones con hongos, bacterias y virus con varias similitudes entre varias interacciones microbianas. La producción de superóxido en hojas de papa inoculadas con *P. infestans* muestra una acumulación antes de la penetración del hongo al tejido de la hoja y una segunda acumulación ocurre sólo si la interacción es incompatible (reconocimiento del patógeno por parte de la planta huésped y activación de los mecanismos de defensa de la planta, en tanto la interacción compatible resulta en la infección), lo que resulta en la respuesta hipersensible; caracterizada por la rápida muerte celular de las células adyacentes al patógeno y es una respuesta efectiva de resistencia, que resulta en la necrosis localizada pero no permite el desarrollo de los síntomas de la enfermedad en el tejido de la planta. Una amplia variedad de componentes de microorganismos han demostrado estimular la producción de ERO en células de plantas (Chai y Doke, 1987; Lamb y Dixon 1997; Baker y Orlandi, 1999; Torres et al., 2006).

3.3.1 Función de las ERO durante la patogénesis

Las ERO pueden interactuar con componentes celulares, actuando como una señal a las reacciones de estimulación durante la interacción planta-patógeno. Las ERO además son antimicrobianas y se sugiere que tengan una función en la limitación del ingreso de patógenos, el peróxido de hidrógeno adicionado exógenamente o generado artificialmente ha mostrado limitar el crecimiento de hongos y bacterias patógenas. Sin embargo, no está claro como las ERO producidas endógenamente tienen una función antimicrobiana durante la patogénesis (Kültz, 2005).

Una vez que se da el reconocimiento del patógeno, o se ha dado el daño mecánico, las células vegetales experimentan una explosión oxidativa. Dentro de las fuentes de la producción de especies reactivas de oxígeno esta involucrada a una NADPH/NADH oxidasa de membrana plasmática (NOX). La NOX, que también referida como una oxidasa de explosión respiratoria que genera anión

superóxido. En plantas se ha encontrado un homólogo a la NADPH oxidasa de mamíferos o una peroxidasa localizada en pared celular que puede generar peróxido de hidrógeno directamente. La reacción catalizada por NADPH oxidasa es inhibida por DPI (Difenil yoduro por sus siglas en inglés). La generación de H_2O_2 a través de peroxidasas de pared celular involucra una alcalinización del apoplasto generado por la salida de K^+ (Glyan'ko y Ischenko, 2010).

La producción de ERO es regulada en cuanto a su acumulación y éstas tienen funciones críticas, particularmente el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 que actúan como moléculas señal dentro de la célula. Las ERO activan el factor nuclear κB (NF- κB) y al activador de la proteína-1 (AP-1), los cuales tienen función crítica en la proliferación, diferenciación y morfogénesis que resulta de la estimulación por diversos agentes procedentes a través de una ruta en común que involucra la generación de ERO (Gessler *et al.*, 2007). La generación de ERO intra y extracelulares son capaces de modular la expresión de genes. Bajas dosis de H_2O_2 (<20 μM) puede estimular cambios en la fosforilación de proteínas regulatorias específicas como a la proteína cinasa B. Así mismo, regulan la expresión de genes antioxidantes a través de elementos de respuesta antioxidante como ARE (TGACTCA), NF- κB y elementos a respuesta a ácido abscísico 2 (ACGT) en los promotores de los genes resposivos (Ausubel, 2005). En adición a la expresión de genes de defensa, otras funciones de las ERO en plantas incluyen directamente la muerte de patógenos, en donde se involucran a la pared celular y la muerte celular programada. En levaduras y en células animales las ERO han mostrado inducir una disminución en la división celular y progresión del ciclo celular en condiciones de estrés oxidativo. El $O_2^{\cdot-}$ tiene un papel importante contra los patógenos invasores, semejante al de un antibiótico de amplio espectro. En respuesta a la invasión de patógenos las plantas producen grandes cantidades de ERO (llamada explosión oxidativa). Así, las ERO producidas durante diferentes procesos celulares juegan un papel diferente y aún roles opuestos, lo que ocasiona un cambio redox en la célula. El potencial redox actúa como una señal que regula la casacada de señalización a la respuesta celular a estrés, como un segundo mensajero en células expuestas a éste. Además se ha propuesto que la

producción de H_2O_2 durante la patogénesis tenga un papel en el reforzamiento de la pared celular, por otro lado puede ser esencial en la formación de lignina durante condiciones normales y de estrés. Adicionalmente el H_2O_2 producido durante la interacción planta-bacteria inmoviliza proteínas de pared celular de la planta a través de la oxidación de las mismas (Gessler *et al.*, 2007).

La tolerancia al estrés ambiental es ampliamente dependiente de la especie (genoma), del tipo celular y estado de diferenciación (proteoma). Debido a que las ERO pueden interactuar y alterar muchas de los componentes de la célula, tienen diferentes funciones durante la patogénesis. Se ha sugerido que tienen efecto directo en los componentes celulares y en procesos en los que actúan como una señal o estimulan reacciones secundarias (Kültz, 2005).

3.4 Producción de ERO durante el daño por herida en plantas

Las plantas también son sensibles a cambios en el medio como la osmolaridad y el daño mecánico, ocasionando la producción de especies reactivas de oxígeno. Éstas han sido documentadas en una amplia variedad de estrés tanto bióticos como abióticos. Las plantas responden y se adaptan al estrés ambiental al alterar su metabolismo celular e involucrando varios mecanismos de defensa. Durante el daño por herida o el ataque por herbivoría se produce un incremento en la generación de ERO. Por otro lado, un importante regulador de la respuesta de defensa al estrés por herida o al ataque por herbívoros es el ácido jasmónico (AJ); durante el daño por herida se induce un incremento de ácido jasmónico o de metiljasmonato en plantas. El AJ induce el incremento de la expresión de genes de defensa que incluyen la activación genes inhibidores de proteinasas y el gen de la fenil alanina amonioliasa. Las ERO entre ellas el H_2O_2 , se incrementan ante el daño por herida o a la aplicación de exógena de AJ. Además, la aplicación de exógena de AJ dispara la acumulación rápida y masiva de H_2O_2 , sugiriendo así la participación de éste como una molécula señal en plantas en respuesta a herida (Liu *et al.*, 2008).

Se han propuesto diferentes rutas de transducción de señales para la activación en la producción de ERO en células vegetales. Los componentes de la ruta de transducción de la señal parece ser que varían dependiendo del patógeno o del estímulo usado. Sin embargo, un proceso que parece ser requerido en la estimulación de ERO es la fosforilación de proteínas. Hay varias fuentes potenciales de H_2O_2 , las hay intracelulares como la mitocondria y peroxisomas, NADPH oxidasa de membrana plasmática, peroxidasas de pared celular y aminooxidasas (Bolwell y Daudi, 2009).

Durante la patogénesis se han involucrado varias enzimas como la fuente de producción de ERO, las cuales incluyen a la NADPH oxidasa de membrana plasmática, peroxidasas, xantina oxidasa y lipoxigenasas. La mayoría de los estudios de ERO se han enfocado a la participación de la enzima NADPH oxidasa similar a la encontrada en neutrófilos humanos. Además la producción de ERO es bloqueada por los mismos inhibidores como DPI, que es un inhibidor de NADPH oxidasa (Glyan'ko y Ischenko, 2010).

3.5 Producción de ERO por PAMPs

Se ha mostrado que una amplia variedad de componentes microbianos estimula la producción de ERO en células de vegetales. Muchos de estos estimuladores son preparados a partir de extractos crudos de hifas de hongos o fluidos intracelulares de tejidos de plantas infectadas. Los componentes activos de estos extractos son generalmente carbohidratos o glicoproteínas. Estudios con estimuladores microbianos altamente purificados han mostrado que una amplia variedad de compuestos tienen el potencial de disparar la producción de ERO durante las interacciones planta-patógeno, como los galactoglucomananos de *Pyrucularia oryzae* (Haga *et al.*, 1995). Y la proteína harpina_{Ea} de *Erwinia amylovora* (Baker *et al.*, 1993a). Además de los estimuladores provenientes de componentes microbianos las plantas han mostrado producir ERO en respuesta a fragmentos de pared celular (Boller y He, 2009).

3.6 Producción de ERO por efecto de bajas temperatura

Durante el estrés causado por factores bióticos y abióticos las plantas responden al remodelar la fluidez de la membrana liberando ácido linolénico (18:3) de los lípidos de membrana. La modificación en la fluidez de la membrana mantiene la integridad de las proteínas de membrana (Upchurch, 2008).

Durante el daño causado por temperaturas congelantes, los sistemas membranales son los principales sitios afectados. A temperaturas menores a 0°C, la formación de hielo se inicia en espacios intracelulares provocando una disminución de solutos, deshidratación, lisis provocada por expansión y la desnaturalización de proteínas. También se ha documentado la producción de especies reactivas de oxígeno que contribuyen al daño de lípidos de las membranas; además, de contribuir a que el hielo formado en los espacios intracelulares ocasione adhesiones a la pared celular provocando ruptura celular (Zhou *et al.*, 2007).

En frutos de aguacate sometidos a bajas temperaturas se encontró un cambio en el plasmalema (Platt-Aloia y Thomson, 1987). El daño a las membranas causado por efectos físicos o estrés ambiental en células está asociado con la alteración de la tensión de la membrana o flexibilidad, cambios en la permeabilidad, reajuste de lípidos, cambios en el potencial transmembranal y formación de lípidos peroxidados. La peroxidación de lípidos en la membrana es un daño común a la respuesta a estrés, resultado de la auto oxidación o catálisis de lipooxigenasas (LOX) o del sistema del citocromo P-450 (Kültz, 2005). Tales productos incluyen isoprostanos de ácidos araquidónico, eicosapentaenóico y docosahexaenóico; oxisteroles de colesterol esterificado y no esterificado; otros ácidos grasos hidroxiperoxidados y un amplio espectro de aldehídos. Estos daños ocasionados en membranas representan una señal potencial en la red de la respuesta a estrés celular y múltiples mecanismos para la traducción de daños de membranas en la activación de rutas de señalización en respuesta al estrés celular. Por ejemplo, la actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) depende de la integridad y densidad de la membrana; además, es activada durante el estrés. Esta enzima cataliza la

hidrólisis de glicerofosfolípidos de membrana, resultando en la liberación de ácido araquidónico, una importante molécula señal en la célula. Otro ejemplo es la proteólisis intermembranal y la consiguiente liberación y activación de factores de transcripción, como el factor SPT23 dependiente del proteosoma el cual es regulado por una poza de ácidos grasos, SPT23 puede funcionar percibiendo la composición de la membrana o la fluidez. Adicionalmente, cambios en la permeabilidad de la membrana y la actividad de canales mecano-sensibles a iones durante estrés promueven el influjo de Ca^{2+} (Kültz, 2005).

3.7 Destoxificación de ERO en plantas

Todas las células tienen sistemas de destoxificación de radicales libres para minimizar y reparar el daño oxidativo que incluyen compuestos como ascorbato, glutatión, tioredoxina y varias enzimas antioxidantes. Las ERO pueden tener efecto directo en la señalización de proteínas e indirecta alteración de las rutas de señalización por proteínas especializadas en percibir el estado redox. Un efecto directo es la alteración de proteínas involucradas en señalización como MAPKs (quinasas de proteína activada por mitógenos) y factores de transcripción (Jones y Dangl, 2006).

El anión superóxido es destoxificado en la reacción de desprotonación catalizada por superóxido dismutasa que resulta en la producción de peróxido de hidrógeno. Esta enzima se considera la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo. En plantas se han encontrado tres tipos de superóxido dismutasas dependiendo del metal presente en su grupo prostético: CuZn, Mn y Fe. Las plantas usualmente tienen CuZn-SOD en el citosol, Mn-SOD en la mitocondria y CuZn-SOD y/o Fe-SOD en el cloroplasto. La SOD juega un papel muy importante en la reducción de los niveles de anión superóxido en el cloroplasto. Asada (1994) sugiere que SOD reduce los niveles de superóxido de $\sim 22 \mu\text{M}$ a $\sim 2.4 \mu\text{M}$ en el estroma y lumen del cloroplasto, reduciendo así significativamente el daño oxidativo. La presencia de SOD extracelulares sólo habían sido descritas en mamíferos sin embargo, estudios en hipocotilos de *Pinus sylvestris* sugieren la presencia de CuZn-SOD en el apoplasto (Baker y Orlandi, 1999).

4. JUSTIFICACIÓN

El fruto de aguacate es considerado una mantequilla vegetal por su alto contenido de ácidos grasos presentes en el mesocarpo, comparado con otros frutos; es además considerado como una fuente de energía y el aceite de aguacate es también utilizado en la fabricación de cosméticos. Una vez que el fruto ha sido cosechado en estado inmaduro, este puede ser afectado durante su manipulación, transporte y almacenaje causando daños por herida o el ataque por patógenos postcosecha como *Colletotrichum gloeosporioides*. También, las temperaturas de almacenaje (refrigeración) pueden conducir al deterioro en la calidad del fruto y por consecuencia ocasionar pérdidas económicas. Una vez ocasionados estos daños se pueden producir especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden modificar la composición de ácidos grasos del mesocarpo del fruto, teniendo una repercusión en el color, sabor y calidad del fruto, por lo que el análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno, su regulación y su relación con los lípidos del fruto son un aspecto importante a investigar en este fruto.

5. HIPÓTESIS

El daño por herida, al ataque por *Colletotrichum gloeosporioides*, las temperaturas de almacenamiento y la madurez en el fruto de aguacate producen estrés oxidativo ocasionando cambios que afectan la composición de lípidos, disminuyendo la calidad del fruto.

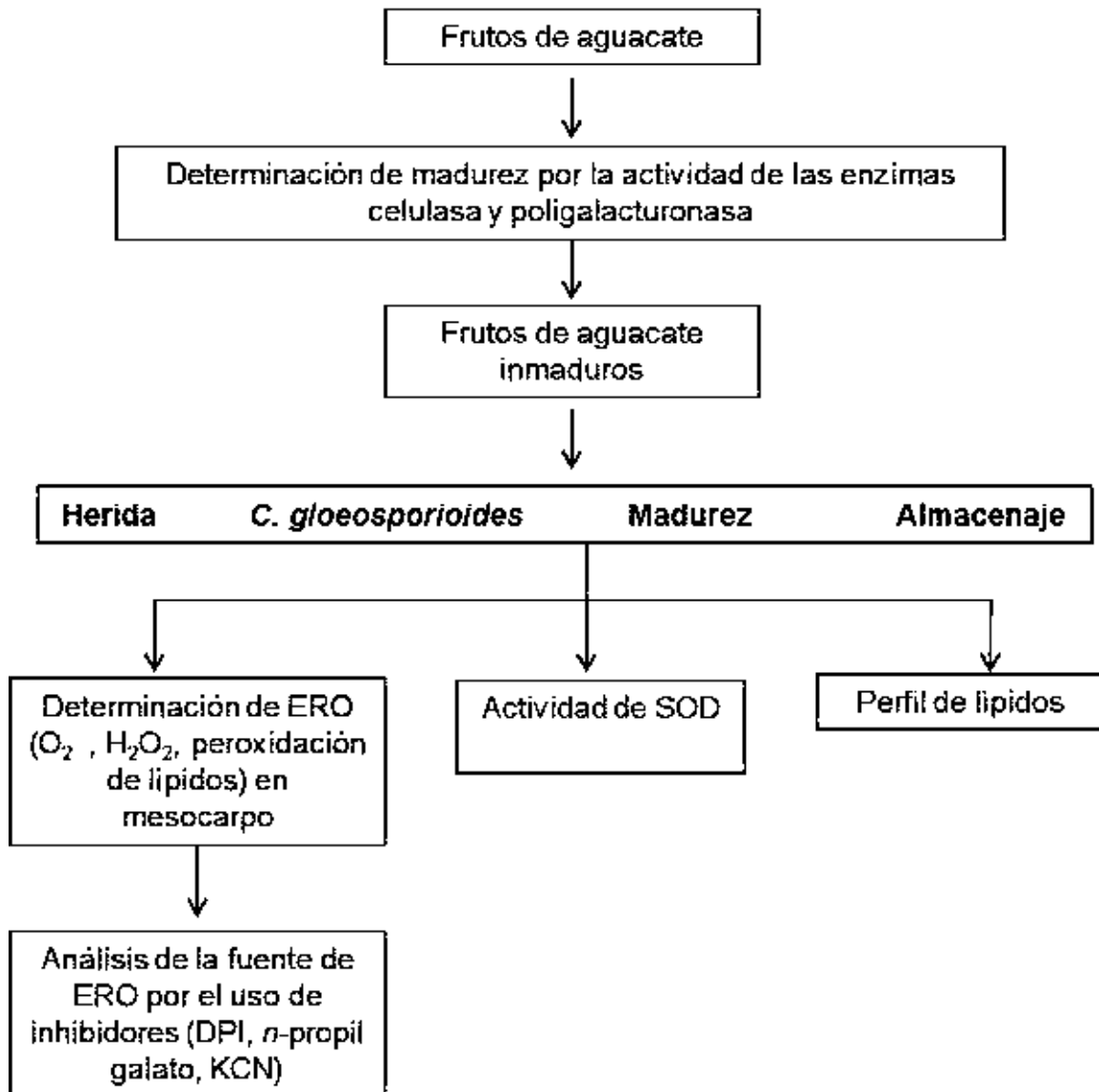
6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General: Analizar el estrés oxidativo en fruto de aguacate en diferentes condiciones de estrés.

6.2. Objetivos particulares

1. Analizar la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en mesocarpo de aguacate tratado por herida, *Colletotrichum gloeosporioides*, almacenamiento a 4°C y maduración.
2. Analizar la actividad de las SODs y caracterizar las isoenzimas de SOD en extractos totales y apoplásticos involucradas en el daño por herida.
3. Analizar la actividad de SODs en fruto de aguacate tratados con *Colletotrichum gloeosporioides*, 4°C y maduración.
4. Analizar el perfil de lípidos en los diferentes tipos de estrés en mesocarpo de frutos de aguacate.

7. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL



8. RESULTADOS

CAPÍTULO I
ESTRÉS OXIDATIVO EN FRUTO DE AGUACATE DURANTE EL DAÑO
POR HERIDA Y TRATAMIENTO CON *C. gloeosporioides*.



SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA, A.C.

Revista Mexicana de Fitopatología
Órgano Internacional de comunicación
de la Sociedad Mexicana de Fitopatología

Junio 16, 2011

Estimados Araceli Arreola Cortés, Elda Castro Mercado, Ernesto García Pineda:

Me es grato acusar recibo del manuscrito titulado "Efecto de la Herida y de la Infección por Patógeno sobre el Estrés Oxidativo y el Contenido de Lípidos en el Fruto de Aguacate", con la finalidad de publicarse en la Revista Mexicana de Fitopatología.

Clave: RMF/1106-2

Le agradezco el considerar la Revista Mexicana de Fitopatología para la publicación de sus actividades de investigación.

Atentamente

MC. Arturo Díaz Franco, Editor en Jefe

Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.
[http:// www.sociedadmexicanadefitopatologia.org](http://www.sociedadmexicanadefitopatologia.org)

Efecto de la herida y de la infección por patógeno sobre el estrés oxidativo y el contenido de lípidos en el fruto de aguacate. (Effect of wounding and pathogen infection on oxidative stress and the content of lipids in avocado fruit).

Araceli Arreola Cortés, Elda Castro Mercado, Ernesto García Pineda, Laboratorio de Bioquímica de Plantas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B1, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, CP 58040, México. Correspondencia: egpineda@umich.mx

Resumen. En este trabajo se analizó la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el contenido de ácidos grasos en el mesocarpio del fruto de aguacate en respuesta a dos tipos de estrés: herida o infección con el patógeno del fruto *Colletotrichum gloeosporioides*. Se observó una acumulación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30 min después de ambos tratamientos. La enzima superóxido dismutasa (SOD) incrementó su actividad desde los 7 min y alcanzó su máximo a los 30 min después de la herida. En el análisis isoenzimático se pudieron distinguir 4 isoenzimas para SOD y de acuerdo a su caracterización con inhibidores específicos tres correspondieron a SOD de CuZn y una a SOD de Mn. También se observó una acumulación de $O_2^{\bullet-}$ y de H_2O_2 en respuesta a la infección por patógeno. No se observaron cambios en el patrón de isoenzimas para SOD durante la infección. El perfil de ácidos grasos se modificó notablemente en respuesta a ambos tipos de estrés, observándose una disminución en la concentración de la mayoría de los ácidos grasos analizados.

Palabras clave: Especies reactivas de oxígeno, aguacate, superóxido dismutasa, herida, *Colletotrichum gloeosporioides*.

Abstract. The production of reactive oxygen species (ERO) and the fatty acids content was analyzed in the avocado mesocarp in this work in response to two kinds of stress: wounding or infection with the avocado fruit pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. Superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) production was observed 30 min after both treatments. The superoxide dismutase enzyme (SOD) increased its activity at 7 min and reached its maximum 30 min after wounding treatment. Four isoenzymes to SOD were distinguished and using specific inhibitors to its characterization three corresponded to CuZn SOD and one to MN SOD. Also, $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 accumulation was observed in response to pathogen infection. No changes were observed in the SOD isoenzymes pattern during infection. The fatty acids profile was notably modified in response to both kinds of stress, a decrease in the concentration of the most fatty acids analyzed was observed.

Additional keywords: Reactive oxygen species, avocado, superoxide dismutase, wounding, *Colletotrichum gloeosporioides*.

El fruto de aguacate es de gran importancia económica y nutricional. El aceite del fruto se utiliza en la fabricación de productos cosméticos para el pelo y para mejorar la elasticidad de la piel. Por su alto valor nutritivo es importante en la dieta por su alto contenido en ácidos grasos insaturados tales como los ácidos oleico, linoléico y linolénico y su baja concentración de ácidos grasos saturados, en comparación con otros aceites vegetales (Landhal *et al.*, 2009). Los frutos se cosechan verdes-maduros y durante su manipulación, transporte y almacenamiento son susceptibles a heridas o ataque por patógenos de pos cosecha. Uno de los patógenos más importantes pos cosecha de este fruto es *Colletotrichum gloeosporioides* (Beno-Moualem y Prusky, 2000).

Una de las primeras respuestas a la herida y al ataque por patógenos es la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales incluyen al anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y al radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$). Las ERO tienen un papel importante en la señalización celular y en el establecimiento de respuestas de defensa, donde participan en reacciones bioquímicas tales como el entrecruzamiento oxidativo de proteínas, la formación de polímeros de lignina, la producción de fitoalexinas y la muerte celular programada (Shetty *et al.*, 2008).

La producción de ERO comienza en el espacio extracelular de la membrana plasmática por la reducción por un electrón del oxígeno molecular. La posible fuente principal de producción es el complejo enzimático llamado NADPH oxidasa, el cual está involucrado en la producción de ERO durante la infección de plantas por patógenos o la exposición a factores abióticos, incluyendo daño por herida. Otra fuente de ERO en el apoplasto son las enzimas peroxidasas de pared celular dependientes del pH (Glyan'k e Ischenko, 2010).

Existe un balance entre la producción de ERO y su remoción por sistemas antioxidantes que incluyen a enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1). Esta enzima es una de las primeras líneas enzimáticas de defensa en contra del estrés oxidativo; es una metaloproteína que cataliza la dismutación de los radicales

superóxido a peróxido de hidrogeno y oxígeno. Esta enzima ha sido clasificada en las plantas por su localización celular y el metal catalítico que requiere en los siguientes tipos: si contiene cobre-zinc se clasifica como superóxido dismutasa de cobre-zinc (CuZn-SOD). Este tipo de enzima se localiza en el citosol, en el cloroplasto y en el espacio extracelular. Si contiene fierro se clasifica como superóxido dismutasa de fierro (Fe-SOD), esta se localiza en los cloroplastos, y si contiene manganeso se clasifica como una superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD) y se localiza en la mitocondria y en los peroxisomas (Alsher, 2002).

Por otro lado, los ácidos grasos del aguacate son susceptibles de formar lípidos hidroperóxidos durante el estrés oxidativo, lo cual podría dañar a los lípidos de las membranas celulares y a los principales ácidos grasos de almacén del fruto, como el oleico y el linoléico. Por lo tanto la producción de ERO podría tener efecto sobre la calidad nutritiva del fruto. Se ha reportado la producción de ERO en frutos de aguacate después del daño por herida o inoculación del tejido del pericarpio con *Colletotrichum gloeosporioides* (Beno-Moualem y Prusky, 2000), sin embargo, su efecto sobre la actividad de la enzima SOD y la composición de los ácidos del mesocarpio del fruto no se conoce.

El objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de la herida y de la infección por patógeno sobre el estrés oxidativo, la actividad de la enzima SOD y la composición de los ácidos grasos del mesocarpio del fruto de aguacate.

MATERIALES Y MÉTODOS. Material vegetal y tratamientos experimentales. Todos los experimentos fueron realizados con frutos verdes de aguacate (*Persea americana* Mill cv Hass), obtenidos de mercados locales y usados inmediatamente para la experimentación. Para los experimentos por herida, frutos de aguacate fueron cortados en piezas de 0.5 g cada una e incubadas durante diferentes tiempos a temperatura ambiente. Después de la incubación el tejido se congelo en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para la infección por patógeno, se utilizó un aislado de *C. gloeosporioides* donado amablemente por el Dr. Rafael Salgado Garciglia del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México, el cual fue obtenido de frutos de aguacate con síntomas de infección. El hongo normalmente fue mantenido a 23°C en cajas Petri conteniendo papa-dextrosa-agar. Para la inoculación,

frutos de aguacate se desinfectaron con etanol al 70% durante 15 min y se lavaron con agua estéril. El patógeno se inoculó sobre el pericarpio del fruto con una suspensión de esporas (1×10^6 esporas por ml) y se incubó a temperatura ambiente durante diferentes tiempos (Beno-Moualem y Prusky, 2000). Como control, frutos fueron desinfectados e inoculados con agua estéril.

Ensayo para las especies reactivas de oxígeno. Para analizar la producción de $O_2^{\cdot -}$, a 0.5 g de tejido de mesocarpio se le adicionó una concentración final de 0.5 mM de XTT (sodium 3'-[1-[phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate; Sigma, St. Louis, MO). Las muestras fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente. Después de la incubación se tomó 1 ml del sobrenadante y se leyó su absorbencia a 470 nm en un espectrofotómetro (DU 680 spectrophotometer, Fullerton, CA, USA). Esta técnica se basa en la formación de formazan de XTT por la presencia del $O_2^{\cdot -}$ (Able *et al.*, 1998).

La producción de peróxido de hidrógeno se analizó de la siguiente manera: 0.5 g de tejido de fruto de aguacate se sumergió durante 10 min en 1 ml de agua desionizada. Después de este tiempo se tomó una muestra de 500 μ l y se incubó con un volumen igual con una mezcla de reacción que contenía: guayacol al 0.05% y peroxidasa de rábano (2,500 U/ml) disueltos en buffer de fosfato de sodio 25 mM, pH 7.0. La reacción se incubó durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción adquiere una coloración café y su absorbencia se mide inmediatamente a 450 nm (DU 680 spectrophotometer, Fullerton, CA, USA). El cálculo de concentración se hace a través de una curva estándar realizada con H_2O_2 comercial (Tiedemann, 1997).

Para analizar la posible fuente de ERO se usaron diferentes concentraciones de los compuestos *n*-propil galato, un inhibidor de las peroxidasas y difenil ioduro (DPI), un inhibidor del complejo enzimático NADPH oxidasa. 0.5 g de tejido se sumergieron en una solución con los inhibidores durante 30 min y después se analizó la producción de H_2O_2 .

Ensayo enzimático para la enzima superóxido dismutasa. La actividad enzimática se analizó de acuerdo a la técnica descrita por Beauchamp y Fridovich (1971). La actividad se determinó por la habilidad de la enzima superóxido dismutasa para inhibir la reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) por el anión superóxido. La mezcla de reacción del ensayo enzimático está compuesta de: buffer de fosfato 67 mM, pH 7.8, EDTA 100 mM,

riboflavina 120 mM, NBT 1.5 mM y extracto enzimático. La reacción se ilumina durante 10 min con una lámpara de 40 watts de luz fluorescente e inmediatamente se lee su absorbencia a 560 nm.

Ensayo en gel de la actividad superóxido dismutasa. Las proteínas de extractos de tejido de aguacate (100 µg por carril) se separaron en un gel nativo de electroforesis en poliacrilamida al 12% (p/v) (PAGE), bajo condiciones no desnaturalizantes a 50 V y 4°C. La actividad enzimática se detecto en el gel revelando de la siguiente manera: el gel se incubo en una solución compuesta de riboflavina 28 µM, TEMED 28 mM preparados en buffer de KPO₄ 32 mM, pH 7.8 durante 30 min en agitación, después se sustituyo la solución por otra que contenía NBT 2 mM preparado en buffer de KPO₄ 36 mM y se incubo durante 30 min en una lámpara de 40 watts. La actividad enzimática se observo como bandas acromáticas en el fondo azul intenso del gel (Beauchamps and Fridovich, 1971). El tamaño de las isoenzimas se estimo utilizando un estándar de marcador para proteínas nativas (Invitrogen). Además, las diferentes isoenzimas se identificaron con inhibidores específicos: KCN inhibe las enzimas que contienen Fe y Cu, y el H₂O₂ inhibe las que contienen CuZn (Alscher *et al.*, 2002). Para el ensayo con los inhibidores, después de la separación de las proteínas los geles fueron incubados con los diferentes inhibidores durante 30 min a temperatura ambiente y después se reveló la actividad como se describió anteriormente.

Análisis del contenido de ácidos grasos. La extracción de lípidos se realizó de acuerdo a Ortiz (2003). El fruto de aguacate fue previamente lavado con detergente y agua, después se retiro manualmente la cáscara, se removió la semilla y la pulpa (300g) se distribuyó en un recipiente para microondas en una capa uniforme de ~5 mm de espesor. Se encendió el microondas por 3 min a la máxima potencia. La muestra se removió del microondas y los lípidos se extrajeron por presionar el tejido manualmente a través de una malla de gasa.

Los ácidos grasos fueron preparados para su análisis por transesterificación con trifloruro de boro (BF₃) al 15 % en metanol (Tekanega *et al.*, 2008).

El contenido y la identificación de los ácidos grasos se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Agilent 6850 Series II; Agilent, Foster City, CA, U.S.A.) con un detector de ionización de flama y una columna HP-5MS, usando un programa de temperatura de temperatura inicial de 150°C por 3 min con un gradiente de

5°C/min a 270°C. El gas acarreador utilizado fue helio ultrapuro (1 ml/min). Los ácidos grasos fueron identificados por comparación con los espectros de masa de la librería NIST/EPA/NIH, ChemStation Agilent Technologies Rev. D.04.00 2002.

Análisis Estadístico. Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces utilizando cinco muestras en cada experimento. Los datos se expresan como media y desviación estándar.

RESULTADOS. Producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta al daño por herida. El estrés por herida en el mesocarpio del fruto indujo un incremento en la producción de anión superóxido, su cinética de acumulación mostró un incremento de tres veces en su acumulación 30 min después de la herida y después de este tiempo su acumulación decreció hasta alcanzar el valor de control (Fig. 1A). La acumulación de H_2O_2 mostró un comportamiento de acumulación similar al del $O_2^{\cdot-}$, se observó un incremento 15 min después de la herida y después decreció (Fig. 1B).

Para analizar la posible fuente de producción de ERO se utilizaron los inhibidores DPI, el cual inhibe el complejo enzimático NADPH oxidasa, y *n*-propil galato, el cual inhibe a la enzima peroxidasa. Cuando se aplicó el DPI se observó un decremento notable en la acumulación de H_2O_2 , pero no se observó cambio en su acumulación cuando se aplicó el *n*-propil galato (Fig. 2), este resultado sugiere que el complejo enzimático NADPH oxidasa participa en la producción de ERO durante la herida en el mesocarpio del fruto de aguacate.

Por otro lado, se observó un incremento en actividad para la enzima SOD a los 15 y 30 min después del tratamiento por herida, después de estos tiempos su actividad bajó 1 h después del tratamiento al nivel del control y a las 2 y 4 h se observó un ligero incremento en relación al control (Fig. 3).

El análisis isoenzimático para la enzima SOD reveló al menos cuatro bandas de actividad bien definidas, y de acuerdo a su tamaño y orden de migración en el gel no desnaturizante se nombraron: SOD1, 2, 3 y 4. Las cuatro bandas de actividad fueron observadas durante todo el tiempo de experimentación, pero la SOD2 mostró una banda de actividad más intensa (Fig. 4A). La caracterización del tipo de isoenzima utilizando los

inhibidores específicos para cada isoforma nos permitió distinguir que las SOD1,3 y 4 probablemente corresponden SOD que contienen CuZn en su estructura molecular y SOD2 corresponde a una SOD que contiene Mn (Fig 4B), porque no fue inhibida por ninguno de los compuestos inhibidores y esta es una característica ya conocida para este tipo de isoforma.

Producción de especies reactivas de oxígeno durante la infección con *C. gloeosporioides*. Se analizó la producción de ERO en respuesta a la infección en el tejido de mesocarpio del fruto de aguacate. Se observó un incremento en la acumulación de $O_2^{\cdot-}$ 1h después de la inoculación con esporas del patógeno y este incremento se mantuvo hasta las 48 h. Los controles tratados con H_2O mantuvieron niveles basales de acumulación en todos los tiempos de experimentación (Fig. 5A). El análisis de H_2O_2 mostró una cinética de acumulación de dos fases, la primera fase se observó entre las 2 y las 3 h después de la inoculación y la segunda fase entre las 12 y las 48 h después de la inoculación (Fig. 5B).

Análisis isoenzimático en tejido inoculado con *C. gloeosporioides*. Este análisis mostró el mismo patrón isoenzimático que en el tratamiento por herida, es decir, en el tratamiento por infección se observaron las 4 isoenzimas para SOD, pero a diferencia de la herida se observó una disminución de actividad en las 4 isoenzimas cuando se incrementó el tiempo de tratamiento (Fig. 6).

Contenido de ácidos grasos en respuesta a herida o infección por patógeno. Para realizar un estudio de acercamiento para saber si la herida o la infección pudieran tener un efecto en el perfil de lípidos en el mesocarpio del fruto de aguacate, se extrajeron los lípidos considerando los tiempos de máxima producción de ERO observados en los tratamientos por herida o infección por patógeno. La herida modificó notablemente el contenido de ácidos grasos 15 min después del tratamiento, el mismo efecto se observó para la infección por patógeno pero 3h y 12h después del tratamiento. Los ácidos grasos que mostraron una disminución drástica en su acumulación después de la herida o la infección, fueron los siguientes: palmitoléico, palmítico, oléico y linoléico. En contraste, se indujo la acumulación de los ácidos grasos esteárico y gadoleico en respuesta a ambos tratamientos (Tabla 1).

DISCUSIÓN. Nuestros datos muestran que la herida estimulo la producción de ERO en el mesocarpio del fruto de aguacate e identificamos que la posible fuente de producción es el complejo enzimático NADPH oxidasa, de acuerdo a los resultados obtenidos con el uso de inhibidores de las posibles fuentes de producción. Se ha reportado que la NADPH oxidasa es la fuente más importante de producción de ERO durante la explosión oxidativa en plantas. Esta enzima se localiza en la membrana plasmática y reduce el O_2 molecular utilizando el NADPH para formar $O_2^{\bullet-}$, el cual es utilizado como el compuesto inicial para la síntesis de otras especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2 , el $ONOO^-$ (peroxinitrito), el $OH^{\bullet}$ (radical hidroxilo), entre otros. Las ERO formadas a través de este mecanismo protegen a la planta en contra de patógenos activando una reacción hipersensible, la resistencia sistémica adquirida y el reforzamiento de la pared celular, formando una barrera mecánica para evitar la invasión del tejido (Glyan'ko *et al.*, 2010).

El incremento observado en la actividad de la enzima SOD pudiera tener un papel dual durante la aplicación de los dos tratamientos: por un lado es un mecanismo enzimático importante para proteger al tejido en contra del estrés oxidativo metabolizando el $O_2^{\bullet-}$, el cual es una molécula altamente oxidante, por otro lado puede contribuir a la producción de H_2O_2 el cual se utiliza por otras enzimas, como las peroxidases, para sintetizar compuestos que refuerzan las barreras físicas, como la lignina.

Por otra parte, se ha reportado que la explosión oxidativa es una de las primeras respuestas al ataque por patógenos en plantas. En este trabajo observamos una producción de H_2O_2 en dos fases en respuesta a la inoculación con el patógeno, en contraste en el pericarpio de aguacate verde inoculado con *C. gloeosporioides*, se observó una sola producción de H_2O_2 2 h después del tratamiento (Benito-Moualem y Prusky 2000). Se ha reportado que patógenos avirulentos normalmente inducen una acumulación bifásica de ERO con una primera fase corta y transitoria, seguida por una fase continua de mayor intensidad que correlaciona con la resistencia a la enfermedad (Lamb y Dixon, 1997; Torres *et al.*, 2006). El H_2O_2 se ha implicado en muchos procesos durante las interacciones de patógenos con las plantas. En las fases iniciales de la interacción está involucrado en las reacciones de defensa, posiblemente participando en rutas de señalización para activar los mecanismos de defensa, tales como la expresión de genes de defensa que codifican para

proteínas relacionadas a patogénesis (PR), enzimas involucradas en la síntesis de fitoalexinas y lignificación, entre otras (Alvarez et al., 1998; Apel y Hirt, 2004).

Colletotrichum gloeosporioides pertenece al grupo de patógenos conocidos como hemibiotróficos, estos patógenos son un grupo diverso de organismos con una fase inicial biotrófica cuando se establece la infección, seguida por una fase necrotrófica que es cuando el patógeno completa su ciclo de vida (Oliver e Ipcho, 2004). Se ha establecido una correlación entre el crecimiento del patógeno en los estados tardíos de su ciclo de vida y la acumulación de grandes cantidades de H_2O_2 durante este tipo de interacción. La habilidad para colonizar y proliferar en un medio ambiente con altas concentraciones de ERO muestran que los patógenos tienen sistemas eficientes que los capacitan para protegerse en contra de un medio ambiente adverso durante la patogénesis. De acuerdo con esto Goodwin *et al.* (2001) que clonaron un gen de catalasa de *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae*. Se sugiere que este tipo de genes se activan durante la fase necrotrófica de crecimiento para protegerlo de los efectos tóxicos del H_2O_2 .

Finalmente, observamos cambios en la composición de lípidos en respuesta a los tratamientos por herida e infección por patógeno. Algunos de los lípidos analizados forman parte importante de la composición de la membrana plasmática. Los lípidos de la membrana no solo funcionan como barreras pasivas hidrofóbicas para la separación del contenido celular del medio externo, sino que juegan un papel importante y activo en algunos procesos celulares. En las plantas estos procesos incluyen el anclaje de proteínas de membrana (Morita *et al.*, 1996), mediación en las cascadas de señalización celular (Munnik *et al.*, 1998) y activación de enzimas ubicadas en o cerca de la membrana (Munnik *et al.*, 1998). Específicamente, los ácidos grasos durante el estrés parecen contribuir a la liberación de ácido linoléico, el cual funciona como un modulador de la expresión de genes de defensa (Upchurch, 2008). La liberación de ácidos grasos de las membranas y su metabolismo para participar en cascadas de transducción de señales que conduce a la activación de respuestas de defensa es realizada por enzimas llamadas fosfolipasas (FL). Por ejemplo, la producción de ácido jasmónico en tejido vegetal herido procede del metabolismo del ácido linolénico, el cual se considera que se libera de los lípidos de la membrana por la acción de una enzima FL del tipo A (Creelman y Mullet, 1997). Otras evidencias indican que los tres tipos de FL que se conocen (FLA, FLC y FLD) están

involucradas en la percepción de patógenos por las células vegetales, si bien no se conoce con detalle cómo se coordina el proceso (Low y Schoeder, 1997).

Agradecimientos. Los autores agradecen a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH por el apoyo financiero otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

LITERATURA CITADA

Able AJ, Guest DI and Sutherland MW. 1998. Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenges with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. Plant Physiology 117:491-499.

Alscher RG, Erturk N and Heat LS. 2002. Role of superoxide dismutase (SOD) in controlling oxidative stress in plants. Journal Experimental Botany 53: 1331–1341.

Alvarez ME, Pennell RI, Meijer P-J, Ishikawa A, Dixon R and Lamb C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell 92:773–784.

Apel K and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373–399.

Beauchamp C and Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44:276–287.

Beno-Moualem D and Prusky D. 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. Phytopathology. 90:553-559.

Creelman RA and Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48:335-381.

Glyan'ko AK and Ischenko AA. 2010. Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidase: A Review. Applied biochemistry and microbiology 46:463-471.

Glyan'ko AK and Ischenko AA. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. Journal of Plant Biology 51:167-173.

Goodwin PH, Li J and Jin S. 2001. A catalase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* is highly expressed during the necrotrophic phase of infection of round-leaved mallow, *Malva pusilla*. FEMS Microbiology Letters, 202:103–107.

Lamb C and Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48:251–275.

Landhal S, Meyer MD and Terry LA. 2009. Spatial and temporal analysis of textural and biochemical changes of imported avocado cv. Hass during fruit ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57:7039-7047.

Low PS and Schoeder, A.T. 1997. Signal transduction pathways of the plant oxidative burst, in Plant- Microbe Interactions Vol. 3 (Stacey, G. and Keen, NT, eds), pp. 35-52, Chapman and Hall.

Morita N, Nakazato H, Okuyama H, Kim Y and Thompson GA. 1996. Evidence for a glycosylphosphatidylinositol-anchored alkaline phosphatase in the aquatic plant *Spirodella oligorrhiza*. Biochimica and Biophysica Acta 1290, 53-62.

Munnik T, Irvine RF and Musgrave A. 1998. Phospholipid signaling in plants. Biochimica Biophysica Acta 1389:222-272.

Oliver RP, and Ipcho SVS. 2004. Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 4, 347–352.

Ortiz Moreno A, Dorantes Lidia, Galindez J and Guzman, R.I. 2003. Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51: 2216-2221.

Shetty NP, Jorgensen HJL, Jensen JD, Collinge DB and Shetty HS. 2008. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121:267-280.

Tekenaga F, Matsuyama K, Abe S, Terai Y and Itoh S. 2008. Lipid and fatty acid composition of mesocarp and seed of avocado fruits harvest at northern range in Japan. *Journal of Oleo Science* 57:591-597.

Tiedemann AV. 1997. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50:151-166.

Torres MA, Jones JDG and Dangl JL. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141:373–378.

Upchurch RG. 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters* 30:967–977.

Leyenda de figuras

Fig. 1. Cinética de acumulación de especies reactivas de oxígeno después de la herida en mesocarpio de fruto de aguacate. A. Anión superóxido. B. Peróxido de hidrógeno.

Fig. 2. Caracterización de la fuente de producción de especies reactivas de oxígeno. El tejido de mesocarpio se trato previamente con herida durante 30 min. A. Inhibidor de la enzima NADPH oxidasa. B. Inhibidor de la enzima peroxidasa.

Fig. 3. Actividad total de la enzima superóxido dismutasa en respuesta al tratamiento por herida.

Fig. 4. Caracterización isoenzimática de superóxido dismutasas en tejido de mesocarpio en respuesta a la herida. A. Análisis isoenzimático en respuesta a la herida. B. Identificación del tipo de enzima utilizando inhibidores específicos.

Fig. 5. Cinética de producción de especies reactivas de oxígeno en mesocarpio en respuesta a la infección por *Colletotrichum gloeosporioides* (1×10^6 esporas por ml). A. Anión superóxido. B. Peróxido de hidrógeno. Barra negras, frutos inoculados; Barras, blancas, controles inoculados con agua destilada estéril.

Fig. 6. Análisis isoenzimático de superóxido dismutasas en tejido de mesocarpio en respuesta a la infección con *Colletotrichum gloeosporioides* (1×10^6 esporas por ml).

Fig. 1

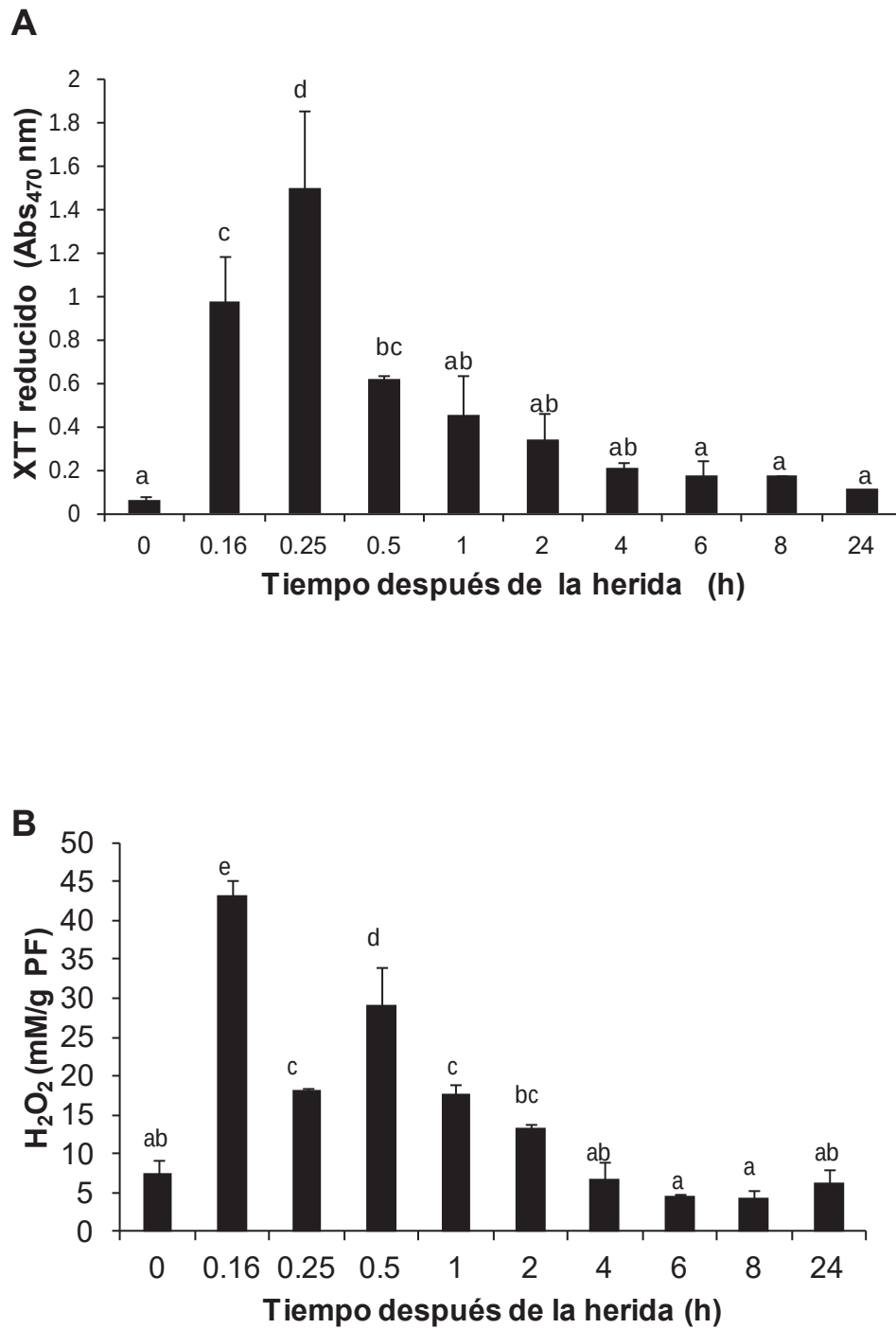


Fig. 2

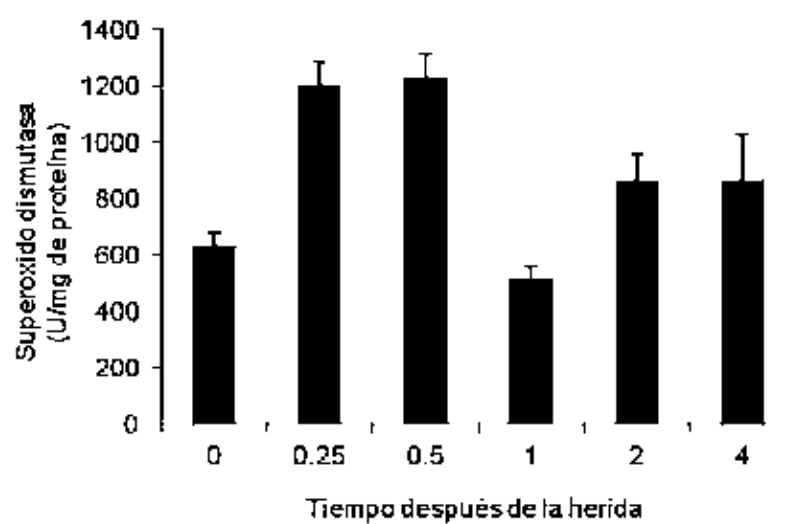


Fig. 3

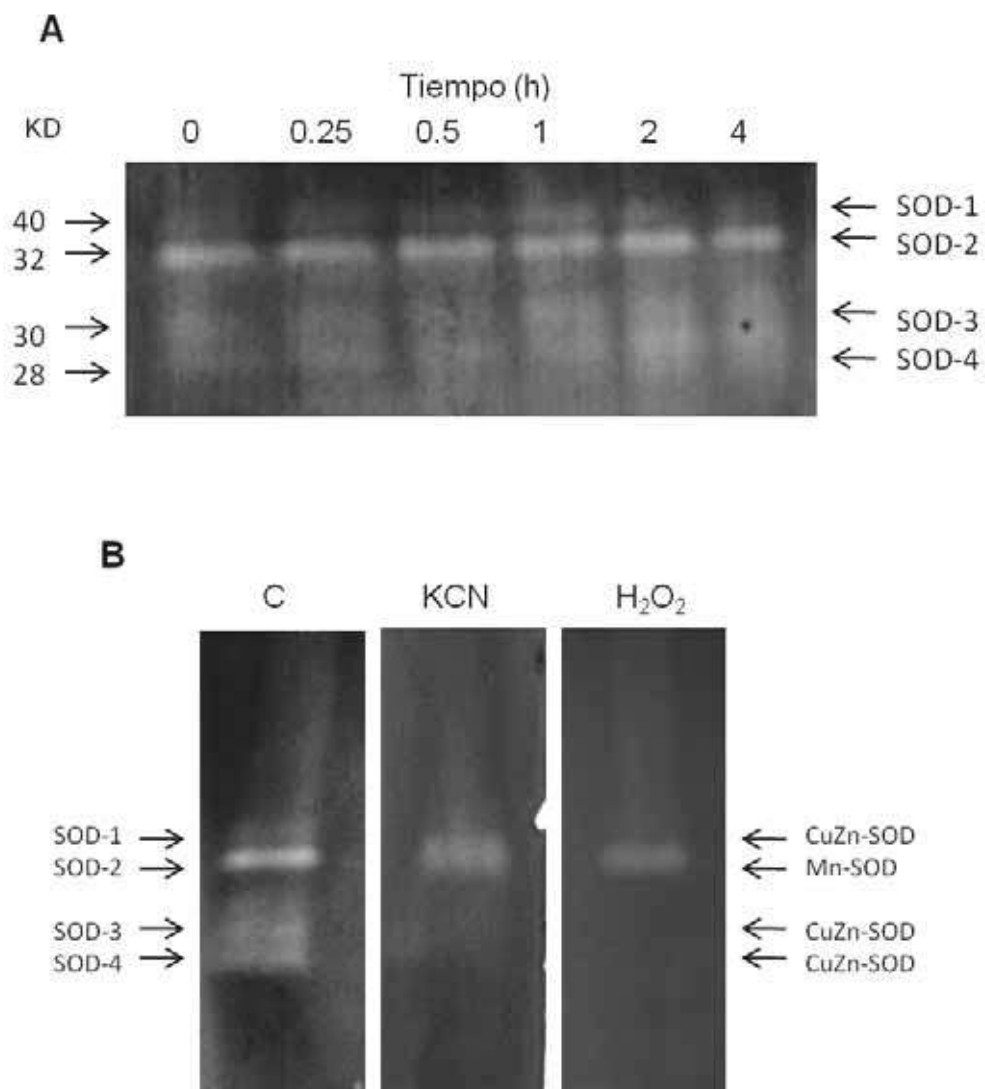
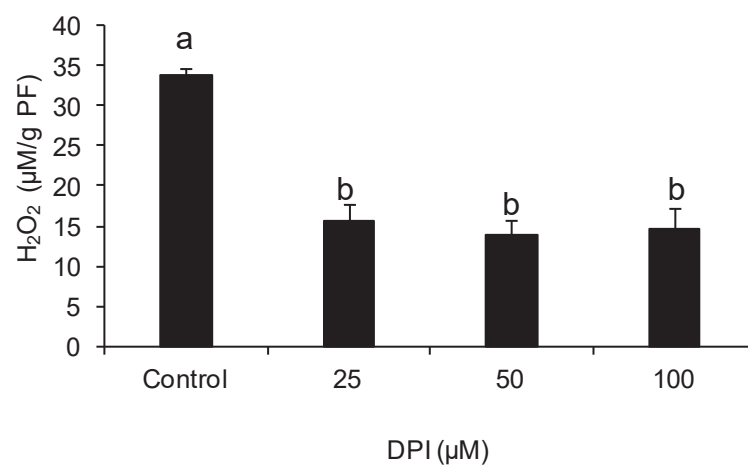


Fig. 4

A



B

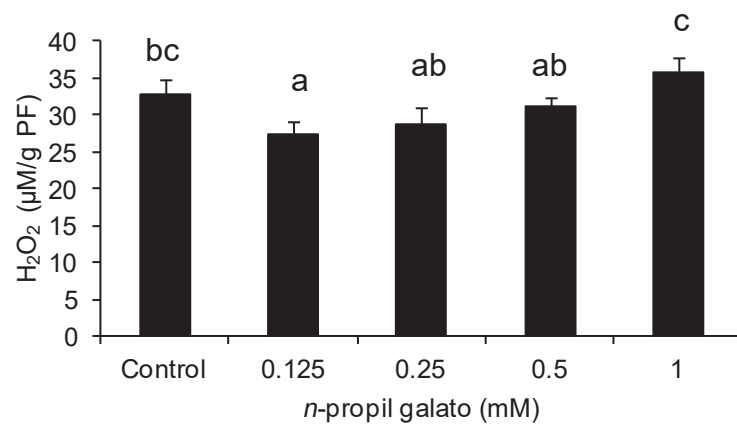
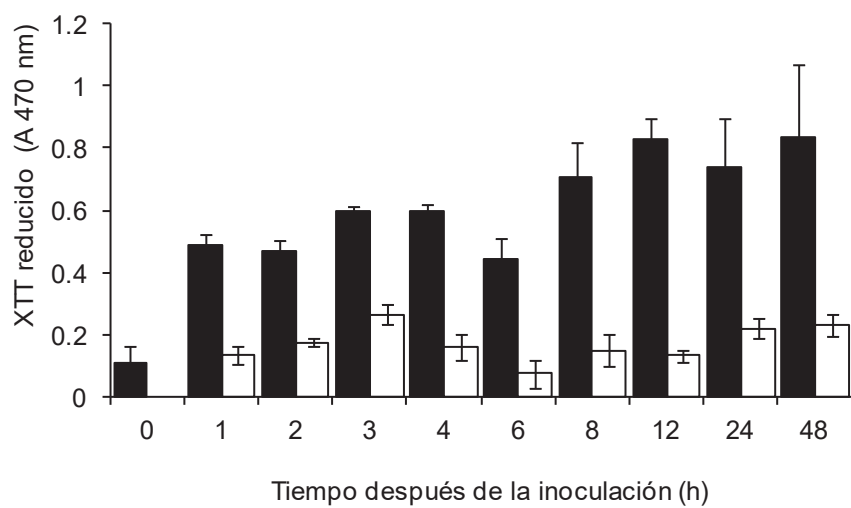


Fig. 5

A



B

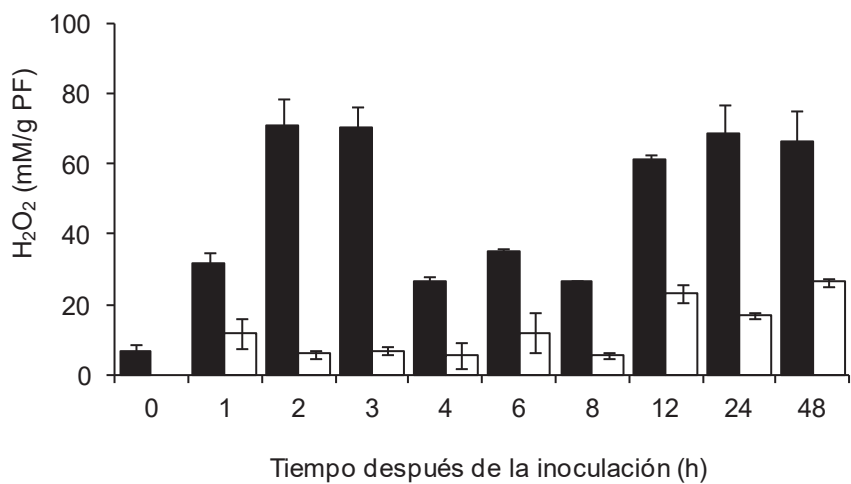


Fig. 6

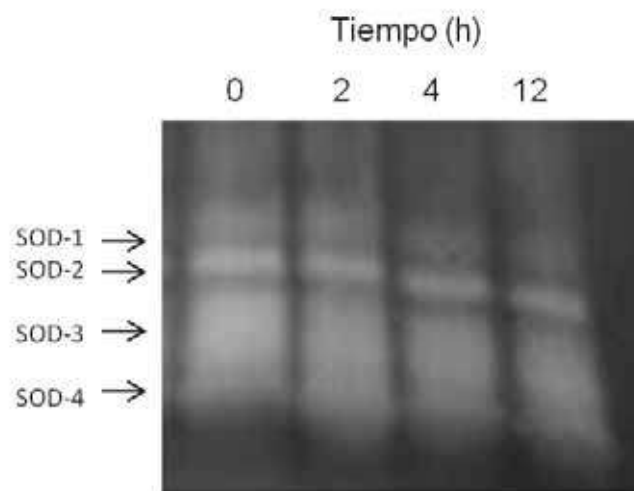


Tabla 1. Composición de ácidos grasos en fruto de aguacate en respuesta al tratamiento por herida o inoculación con *Colletotrichum gloeosporioides* ($\mu\text{g/g}$ PF)*.

Ácido graso		0	Herida	<i>C. gloeosporioides</i>	
			0.25	3	12h
Palmitoleico	16:1	939.29 $\pm$ 101.41	21.21 $\pm$ 1.41	31.18 $\pm$ 2.72	28.45 $\pm$ 5.75
Palmitico	16:0	1893.83 $\pm$ 127.25	50.82 $\pm$ 13.45	70.68 $\pm$ 6.67	70.86 $\pm$ 9.26
Oleico	18:1	3385.60 $\pm$ 282.69	197.15 $\pm$ 62.74	157.24 $\pm$ 140.27	270.21 $\pm$ 20.75
Linoleico	18:2	731.23 $\pm$ 92.26	18.54 $\pm$ 20.00	ND	ND
Esteárico	18:0	ND	2.41 $\pm$ 0.93	3.61 $\pm$ 0.48	3.20 $\pm$ 0.65
Gadoleico	20:1	ND	1.63 $\pm$ 0.05	1.74 $\pm$ 0.18	1.27 $\pm$ 0.29

* Los valores representan la media de tres experimentos independientes $\pm$ la desviación estándar; ND = No detectado.

CAPITULO II
ESTRÉS OXIDATIVO EN FRUTO DE AGUACATE DURANTE
ALMACENAMIENTO Y MADURACIÓN

The influence of ripening and refrigerated storage on oxidative stress and fatty acids content in avocado fruit.

Arreola-Cortés Araceli, Castro-Mercado Elda, García-Pineda Ernesto

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Edif. B1, Ciudad Universitaria, 58040, Morelia, Michoacán, México.

*Corresponding autor:

E. García-Pineda

Email: egpineda@umich.mx

Tel. +52 443 3265788

Abstract: The hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and fatty acids content during ripening and refrigerated storage was investigated in avocado fruit. Ripening induced an increase in the H_2O_2 production in time up to 72 h; in contrast levels of $\text{O}_2^{\cdot-}$ were similar until 48 h, but 72 h after ripening an important increase in $\text{O}_2^{\cdot-}$ production was observed. SOD activity of all isoenzymes observed notably decreased 72 h of ripening. Refrigerated storage stimulated the production of both, H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$, after incubation at 4°C. In this condition, the level of H_2O_2 notably increased at 24 h and thereafter decreased to basal level at 72 h and the concentration of $\text{O}_2^{\cdot-}$ was high in all times assayed. The content of fatty acid decreased in ripe fruit but not changes were observed during refrigerated storage.

Keywords Hydrogen peroxide, superoxide anion, avocado, ripening, cold storage.

INTRODUCTION

The avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass) is an important fruit cultivated in many tropical and subtropical countries. Increasing evidence of health benefits of the avocado is both driving increased consumption and stimulating research on potential health benefits [1]. One of its outstanding characteristics is its high lipid content. Monounsaturated fatty acids are the principal components of the lipid fraction, representing about 71% of total fatty acids [2]. High dietary intake of these fatty acids has been related to decreased risk of cardiovascular disease. In addition, avocados are a rich source of bioactive phytochemicals such as vitamin E, some carotenoids, vitamin C, phenols, and sterols (mainly B-sitosterol), among others [3].

The avocado fruit starts to ripen only after being detached from the tree. After harvest, the most obvious ripening change is the rapid transition of the mesocarp from a hard to a soft, butter-like consistency with an apparent total loss of structural integrity [4] Fruit ripening is accompanied by deterioration of cell membranes [5], but while loss of membrane integrity during ripening is well documented, the effect of ripening or cold storage, one of the most used methods to extend shelf life, on oxidative metabolism and fatty acids content has not

been studied on avocado fruit. Therefore, the aim of this work was to study the changes on oxidative burst and fatty acid content in avocado fruit during ripening and cold storage.

MATERIALS AND METHODS

Fresh avocado fruits (*Persea americana* Mill. cv Hass) were obtained from a local market and used immediately. Fruits free of visual defects and uniform in color and size were selected. To analyze the effect of ripening or refrigerated storage on oxidative burst and fatty acid content avocado fruits were incubated different times at room temperature (20-23°C) or different times at 4°C then were cut at 0.5g following frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until the assays.

To superoxide anion assay the tissue (0.5 g) was incubated in 0.5 mM XTT (sodium 3'-[1-[phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate; Sigma, St. Luis. MO) for 10 min at room temperature and then the absorbance was read at 470 nm. This procedure is based in the reduction of the XTT sodium salt by superoxide anion to formazan hidrosoluble (orange) [6].

To assay H₂O₂ production, tissue (0.5 g) was incubated in 1 mL deionised water for 10 min and then 500 µL were incubated with mixture reaction (0.05% guaiacol (440 µl L⁻¹), horseradish peroxidase (350 µL/L; 2500 U/ml) in 25 mM sodium phosphate pH 7.0 for 15 min in the dark and then the absorbance was read to 450 nm. The concentration of H₂O₂ in the samples was determinated by a standard curve of commercial H₂O₂ [7].

SOD isoenzymes were separated by native PAGE on 10% acrylamide gels and visualized by a photochemical method which is based on the inhibition by SOD of the reduction of nitroblue tetrazolium by superoxide radicals producing achromatic bands in the gel [8].

To oil extraction, avocado pulp (300 g) was spread on the rotator plate of a domestic microwave to form a uniform layer of ~ 5 mm thick. The sample was removed from de plate and the oil extracted by squeezing, pressing the pulp manually through a cloth mesh [9]. Fatty acid methyl esters were prepared by transesferification with 15%-BF₃ (Boron triflouride) in methanol using C_{17:0} (SIGMA Aldrich USA) as standard [10]. Fatty acids were analyzed by gas chromatography (Agilent 6850 Series II; Agilent, Foster City, CA, U.S.A.) coupled to a mass spectrometer (Agilent 5973). The compounds were identified by

comparison with mass spectra from the library (NIST/EPA/NIH, “ChemStation” Agilent Technologies Rev. D.04.00 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

Ripening enhanced the levels of both, H_2O_2 and O_2^- , reaching the maximum level at 72 h of ripening (Fig 1A, B), when the fruit is soft and the skin fully dark. At least 4 isoenzymes to SOD were observed by native gel electrophoresis and their activity notably decreased 72 h of ripening (Fig 1C).

There was a significant increase in H_2O_2 and O_2^- production (Fig 1D and 1E) 12 h after refrigerated storage at 4°C. Hydrogen peroxide production showed an additional increase at 24 h and thereafter decreased to control levels. Superoxide anion production was maintained higher than control during the experiment, 72 h at 4°C.

We analyze if ripening or refrigerated storage affects the concentration of saturated and unsaturated fatty acids (Table 1). Changes in concentration of some fatty acids were observed between unripe and ripe stages, but just slightly decreases in concentration to the same fatty acid were observed in ripe fruit. Oleic (C18:1) acid was found to be the major fatty acid in avocado, followed by palmitic (C16), linoleic (C18:2) and palmitoleic (C16:1) acids. When the content of fatty acid was compared between refrigerated storage and room temperature no changes in the profile and the concentration of fatty acids were observed.

The study of the oxidative metabolism and fatty acid content in avocado fruit during ripening and refrigerated storage is important because the nutritional value of the fruit is dependent of the quality of their fatty acid which could be affected by the ripening process or refrigerated storage. In our study we observed that although the oxidant species hydrogen peroxide and superoxide anion increased during ripening or refrigerated storage did not affect either the profile or concentrations of fatty acids.

Acknowledgments This research was supported by the Consejo de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., México.

REFERENCES

- [1] Lu QY, Zhang Y, Wang Y, Wang D, Lee RP, Gao K, and Byrns R, Haber D. California Hass avocado: Profiling of carotenoids, tocopherols, fatty acid, and content during maturation and from different growing areas. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 10408- 10413.
- [2] Plaza L, Sánchez-Moreno C, De Pacual-Teresa S, De Ancos B, Cano MP. Fatty acids, sterols, and antioxidant activity in minimally precessed avocados during refrigerated storage. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 3204-3209.
- [3] Ding H, Chin YW, Kinghorn AD, D'Ambrosio SM. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Sem Cancer Biol* 2005; 17: 386-394.
- [4] Awad M, Young RE. Postharvest variation in cellulose, polygalacturonase, and pectinmethylesterase in avocado (*Persea americana* Mill, cv Fuerte) fruits in relation to respiration and ethylene production. *Plant Physiol* 1979; 64: 306-308.
- [5] Ferrie BJ, Beaudoin N, Burkhart W, Bowsher CG, Rothstein SJ. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol* 1994; 106: 109-118.
- [6] Able AJ, Guest DI, Sutherland MW. Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. *Plant Physiol* 1998; 117: 491- 499.
- [7] Tiedeman AV. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 1997; 50: 151-166.
- [8] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971; 44: 276-287.
- [9] Ortiz MA, Dorantes AL, Galindez J, Guzmán GRI. Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill) oil. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 2216-2221.

- [10] Tekenaga F, Matsuyama K, Abe S, Trrii Y, Itoh S. Lipid and fatty acid composition of mesocatp and seed of avocado fruits harvest at northern range in Japan. J Oleo Sci 2008; 57: 591-597.

Figure legends

Fig. 1. Oxidative stress during ripening and refrigerated storage in avocado fruit. H_2O_2 (A), and O_2^- (B) production and SOD activity (C) at different times of ripening, and H_2O_2 (D) and O_2^- (E) production at different times of refrigerated storage. Each bar represents the mean of three independent experiments with SE.

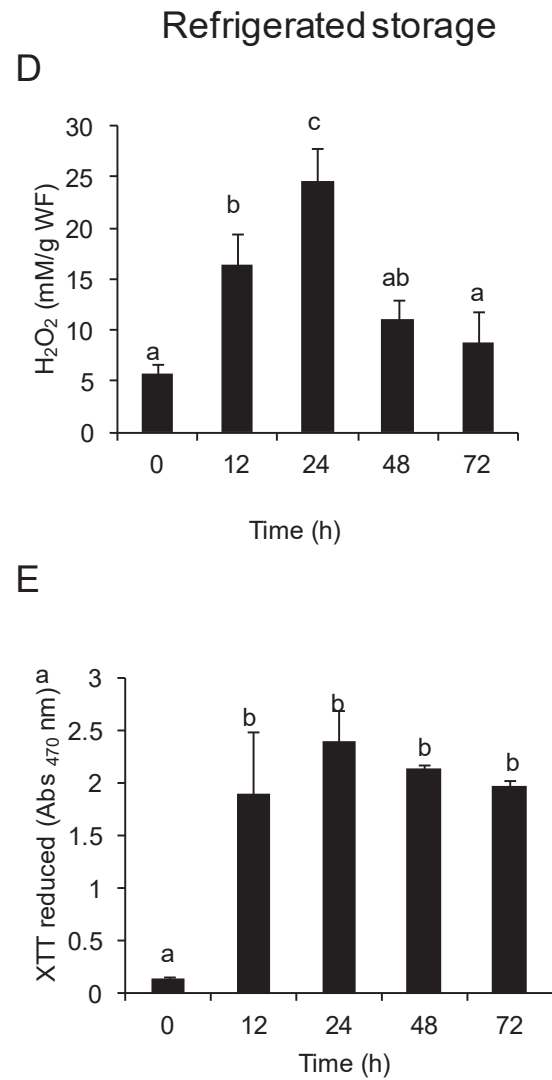
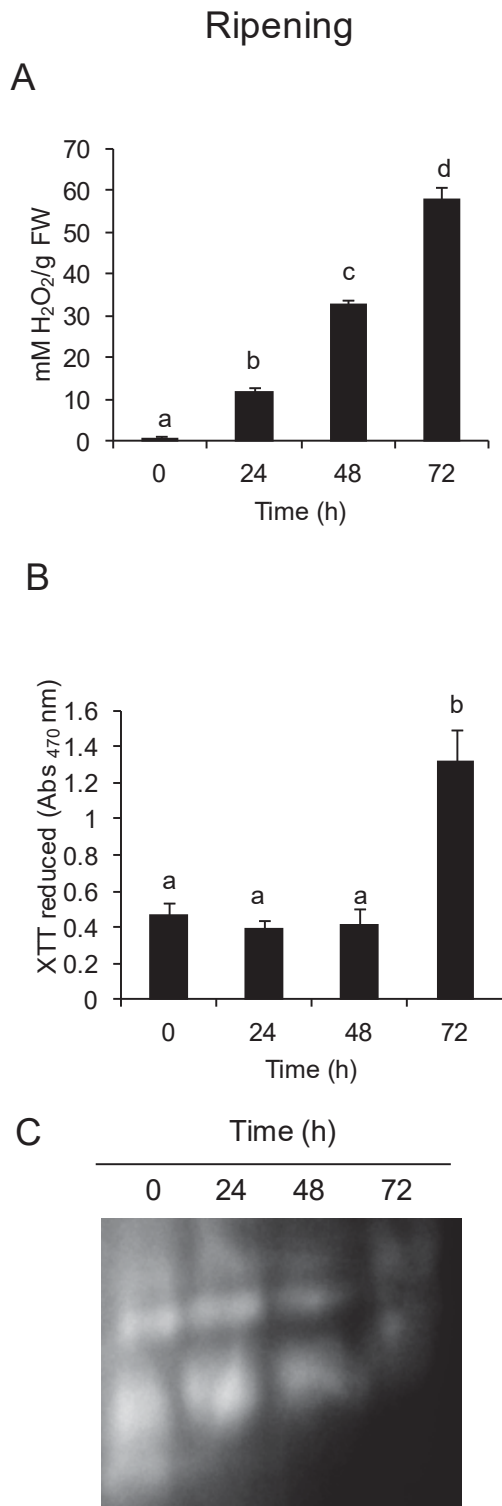


Table 1. Fatty acid composition of avocado fruit during ripening and refrigerated storage at 4°C (µg/g WF)^a.

Fatty acid		unripe	ripe	4°C	24°C
Palmitoleic acid	16:1	939.296 ± 101.416	761.723 ± 72.539	935.549 ± 135.612	952.776 ± 72.312
Palmitic acid	16:0	1893.835 ± 127.252	1537.045 ± 202.665	1951.863 ± 188.776	1852.163 ± 73.375
Oleic acid	18:1n9	3385.602 ± 282.691	2679.226 ± 613.852	3482.273 ± 498.486	3801.768 ± 470.927
Linoleic acid	18:2n9,12	731.234 ± 92.263	477.736 ± 64.048	849.736 ± 141.770	790.454 ± 124.224
	18:1n7	55.720 ± 12.031	ND	463.594 ± 56.650	521.226 ± 30.329
Stearic acid	18:0	ND	ND	57.706 ± 15.319	55.720 ± 12.031

^aValues are the mean of three independent determinations ± standard deviation. ND = No detected.

CAPÍTULO III
SUPEROXIDO DISMUTASA EN FRUTO DE AGUACATE DURANTE EL
DAÑO POR HERIDA



Arreola-Cortés et al.



ISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN ADNc QUE CODIFICA PARA UNA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE FRUTOS AGUACATE (*Persea americana* Mill. cv Hass) TRATADO POR HERIDA.

¹Arreola-Cortés Araceli, ¹Castro-Mercado Elda, ²Lozoya-Gloria Edmundo y ¹García-Pineda Ernesto.

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas UMSNH Edificio A1'CU Av. Fco. J. Mujica S/N. Morelia Michoacán México. Tel/Fax: 01 443 3 26 57 88. araac2001@yahoo.com, eldacm@yahoo.com, egpineda@zeus.umich.mx, ²CINVESTAV Campus Guanajuato, Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León. Irapuato Guanajuato México, Tel/Fax: 01 462 62 39 600. elozya@iracinvestav.mx.

RESUMEN

Las superóxido dismutasas (SOD) son una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación de anión superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2), constituyen la primer línea de defensa contra el estrés oxidativo. Hay tres tipos de SOD, de acuerdo al metal cofactor presente en su sitio activo: de hierro (Fe-SOD), de manganeso (Mn-SOD), y de cobre y zinc (CuZn-SOD). En plantas superiores se han localizado isoenzimas de SOD en diferentes compartimentos celulares. La isoenzima Mn-SOD se encuentra en mitocondrias y peroxisomas, la de Fe-SOD en cloroplastos y peroxisomas y la de CuZn-SOD en cloroplastos, citosol, peroxisomas y apoplasto. Durante la herida en plantas hay una producción transitoria de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la enzima CuZn-SOD podría participar durante su producción en el apoplasto. Un ADNc parcial de 340 pb fue aislado por RT-PCR de frutos de aguacate tratados por herida usando oligonucleótidos específicos diseñados de regiones conservadas de CuZn-SOD. El fragmento clonado tuvo homología para una CuZn-sod de plantas. Al menos dos genes fueron observados por análisis Southern blot. Por otro lado se diseñaron oligonucleótidos específicos para llevar a cabo el análisis de la expresión del gen por medio de RT-PCR en tiempo real mostrando un aumento del transcrito a las dos horas después del tratamiento. En mesocarpo de frutos de aguacate se observó una disminución de la actividad enzimática en extractos totales y en extractos del fluido apoplástico una hora después del tratamiento con herida.

Palabras claves: Superóxido dismutasa, especies reactivas de oxígeno y aguacate.

INTRODUCCIÓN

La enzima superóxido dismutasa constituye la primer línea de defensa contra el estrés oxidativo, cataliza la conversión de anión superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Ha sido aislada y caracterizada de una amplia variedad de organismos. Basándose en

el metal cofactor usado por la enzima, las SOD's se clasifican en tres grupos: SOD de hierro (Fe-SOD), SOD de manganeso (Mn-SOD) y SOD de Cu más Zn (CuZn-SOD), las tres son localizadas en diferentes compartimentos celulares en plantas superiores: Fe-SOD's son localizadas en



Arreda-Cortés et al

cloroplastos, Mn-SOD en la mitocondria y peroxisomas y CuZn-SOD en los cloroplasto, citosol y posiblemente en el espacio extracelular. Las SOD's extracelulares han sido descritas previamente en células animales; pero en plantas, poco se sabe acerca de estas enzimas, se han descrito previamente en espinacas, pino y algodón (Kim et al., 2008).

Dentro de la vecindad inmediata a un sitio de herida causada por daño mecánico o por herbívoros se activan una serie de reacciones metabólicas relacionadas con la respuesta a la misma. Actualmente se sabe que el tejido aéreo lejano al sitio de herida también percibe y responde a las señales generadas por la herida (Bruxelles y Roberts, 2001). Hay un amplio número de patógenos oportunistas de plantas que son capaces de ingresar a través del sitio de herida, por lo que una de las principales funciones de las células intactas alrededor del área dañada es formar una barrera física para restringir la invasión del patógeno. El reforzamiento de la pared celular es activado rápidamente a través de la oxidación de las proteínas existentes en la pared celular, lo cual solo toma unos cuantos minutos después de la herida.

Otras respuestas de defensa localizadas en la herida incluyen la producción de polímeros derivados de compuestos fenólicos tales como la lignina y suberina que están involucrados en el cierre del sitio de herida para evitar la infección y la pérdida de agua. Las células localizadas alrededor de la herida sintetizan inmediatamente polímeros de callosa β -1,3-glucano. La expresión de genes de defensa es medida primariamente por la síntesis y acción de ácido jasmonico,

etileno y ácido abscísico. Los eventos tempranos conocidos, detectan heridas e incluyen flujo de iones a través de la membrana plasmática, cambios en la concentración de calcio citoplásmico, la generación de especies reactivas de oxígeno (incremento de O_2^- , H_2O_2 y radical hidroxilo) y cambios en la fosforilación de proteínas. La generación de H_2O_2 a partir de O_2^- procede espontáneamente *in vitro*, pero en el apoplasto esta requiere la catálisis por superóxido dismutasa.

Además el H_2O_2 es una de las moléculas señal que activa respuestas de defensa al estrés abiótico y biótico por lo que esta enzima puede tener un papel importante en la respuesta a estrés.

México representa el productor número uno del mundo de aguacate (con una producción del 21%, se estima que en el 2009 México produzca 1 187 934 ton. de las cuales se estima que Michoacán produzca 1 037 946 ton (SAGARPA 2009). Dentro de los atributos de calidad de los frutos frescos se incluyen la apariencia, textura, sabor y valor nutritivo.

Una vez que el fruto ha sido cosechado la calidad del mismo puede verse afectado por diversos factores que incluyen daño físico ocasionados por golpes, daño mecánico y por herida. En estudios previos en el laboratorio se analizó la acumulación de O_2^- , H_2O_2 por tinción histoquímica de fruto de aguacate después del tratamiento por herida, encontrando la mayor acumulación de O_2^- a los treinta minutos después del tratamiento y a la acumulación de H_2O_2 después de los treinta minutos. Además se analizaron las isoenzimas presentes en frutos de aguacate tratados por herida usando inhibidores específicos, encontrando dos isoenzimas de CuZn-SOD y una Mn-SOD. La finalidad de este trabajo es clonar y caracterizar la expresión



de una CuZn-SOD involucrada en el daño por herida en frutos de aguacate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos de aguacate (*Persea americana* Mill cv Hass), fueron obtenidos en los mercados locales. Tejido del mesocarpio del fruto de aguacate fue cortado en trozos de 50 mg y se dejó incubar a diferentes tiempos (0, 15, 30 y 120 minutos) a temperatura ambiente. El RNA se extrajo con RNeasy Plant Mini Kit de la marca Qiagen (Valencia, CA, USA) del mesocarpio de fruto de aguacate después del tratamiento de estimulación por herida.

Las reacciones de RT-PCR se realizaron con el SuperScript First-Strand Synthesis System RT-PCR (Invitrogen, CA, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Haciendo un alineamiento de secuencias de CuZn-sod genes del Gene Bank se diseñaron oligonucleótidos en base a las regiones conservadas DSod1: AAG AAA GCT GTT GCA/T GTT CTT (directo), RSod2: GGI CCA GTT AA/GT/A GG A/T ATC TG (reverso). Los cuales se utilizaron para hacer reacciones de RT-PCR de ARNm de frutos de aguacate a diferentes tiempos después de la herida, los PCR se realizaron con PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5 min., 35 ciclos: 94°C un minuto, 50°C por un minuto y 72°C por un minuto, finalmente una extensión a 72°C por 5 minutos. El fragmento amplificado fue clonado en Zero Blunt TOPO para productos de PCR (Invitrogen, CA, USA), la reacción se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante.

El ADN fue extraído con Dneasy Plant Midi kit de Qiagen (Valencia CA, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Muestras de 30 µg de ADN fueron digeridas con las enzimas de restricción EcoRI, BamHI y PstI, los fragmentos fueron fraccionados en un gel de agarosa al 0.8 %, transferidos en una membrana Hybond-N+ (Amersham pharmacia biotech, Irlanda) e hibridado con el fragmento clonado marcado radiactivamente. El muestreo radiactivo del fragmento clonado se realizó con Rediprime II Random primer Labelling Sytem (Amersham UK).

Extractos enzimáticos se obtuvieron de mesocarpio de fruto de aguacate después del tratamiento con herida (0, 0.5, 1 y 2 horas) de acuerdo al protocolo establecido por Gupta et al, (1993), para la extracción del fluido apoplástico se realizó con algunas modificaciones de acuerdo a Córdoba et al. (1996); se cuantificó el contenido de proteína de los extractos enzimáticos obtenidos utilizando el método de Bradford y la actividad enzimática de superóxido dismutasa se determinó de acuerdo al protocolo reportado en www.worthington-biochem.com/SODBE/assay.html.

La actividad para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fue determinada como un control de contaminación citosólica para los extractos obtenidos del fluido apoplástico. Para el análisis de las isoenzimas se realizaron geles de poliacrilamida no desnaturizante al 12 % en donde se aplicaron 100 µg de proteína, para determinar la actividad el gel se sumergió en una solución que contenía KH₂PO₄ 32 mM, pH 7.8, riboflavina 28 µM y TEMED 28 mM durante 30 minutos en agitación, el líquido se reemplazó por la solución de KH₂PO₄ 36 mM, pH 7.8, NBT 2 mM incubándolo por 30 minutos



Arreola-Cortés et al

manteniendo el gel iluminado en una lámpara de 40 Watts hasta la aparición de bandas acromáticas características de la actividad de superóxido dismutasa (González *et al.*, 1998).

Se identificaron las isoenzimas de superóxido dismutasa tratando los geles de poliacrilamida no desnaturalizante con los inhibidores KCN y H_2O_2 , incubando los geles por 30 minutos y revelando su actividad, el análisis de las isoenzimas se basó en la inhibición diferencial de la actividad de superóxido dismutasa: KCN inhibe la Cu-Zn SOD y el inactiva la Cu-Zn SOD y la Fe-SOD (Alscher *et al.*, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se amplificó un fragmento de 342 pb por RT-PCR quince minutos después del tratamiento con herida (Fig. 1A). El fragmento fue clonado en TOPO Zero blunt, secuenciado y denominado *Sodpa* (Fig. 1B). El análisis de la secuencia mostró tener homología con una *Cu/ZnSod* (Tabla 1). El análisis de la expresión por RT-PCR en tiempo real mostró un aumento de la acumulación del transcrito a las dos horas después del tratamiento con herida (Fig. 2). De acuerdo a lo reportado para una CuZn-SOD de apoplasto de chicharo denominada *PscuZn-SOD1* la acumulación del transcrito fue inducido por herida después de las tres horas al tratamiento (Kasai *et al.*, 2006), además una CuZn-SOD de cotiledones de *Pinus sylvestris* denominada *hpf-SOD* fue inducida a partir de la hora y media después del tratamiento con herida (Karpinska *et al.*, 2001).

El fragmento clonado fue utilizado para hacer un análisis de

Southern blot. Se observaron al menos dos copias del gene (Fig. 3). En *Arabidopsis thaliana* se reportaron dos CuZn-SOD denominadas *CSD1* y *CSD2* y por análisis Southern blot se encontraron dos copias para cada una (Alscher *et al.*, 2002). El aguacate, al igual que lo observado en otras plantas, contiene más de un gen para SOD. Actualmente está en proceso la obtención del ADN completo para el gen, así como la caracterización de su expresión bajo estimulación por herida.

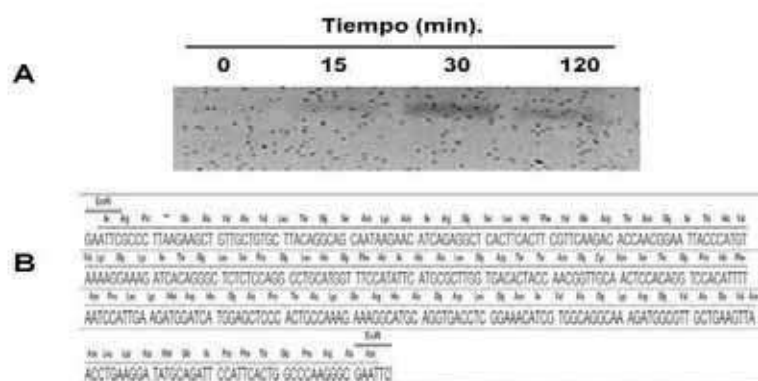
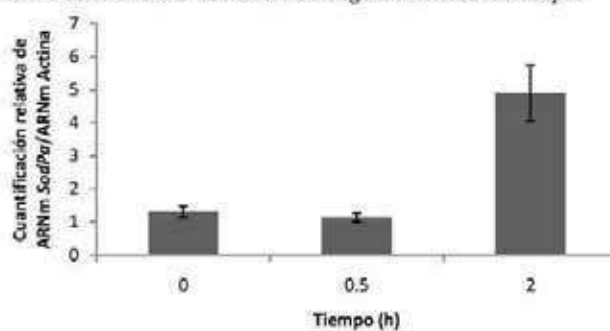
Durante el transcurso por herida se observaron cuatro isoenzimas de superóxido dismutasa en forma de bandas acromáticas en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, denominadas SOD 1, SOD 2, SOD 3 y SOD 4 (Fig. 4A) observándose estas cuatro isoenzimas en los extractos totales. La mayor actividad se observó a los 30 minutos después del tratamiento con herida en los extractos totales, fluido apoplástico y en el tejido donde se extrajo el fluido apoplástico, además de observarse una disminución a la hora después del tratamiento (Fig. 4A, 4B y 5A). Las isoenzimas observadas en el fluido apoplástico fueron tres SOD 1, SOD 2 y SOD 4. Para analizar el grado de contaminación citosólica del fluido apoplástico se determinó la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el fluido apoplástico y no se observó actividad de esta (datos no mostrados), por otro lado los análisis de la actividad en el tejido donde se extrajo el fluido apoplástico muestran las 4 isoenzimas.



Arreola-Cortés et al.

Tabla 1. Porcentaje de identidad entre *Sodpa* y diferentes secuencias de CuZn *sod*

Organismo	Gene (No. De acceso)	% de identidad
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	SOD2 (AF03483.1)	76
<i>Populus tremula</i>	hipl-SOD1 CuZn SOD (AJ278671.1)	75
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CSD3(NM_121815.3)	70

**Figura 1.** A Reacciones de RT-PCR de ARNm de frutos de aguacate a diferentes tiempos después del tratamiento con herida. B Secuencia de oligonucleótidos de *Sodpa*.**Figura 2.** Abundancia relativa de transcrito de *SodPa* en mesocarpio de frutos de aguacate después del tratamiento por herida.

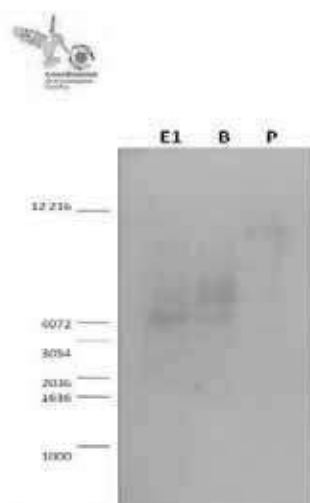


Figura 3. Análisis Southern blot de ADN genómico de aguacate. El ADN fue extraído e incubado con las diferentes enzimas de restricción. E1: *EcoRI*, B: *BamHI*, P: *PstI*.

En chicharo se ha reportado actividad para *PcCuZn* SOD de 64 kDa en fluido apoplástico, la actividad aumento después del tratamiento con un estimulador de la respuesta de defensa (Kasai *et al.* 2006), por lo que se sugiere que la superóxido dismutasa tiene un papel muy importante en la respuesta durante el estrés biótico y abiótico. Utilizando los inhibidores KCN y H_2O_2 , se sugiere que las isoenzimas denominadas SOD1, SOD3 y SOD4 son *CuZn* SODs porque se inhiben con KCN y se inactivan con H_2O_2 y la SOD2 es una *Mn* SOD porque no se inhibe con los compuestos anteriores (Figs. 4C y 4B).

Los ensayos de actividad por espectrofotometría utilizando diferentes concentraciones de inhibidores muestran una disminución de la actividad total de los extractos del fluido apoplástico en las

Arreola-Cortés *et al.*

concentraciones usadas. Lo que sugiere que las isoenzimas presentes en apoplasto son dos *CuZn* SODs y una *Mn* SOD y participen en la producción de H_2O_2 durante el estrés provocado por herida.

Referencias

- ALSCHER RG, ERTURK N, HEATH LS. 2002. ROLE OF SUPEROXIDE DISMUTASES (SODS) IN CONTROLLING OXIDATIVE STRESS IN PLANTS. JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY. 53(372):1331-1341.
- BRUXELLES GL, ROBERTS MR. 2001. SIGNALS REGULATING MULTIPLE RESPONSES TO WOUNDING AND HERBIVORES. CRITICAL REV. PLANT SCIENCE 20 (5): 487-525.
- CORDOBA PM, GONZALEZ RJ, CAÑADILLAS M, NAVA P, CORDOBA F. 1996. ROLE OF APOPLASTIC AND CELL-WALL PEROXIDASES ON THE STIMULATION OF ROOT ELONGATION BY ASCORBATE. PLANT PHYSIOL. 112:119-1125.
- GONZALES A, STEFFEN LK, LYNCH PJ. 1998. LIGHT AND EXCESS MANGANESE IMPLICATIONS FOR OXIDATIVE STRESS IN COMMON BEAN. PLAN PHYSIOL. 118:493-504.
- GUPTA SA, WEBB PR, HOLADAY SA, ALLEN DR. 1993. OVERSPRESSION OF SUPEROXIDE DISMUTASE PROTECTED PLANTS FROM OXIDATIVE STRESS. PLANT PHYSIOL. 103:1067-1073.
- KARPINSKA B, KARLSSON M, SCHINKEL H, STRELLER S, SUSS KH, MELZER M, WINSLE G. 2001. A NOVEL SUPEROXIDE DISMUTASE WITH A HIGH ISOELECTRIC POINT IN HIGHER PLANTS: EXPRESSION, REGULATION AND PROTEIN LOCALIZATION. PLANT PHYSIOL. 26:1668-1677.
- KASAI T, SUZUKI T, ONO K, OWAGA K, INAGATI Y, ICHINOSE Y, TOUYODA K, SHIRASHI T. 2006. PEA EXTRACELLULAR *CuZn*-SUPEROXIDE DISMUTASE RESPONSIVE TO SIGNAL MOLECULES FROM A FUNGAL PATHOGEN. J. GEN. PLAN. PATHOL. 72:265-272.
- KIM HJ, KATO N, KIM S, TRIPLETT B. 2008. *CuZn* SUPEROXIDE DISMUTASES IN DEVELOPING COTTON FIBERS: EVIDENCE FOR AN EXTRACELLULAR FORM. PLANTA 228:281-292.

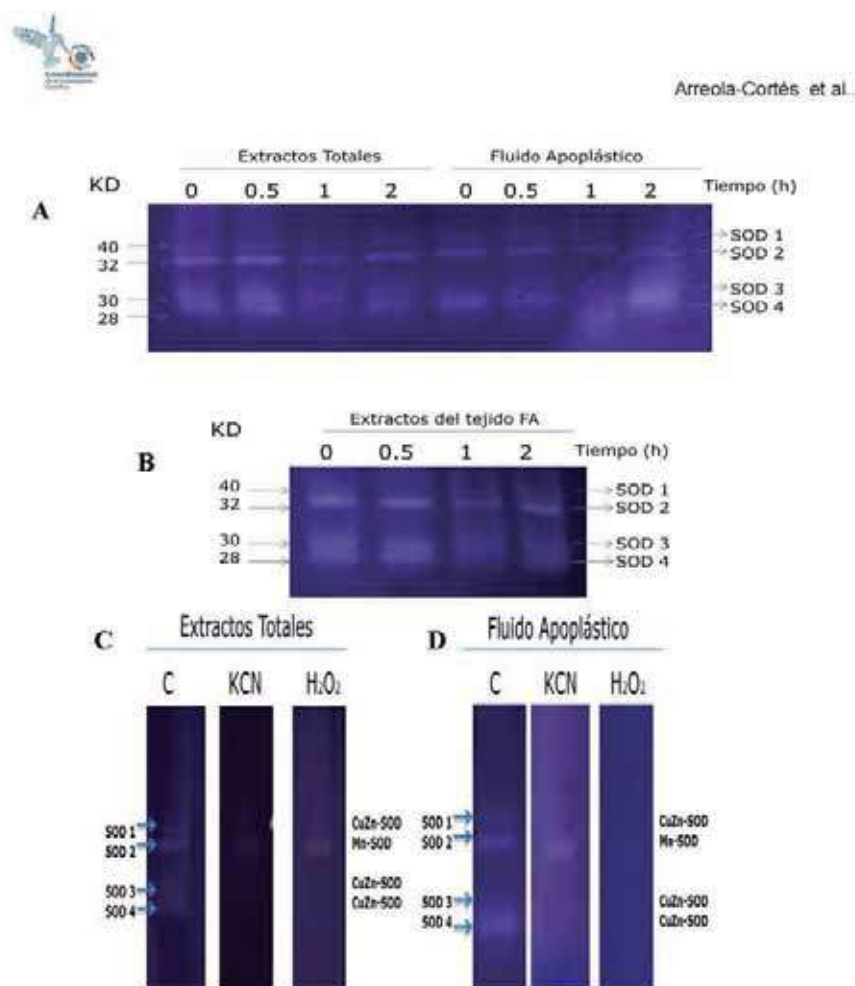


Figura 4. Actividad de superóxido dismutasa en geles de poliacrilamida no desnaturalizante. *A:* Actividad de extractos totales y fluido apoplástico de mesocarpo de frutos de aguacate después del tratamiento por herida. *B.* Extractos del tejido infiltrado después del tratamiento con herida. *C y D* Análisis de las isoenzimas utilizando inhibidores. *C:* extractos totales y *D:* Fluido apoplástico.



Arreola-Cortés et al.

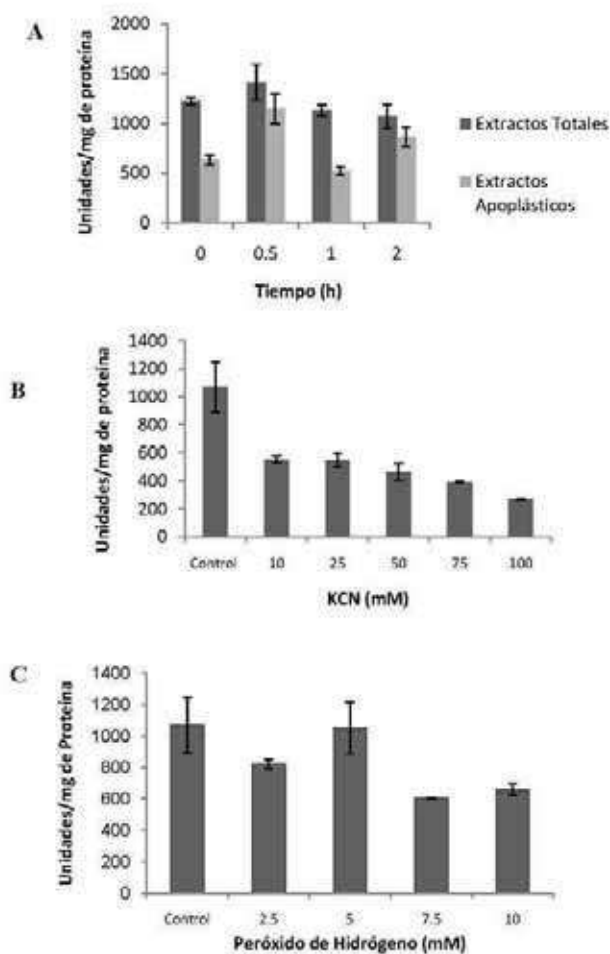


Figura 5. Actividad de superóxido dismutasa de mesocarpio de frutos de aguacate después del tratamiento con herida. A: Actividad en extractos totales y extractos apoplásticos. B: Actividad de SOD en extractos apoplásticos después de 30 minutos de la herida.

CAPÍTULO IV
RESPUESTAS DE DEFENSA EN RAÍCES DE AGUACATE INFECTADAS
CON *P. cinnamomi*

Regulation of defence responses in avocado roots infected with *Phytophthora cinnamomi* (Rands)

Ernesto García-Pineda · Micaela Benezzer-Benezer · Areli Gutiérrez-Segundo · Gerardo Rangel-Sánchez · Araceli Arreola-Cortés · Elda Castro-Mercado

Received: 20 August 2009 / Accepted: 5 November 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract *Phytophthora cinnamomi* occurs worldwide and has a host range in excess of 1,000 plant species. Avocados (*Persea americana* Mill) have been described as highly susceptible to this soil-borne pathogen. Here, the regulation of defence responses in avocado root seedlings inoculated with *P. cinnamomi* mycelia is described. A burst of reactive oxygen species (ROS) was observed 4 days after inoculation. The higher physiological concentration of H_2O_2 induced by *P. cinnamomi* on avocado roots had no effect on in vitro growth of the oomycete. Total phenols and epicatechin content showed a significant decrease, but lignin and pyocyanidins exhibited no changes after inoculation. Also, increased nitric oxide (NO) production was observed 72 h after treatment. We studied the effects of one NO donor [sodium nitroprusside (SNP)], and one NO scavenger [2- to 4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (CPTIO)] to determine the role of NO during root colonisation by *P. cinnamomi* mycelia.

Pretreatment of the roots with CPTIO, but not with SNP, inhibited root colonisation suggesting an important role for NO production during the avocado–*P. cinnamomi* interaction. Our data suggest that although defence responses are activated in avocado roots in response to *P. cinnamomi* infection, these are not sufficient to avoid pathogen invasion.

Keywords *Phytophthora cinnamomi* · Avocado · Reactive oxygen species · Nitric oxide

Abbreviations

APX	Ascorbate peroxidase
CAT	Catalase
CPTIO	2- to 4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide
GPX	Guaiacol peroxidase
H_2O_2	Hydrogen peroxide
MAMPs	Microbe associated molecular patterns
NO	Nitric oxide
O_2	Superoxide anion
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
POD	Peroxidase
ROS	Reactive oxygen species
SNP	Sodium nitroprusside
SOD	Superoxide dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid
XTT	Sodium 3' –[1-[phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6nitro)benzene-sulfonic acid hydrate

Responsible Editor: Jesus Mercado-Blanco.

E. García-Pineda (✉) · M. Benezzer-Benezer · A. Gutiérrez-Segundo · G. Rangel-Sánchez · A. Arreola-Cortés · E. Castro-Mercado
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
Edif. B1, Ciudad Universitaria,
58040 Morelia, Michoacán, Mexico
e-mail: egpineda@zeus.umich.mx

Published online: 15 December 2009

 Springer

Introduction

Plants have evolved a multilayered immune system to defend themselves against pathogens (Jones and Dangl 2006). A first layer of this system is based on the amazingly sensitive perception of pathogen- or microbe associated molecular patterns (PAMPs or MAMPs) through pattern recognition receptors at the plant's cell surface (Boller and Felix 2009). Consistent with this, non-host resistance has considerable significance because every plant is a non-host to the majority of plant parasites, and PAMPs play an important role in activating defence responses. Moreover, the narrow host range of most pathogens implies that non-host resistance is difficult to overcome (Jones and Dangl 2006). PAMP-induced immune responses are important for immunity to microbial infection of whole plant species and for basal immunity in susceptible host plant cultivars (Bittel and Rohatsek 2007).

There are two major classes of phytopathogens according to their feeding relationships with host plants. Necrotrophs kill the host cells as they invade, and then utilise the nutrients released for their growth and development. The opposite extreme is referred to as biotrophy, in which the pathogen needs to tap into living cells to obtain its nutrients (Dickinson 2003).

Oomycetes are destructive fungus-like plant pathogens that devastate important agricultural crops and natural ecosystems. Due to their particular physiological characteristics, relatively few plants have been shown to be truly resistant to infection caused by these pathogens (Cahill et al. 2008). Oomycetes include *Phytophthora cinnamomi*, which causes root rot disease in avocado plants (*Persea americana* Mill) and represents the most destructive and important disease of this plant worldwide. The pathogen attacks trees of all ages, including those in nurseries, and destroys the small, absorbing roots of the avocado, which become black and brittle and eventually die (Pegg et al. 2002), leaving the affected tree with little uptake ability. The aboveground symptoms of the disease do not become obvious until the roots are heavily infected (Zentmyer 1980). The pathogen exhibits a large host range, and the key question of why, and by what mechanisms, some species are able to survive infestation remains unanswered. Research into plant defence against *P. cinnamomi* has been limited in comparison to many other plant pathogens.

No gene-for-gene interactions have been established for *P. cinnamomi* and the factors that influence the development of resistance may be complex (Cahill et al. 2008).

On the other hand, plants produce harmful reactive oxygen species (ROS) under pathogen attack, including the production of superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2)—both are produced and released at the site of pathogen ingress. These oxygen intermediates serve as signalling molecules and appear to form part of a signalling cascade, resulting in the activation of plant defence mechanisms (Apel and Hirt 2004). ROS also have direct antimicrobial activity, inhibiting spore germination in many fungal pathogens (Peng and Kuc 1992).

Another molecule playing an important role in the activation of defence responses against pathogen attack is nitric oxide (NO). Emerging evidence suggests that NO plays a central role in plant protection, probably functioning in combination with ROS. One of the most rapid responses of plants to potential pathogens is the congruent production of both NO and ROS (Delledonne et al. 2001).

Whereas the ROS-based defence system is highly effective against biotrophic pathogens (which are dependent on living host cells), necrotrophic pathogens can also colonise dead tissue and could therefore benefit from such a host defence response (Able et al. 2003; Laloi et al. 2004). Such findings are supported by observations in *Borythia cinerea*—one of the most comprehensively studied necrotrophic fungal plant pathogens. *B. cinerea* actively triggers an oxidative burst during cuticle penetration (Tonberge 2004) and plant cell death is beneficial to the pathogen, leading to plant susceptibility (Govrin and Levine 2000).

Several mechanisms by which plant cells regulate their intracellular ROS level have been described. Under conditions of normal healthy growth, plants possess a number of enzymatic and non-enzymatic mechanisms of detoxification to efficiently scavenge for either ROS themselves or their secondary reaction products. Various enzymes systems participate in ROS metabolism during pathogen attack in plants. Major ROS scavenging enzymes such as superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7) and ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) are produced to avoid cellular disintegration caused by ROS (Mittler et al. 2004).

Plant Soil

Also, non-enzymatic mechanisms to regulate ROS production play an important role during plant pathogen interactions. Flavonoids, which include various groups of plant metabolites such as chalcones, aurones, flavonones, isoflavonoids, flavones, flavonols, catechins, and anthocyanins, are powerful antioxidants in vitro by virtue of the reducing properties of their phenolic hydroxyl groups, in combination with the stability of the flavonoid phenoxyl radicals (Hutchenson 1998). Specifically, epicatechin flavonoid has been shown to affect disease resistance by modulating levels of preformed antifungal compounds in avocado fruit peel (Prusky et al. 1985), but its role in avocado plants against *P. cinnamomi* remains unknown.

To date, it remains unclear how *P. cinnamomi* avoids the onset of innate immunity, which is triggered by the recognition of PAMPs. The aim of the present study was to investigate ROS formation and antioxidant reactions as well as the role of NO during initial responses of avocado against the invading hemibiotrophic pathogen *P. cinnamomi*, the causal organism of avocado root rot.

Materials and methods

Plant material and soil

These studies were performed using seedlings of a commercial avocado rootstock, *Persea americana* Mill var. *Drymifolia*, which is susceptible to avocado root rot. Four-month old seedlings were planted in soil that had been inoculated with *P. cinnamomi* as follows: ten Petri dishes containing mycelia of *P. cinnamomi* (provided by R. Salgado-Garciglia from the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México, and isolated from avocado root plants showing characteristic symptoms of the disease) and grown for 7 days in V8 juice agar medium were homogenised by blending for 1 min with a Hamilton Beach blender (Hamilton Beach/Proctor-Silex, <http://www.hamiltonbeach.com/>), mixed with sterilised soil Miracle-Gro (2 kg), and irrigated as needed (Messenger et al. 2000). At least five plants were used per treatment. Replicate experiments were performed and always included control plants that were mock-inoculated appropriately with sterile distilled water.

All biochemical analyses were performed with feeder avocado roots harvested from inoculated plants at different times of incubation, washed in water, and used immediately. All experiments were conducted at room temperature (23–25°C), with four replicates per treatment. *P. cinnamomi* was cultured in liquid medium using V8 juice medium without agar, as described by Chen and Wang (2005).

Analysis of ROS production

To assay $O_2^{\cdot -}$ production, a final concentration of 0.5 mM XTT (sodium 3'-[1-[phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate; Sigma, St. Louis, MO) was added to 0.5 g root tissue from plants inoculated at different times with *P. cinnamomi* mycelium or with water as a control. The samples were incubated for 10 min and 1 mL supernatant was collected for spectrophotometric analysis of XTT formazan production at the peak A_{470} (Able et al. 1998). The direct release of hydrogen peroxide from 0.5 g root tissue immersed for 10 min in 10 mL deionised water was measured at different times after treatment. The assay was modified using peroxidase as a catalyst and guaiacol as a substrate (Cakmak and Marschner 1992). The reagent mixture contained 0.05% guaiacol (440 $\mu\text{L L}^{-1}$), and horseradish peroxidase (350 $\mu\text{L L}^{-1}$; 2,500 U mL^{-1}) dissolved in 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). Hydrogen peroxide in the medium was measured by incubating 100 μL with same volume reagent mixture for 15 min at room temperature in the dark. The reaction turns the reagent mixture an unstable brown colour and absorbance was measured immediately at 450 nm. Commercial H_2O_2 was used to construct a standard curve.

Lipid peroxidation was monitored via the spectrophotometric determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid (Phillips et al. 1987). Briefly, 0.5 g root tissue was homogenised in 1 mL trichloroacetic acid (TCA; 10%, w/v) and centrifuged at 15,000 g for 20 min. A 125 μL aliquot of crude extract was added to 125 μL TCA (10%, w/v) plus 500 μL thiobarbituric acid (0.2%, w/v) in TCA (10%). The mixture was boiled at 95°C for 5 min and cooled on ice for 5 min. After centrifugation at 10,000 g for 10 min, the A_{535} of supernatant was determined and the A_{260} nonspecific value was subtracted. The concentration of thiobarbituric acid (TBARS) was calculated by

using the extinction coefficient of $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, and results were expressed as nanomols TBARS per gram fresh weight (FW).

Assay of catalase activity

Catalase was extracted from liquid medium as previously described (Barret and Gonzalez 1994) and determined by following decrease of absorbance at 240 nm at pH 7.0 in a mixture composed of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, 50–100 mg protein and 18 mM H_2O_2 (extinction coefficient $23.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; De Gara et al. 2000).

Total peroxidase assay

Roots from plants (0.5 g) were crushed in liquid nitrogen with a mortar and pestle. The resulting powder was homogenised in 10 mM sodium phosphate, pH 6.0, containing 1 M NaCl using a Vortex homogeniser for 30 s. The homogenate was stirred on ice for 1 h, filtered through nylon cloth and centrifuged at 20,000 g for 20 min. The supernatant was used for assays of peroxidase (POD; Svalheim and Roberts 1990). Soluble POD activity was analysed by following the formation of tetraguaiacol in a Beckman DU 7400 spectrophotometer (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Each reaction mixture (1 mL) consisted of 10 μL enzyme extract and 990 μL guaiacol solution containing 0.25% guaiacol (v/v) in 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.0 and 0.125% H_2O_2 (v/v). POD activity in the extracts was measured as an increase in absorbance at 470 nm. The reaction was linear with time and followed for 1 min. Protein content of extracts was determined (Bradford 1976) after using the Bio-Rad dye reagent (Bio-Rad, Hercules, CA) with bovine serum albumin as the standard.

Extraction of epicatechin and proanthocyanidins

Epicatechin was extracted from a 1.0 g sample of root tissue, as previously described (Prusky et al. 1988). Tissue was homogenised by vortexing in 95% ethanol after grinding in liquid nitrogen. The ethanol extract was dried in a rotary evaporator at 40°C under vacuum. The dried ethanol extract after tissue extraction was dissolved in 10 mL 1 mM NaCl and extracted twice with 90 mL ethyl acetate. The epicatechin content of the samples was quantified

using a commercial standard at 275 nm (Sigma). Procyanidins were extracted from a 100-mg sample of root tissue, as previously described (Dong et al. 2001). Tissue was homogenised in 1 mL 1% (v/v) HCl in methanol and boiled in a water bath for 30 min. Isoamyl alcohol (200 μL) was added and shaken thoroughly. After mixing, the organic and aqueous phases were separated and used to assay procyanidins at 515 nm.

Lignin measurement

Lignin was assayed quantitatively by derivatisation with thioglycolic acid from alcohol-insoluble residues. Root tissue (1 g) was ground in liquid nitrogen and homogenised in 10 mL methanol for 1 min, followed by centrifugation at 30,000 g for 10 min at room temperature. The residue was transferred to a glass beaker for drying (24 h at 60°C). The resulting alcohol-insoluble residue was used for lignin determination. To 50 mg residue in glass screw-cap tubes was added 5 mL 2 N HCl and 0.5 mL thioglycolic acid. The sealed tubes were placed in a boiling water bath and shaken initially to hydrate the residue. After 4 h at 100°C, the tubes were cooled and the contents transferred to polypropylene centrifuge tubes. Following centrifugation at 30,000 g for 10 min at room temperature, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 5 mL 0.5 N NaOH, sealed with Parafilm, and gently agitated at 25°C for 18 h to extract the lignin thioglycolate. The samples were centrifuged at 30,000 g for 10 min at room temperature and the supernatant transferred to glass conical centrifuge tubes. Concentrated HCl (1 mL) was added to each tube and the lignin thioglycolic acid allowed to precipitate at 4°C for 4 h. Following centrifugation (10,000 g for 10 min), the orange-brown pellets were dissolved in 10 mL 0.5 N NaOH, and the absorbance at 280 nm was measured (Bruce and West 1989).

Total phenols content

Total phenols content was based on Folin-Ciocalteu (Kaluza et al. 1980). Root tissue (0.5 g) was ground in 1 mL 50% methanol and water (v/v). The samples were centrifuged at 10,000 g for 5 min and the supernatant solutions were used immediately to assay total phenolic concentrations by spectrophotometry.

Plant Soil

The reaction mixture contained 250 μ L extract, 250 μ L Folin-Ciocalteu reagent (Sigma) and 500 μ L saturated sodium carbonate solution, and tubes were shaken. The mixture was centrifuged at 10,000 g for 5 min and the absorbance of the sample was read at 725 nm.

In vitro sensitivity assay

Avocado root epicatechin, commercial epicatechin or H_2O_2 were added at different concentrations to plates containing autoclaved V8 juice agar (15 g/L). Plates were inoculated with plugs of agar containing 7-day-old mycelium of *P. cinnamomi* with the mycelium facing up. Mycelial growth on these plates was measured every 24 h as colony radius (Schouten et al. 2002). Metalaxyl, a systemic fungicide, was used as a negative control for *P. cinnamomi* mycelia growth.

Nitric oxide content

Nitric oxide content was determined using the method described by Zhou et al. (2005) with slight modifications. Avocado roots were thoroughly washed free of soil, and four (1-cm-long) root tips were excised. Root tissue (0.1 g) was ground in a mortar and pestle in 1 mL 50 mM cool acetic acid buffer (pH 3.6, containing 4% zinc diacetate). The homogenates were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was collected, and the pellet washed with 1 mL extraction buffer and centrifuged as before. The two supernatants were combined and 0.1 g charcoal was added. After vortex and filtration, the filtrate was leached and collected. The mixture of 1 mL filtrate and 1 mL Greiss reagent was incubated at room temperature for 30 min. Absorbance was determined at 540 nm. NO content was calculated by comparison to a standard curve of $NaNO_2$.

For experiments with chemicals, four (1-cm-long) root tips were excised and incubated for 4 h with 0.1 mM CPTIO [2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide potassium salt; Sigma-Aldrich], 0.05 mM SNP (sodium nitroprusside; Sigma-Aldrich) or water (controls) and then infected in vitro by dipping into a mycelial aqueous solution (10 mL), incubated for 24 h and planted on a medium selective for *Phytophthora* spp. (Gess and Coffey 1989) containing (per litre of corn meal

agar): 10 mg pirimicidin, 250 mg ampicillin, 10 mg rifampicin, 100 mg pentachloronitrobenzene, and 75 mg hymexazol. After 2 days, the root tips were scored for infection based on the growth of *P. cinnamomi*. To prepare the inoculum, *P. cinnamomi* mycelia from one Petri dish grown for 7 days in V8 juice agar medium was collected with 5 mL sterilised distilled water. The optical density (OD_{600}) of the inoculum was adjusted to 1.5–2 to obtain a uniform mycelium concentration (Chen and Wang 2005).

In vitro elicitor treatments

Four avocado root segments (0.5 cm) were immersed in elicitor solution (10 mL) containing cellulase (1 mg) or salicylic acid (SA; 5 mM) for 4 h, and then inoculated with *P. cinnamomi* mycelia (OD_{600} 1.5 to 2.0), incubated for 24 h and transferred onto medium selective for *Phytophthora* spp. After 2 days, the root tips were scored for infection based on the growth of *P. cinnamomi*. In vitro sensitivity to cellulase or SA was assayed on plates containing autoclaved V8 juice agar (15 g/L).

Data analysis and photography

All experiments were performed at least twice with three to four replicates. Values are expressed as means with standard deviation. The significance of differences between mean values obtained from inoculated and noninoculated (controls) samples produced in three experiments was analysed following ANOVA test. Seedlings were photographed with a Canon digital camera (PowerShot A630), and microscopic photography of root tissue used a Leica MZ6 stereomicroscope.

Results

Characterisation of infection of avocado seedlings with *P. cinnamomi*

Symptoms in avocado seedlings after inoculation with *P. cinnamomi* were analysed visually (Fig. 1). Avocado seedling foliage became wilted after 2 days, and leaves fell 4 days after inoculation with *P. cinnamomi* mycelium (Fig. 1b). Roots showed brownish lesions (Fig. 1d), in contrast with seedlings treated with water,

and the presence of the pathogen was confirmed by microscopic examination (Fig. 1f). Because at early timepoints the infection could damage the seedlings significantly due to water stress, defence responses were not assayed until 4 days after infection.

Effects of *P. cinnamomi* on ROS production

To further characterise the responses of avocado roots to pathogen, we measured the production of ROS (Fig. 2). The production of $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , and lipid peroxidation started within 2 days after treatment, with maximum production at 4 days.

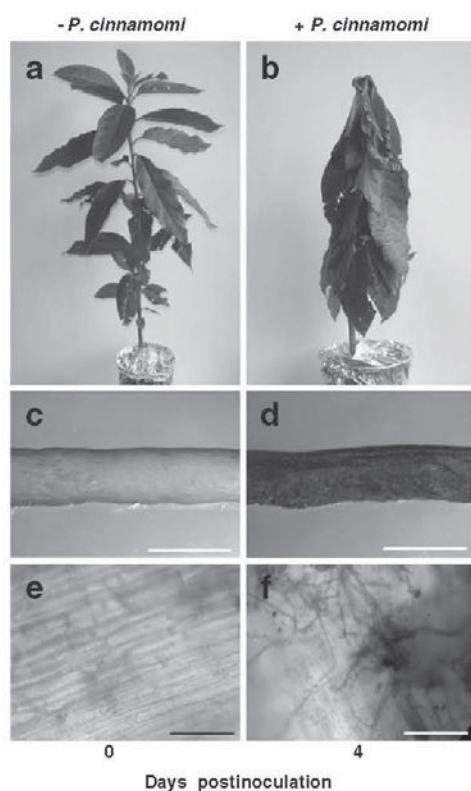


Fig. 1 Disease symptoms in avocado seedlings after inoculation with *Phytophthora cinnamomi* mycelia. **a, c, e** Non inoculated seedlings; **b, d, f** advanced symptoms of the disease in seedlings 4 days after inoculation. **a, b** Foliage; **c, d** feeder root; **e, f** feeder root tissue. Bars **c, d** 2 mm; **e, f** 20 μ m

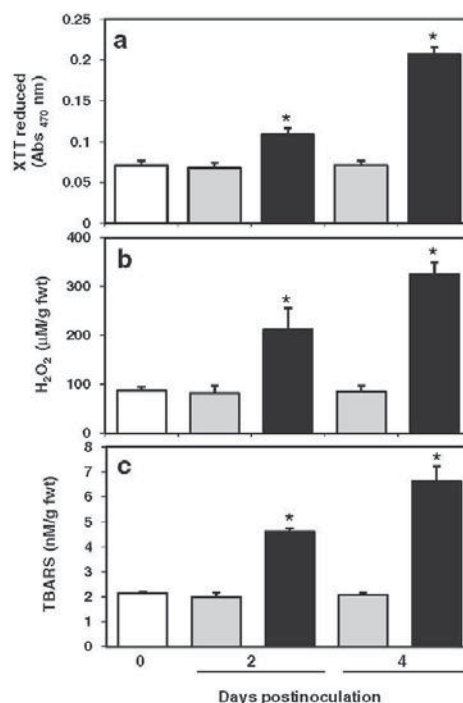


Fig. 2 Kinetics of accumulation of reactive oxygen species (ROS) induced in avocado seedling after infection with *P. cinnamomi*. **a** $O_2^{\cdot -}$ accumulation measured by XTT [sodium 3'-[1-[phenylamino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate] reduction. **b** H_2O_2 accumulation. **c** Lipid peroxidation measured as TBARS (thiobarbituric acid). White bars Non inoculated seedlings, grey bars seedlings treated with water, black bars seedlings inoculated with *P. cinnamomi*. Data are mean $\pm$ SD of three replicates. Asterisks Significant difference between inoculated and non-inoculated samples ($P < 0.05$)

Sensitivity of *P. cinnamomi* to H_2O_2

Inoculation of *P. cinnamomi* induced an oxidative burst in avocado roots. There is evidence that necrotrophic pathogens are able to survive against damage caused by the accumulation of H_2O_2 . To analyse the sensitivity of *P. cinnamomi* to H_2O_2 , mycelium was grown in Petri dishes in the presence of two externally added H_2O_2 concentrations: 300 μ M, which was the highest physiological concentration observed 4 days after infection; and 20 mM, a concentration reported to inhibit the growth

Plant Soil

of the necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea* (Schouten et al. 2002). Radial growth was measured daily (Fig. 3a). Our results show that 300 μM H_2O_2 had no influence on *P. cinnamomi* radial growth in vitro while 20 mM of H_2O_2 inhibited growth only slightly. Apparently, growth-inhibiting concentrations proved to be fungistatic rather than lethal. Total inhibition of growth was observed with metalaxyl (0.5 g/L), a systemic fungicide to control plant diseases caused by oomycete pathogens. In addition, catalase enzyme activity was detected in liquid medium where *P. cinnamomi* was cultured for 7 days (Fig. 3b). The presence of this enzyme in the culture medium showed that *P. cinnamomi* was able to contend with host-produced ROS.

Effects of *P. cinnamomi* on peroxidase enzyme activity and protective antioxidant compounds

To investigate whether H_2O_2 accumulation in response to *P. cinnamomi* could play a role in the

activation of defence responses, POD activity was assayed. This enzyme catalyses the final step in the synthesis of lignin from the oxidation of cinnamyl alcohols, using H_2O_2 as the ultimate electron acceptor. Infection with the pathogen caused an increase in POD activity in avocado roots (Fig. 4). The greatest POD activity in comparison to the control was observed 4 days after treatment.

Subsequently, other experiments were conducted to determine the effect of root infection on phenolic antioxidants content. Epicatechin significantly decreased upon infection when compared with healthy tissues. A threefold reduction in epicatechin levels was observed 4 days after infection. Lignin content was similar at all times assayed. Analysis of procyanidins content showed a slight decrease 4 days after infection. However, total phenolic content decreased in the inoculated plant roots (Table 1).

To further study the role of epicatechin during root infection, in vitro growth of *P. cinnamomi* was analysed in the presence of different epicatechin concentrations isolated from avocado roots, using commercial epicatechin from green tea as a control (Table 2). It was observed that avocado root epicatechin had no influence on *P. cinnamomi* growth in vitro at the concentrations analysed.

NO is induced by *P. cinnamomi* in avocado roots

Phytophthora cinnamomi-induced NO generation by avocado roots was measured using the Griess reagent, which is one of the methods most frequently used for the determination of NO released from plant tissues (Fig. 5). NO in avocado roots increased 24 h after *P. cinnamomi* inoculation, reaching a maximum at 72 h (Fig. 5a). Maximum concentration of NO reflected about an 8-fold increase above the level of control tissue (0 h of treatment). To further analyse the putative role of NO during infection, avocado roots were treated with one NO donor (SNP) and one NO scavenger (CPTIO), and root colonisation was analysed 24 h after infection (Fig. 5b). Visual inspection indicated that SNP had no effect on root colonisation whereas no colonisation was observed with CPTIO. That neither SNP or CPTIO had any direct effect on *P. cinnamomi* was shown by in vitro growth of the oomycete in the presence of these compounds (data not shown).

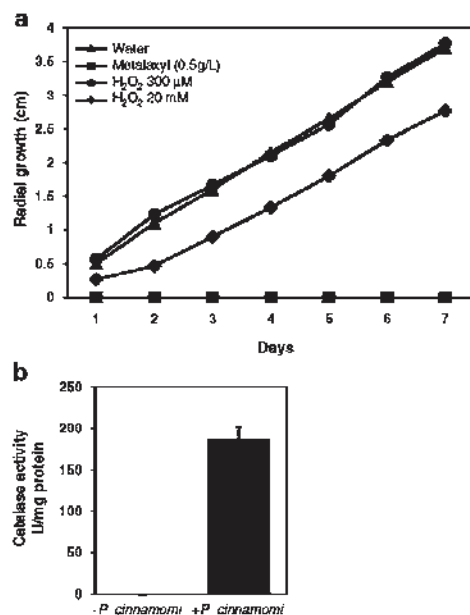


Fig. 3 Effect of H_2O_2 on *P. cinnamomi* mycelia growth (a) and catalase activity (b) in liquid media over a 7-day culture period. Data are mean $\pm$ SD of three replicates

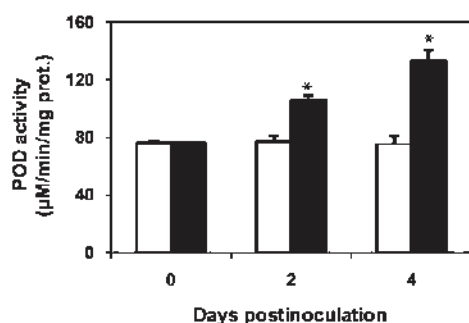


Fig. 4 Effect of *P. cinnamomi* on peroxidase (POD) activity in avocado seedlings. Root tissue was harvested from seedlings inoculated with *P. cinnamomi* mycelia and assayed for POD enzyme activity. *White bars* Seedlings treated with water, *black bars* seedlings inoculated with *P. cinnamomi*. The results are means±SD of three replicates. *Asterisks* Significant difference between inoculated and noninoculated samples ($P < 0.05$)

Effects of cellulase and SA on root colonisation

Two defence response elicitors in plants (SA and cellulase) were used to study their effect on root colonisation by *P. cinnamomi* (Fig. 6). Cellulase treatment shown no effect on root colonisation compared with the control treated with water, while SA notably inhibited root colonisation (Fig. 6a). These compounds had no direct effect on *P. cinnamomi* growing in vitro in V8 juice agar medium (Fig. 6b)

Discussion

The effects of *P. cinnamomi* infection on defence responses in avocado root seedlings were studied, because little is known about the biochemical changes during this interaction.

Inoculation of avocado roots with *P. cinnamomi* caused marked increases in ROS levels, but this

Table 2 In vitro effect of commercial and avocado root epicatechin on growth of *P. cinnamomi*. Data presented are the averages of at least three independent experiments (means ± SD). *ECQ* Commercial epicatechin

Treatment	Radial growth (cm)
Control	3.83±0.11
Ethylacetate	3.80±0.00
ECQ	
600 μg	3.37±0.05
100 μg	3.47±0.26
Avocado epicatechin	
600 μg	3.55±0.33
100 μg	3.85±0.05
Metalaxyl (0.5 g/L)	0.60±0.08

response did not contribute to resistance to pathogen attack because disease symptoms were observed in seedlings 4 days after inoculation. *P. cinnamomi* is a pathogen that has evolved mechanisms to penetrate cells and to spread within plant tissue. This oomycete has been classified by its lifestyle as a hemibiotrophic pathogen (Latijnhouwers et al. 2003), i.e., a pathogen with a necrotrophic growth phase that can use pathogen- or plant-derived toxic compounds to colonise plant tissue (van Kan 2006). The production of ROS in these interactions seems to be important as they weaken the host tissue at early stages of infection and, consequently, enhance growth and development of the pathogen (Govrin and Levine 2000).

We found catalase enzyme activity, which readily converts H_2O_2 into H_2O and O_2 , in liquid medium in which *P. cinnamomi* was cultured by 7 days, suggesting an important role of this enzyme in coping with ROS produced by avocado roots during plant infection. In vitro tolerance of *P. cinnamomi* to high concentrations of H_2O_2 was also observed. This behaviour may contribute to the ability of the pathogen to colonise root tissue and cause disease in avocado seedlings.

Table 1 Effects of *Phytophthora cinnamomi* on some protective antioxidants in avocado seedlings. Data presented are the averages of at least three independent experiments (mean ± SD). *FW* Fresh weight

Time after infection (days)	Lignin (λ_{250})	Epicatechin ($\mu\text{g/g FW}$)	Procyanidins (λ_{515})	Total phenols (λ_{755})
0	1.606±0.58	264.230±2.32	1.305±0.45	2.378±0.41
2	1.406±0.28	169.879±17.96	nd ^a	2.493±0.18
4	1.681±0.04	84.704±5.32	1.190±0.19	1.817±0.19

^a Not determined

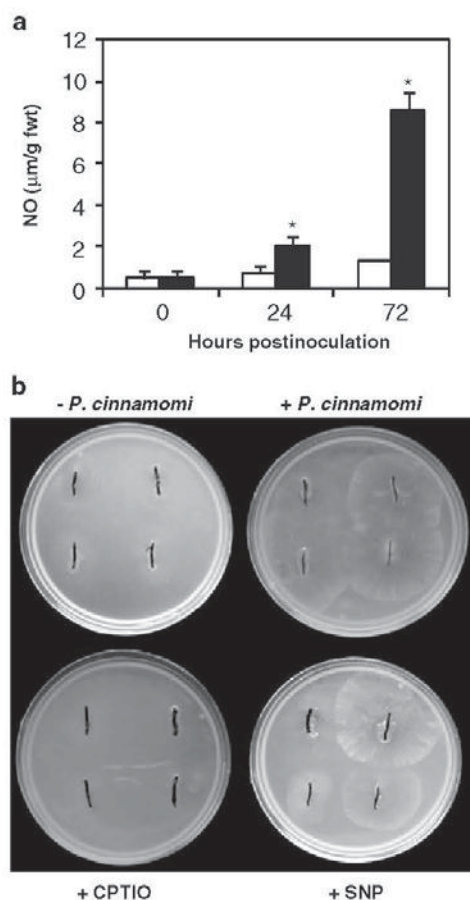


Fig. 5 Nitric oxide (NO) production in avocado roots after infection with *P. cinnamomi* and effect on root tissue colonisation. **a** Roots of avocado seedlings inoculated with *P. cinnamomi* mycelia for different times were harvested and the NO content assayed immediately. The results are means $\pm$ SD of three replicates. **White bars** Seedlings treated with water, **black bars** seedlings inoculated with *P. cinnamomi*. **Asterisks** Significant difference between inoculated and noninoculated samples ($P < 0.05$). **b** Root tissue (0.5 cm) was treated for 4 h with sodium nitroprusside (SNP) or 2- to 4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (CPTIO) and root colonisation was analysed 24 h after incubation on selective media with *P. cinnamomi*. Experiments were repeated at least three times with the same results

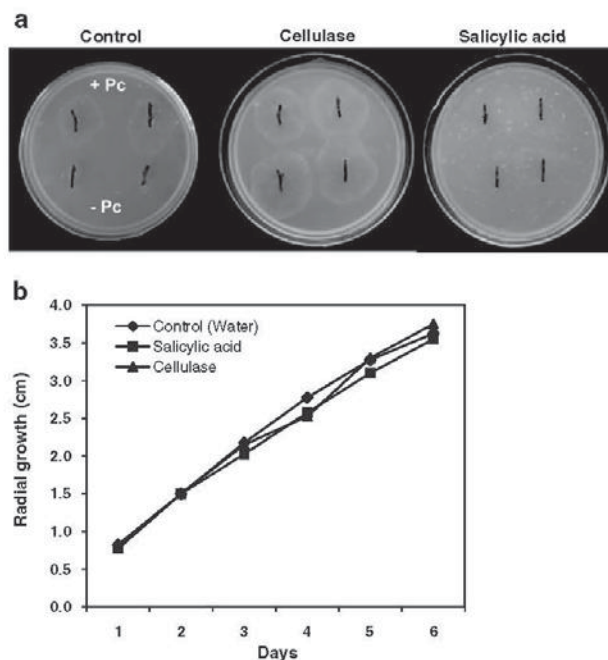
Peroxidase enzyme activity increased notably in avocado root seedlings 4 days after infection. Peroxidases have been reported to be involved in oxidising

phenolic compounds, resulting in tissue browning through the oxidative polymerisation of hydroxycinnamyl alcohols to yield lignin (Vance et al. 1980). Peroxidase also generates free radicals and H_2O_2 (Peng and Kuc 1992), which could inhibit fungal activity. However, in our study no significant changes in lignin content were observed in avocado roots infected with *P. cinnamomi*, suggesting that the increase in peroxidase activity was not involved in lignin accumulation, but could contribute to H_2O_2 accumulation. Experiments using specific inhibitors of POD enzyme and the analysis of ROS production in infected seedlings could answer this question.

Epicatechin—a flavan 3-ol—decreased in avocado roots after inoculation with *P. cinnamomi*. Flavonoids, like epicatechin, are powerful antioxidants by virtue of the reducing properties of their phenolic hydroxyl groups (Duthie et al. 1997). The results presented here suggest that the decrease in epicatechin content in avocado roots after infection could result in a lower redox state, and therefore in a reduced capacity for the scavenging of ROS, triggering cell death and thus increasing susceptibility to *P. cinnamomi*. These findings imply that any reduction in epicatechin content in response to pathogen infection would have an effect on ROS production. Epicatechin is present in high concentrations in the pericarp of unripe avocado fruits, and has been shown to affect disease resistance by modulating levels of preformed antifungal compounds in avocado peel (Prusky et al. 1985). Also, epicatechin inhibited the maceration ability of the enzyme pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* (Wattad et al. 1994), which causes anthracnose, the most important postharvest disease of ripening avocado fruits. These authors concluded that cultivar resistance is related to the amount of epicatechin in the avocado peel, and noted that fruit became susceptible to *C. gloeosporioides* during fruit ripening, when epicatechin levels decreased. In the same way, levels of (-)-epicatechin in tea cultivars resistant to blister blight leaf disease were significantly higher than those in susceptible cultivars (Punyasiri et al. 2005), suggesting that epicatechin was involved in the resistance mechanism.

It has been suggested that catechins condense with flavan-3,4-diols to give procyanidins, which are known to be fungitoxic (Winkel-Shirley 2002). In our study, procyanidin levels in avocado roots inoculated with *P. cinnamomi* remained essentially constant,

Fig. 6 Effect of defence response elicitors on avocado root colonisation by *Phytophthora cinnamomi*. **a** Avocado roots (0.5 cm) were treated with cellulase (1 mg) or salicylic acid (SA: 5 mM) for 4 h and root colonisation was then analysed 24 h after incubation on selective medium. Experiments were repeated at least three times with the same results. **b** Agar plugs with mycelium of *P. cinnamomi* were placed on agar plates containing cellulase (1 mg) or SA (5 mM). Radial growth was measured at 24 h intervals for 6 days. The results are means $\pm$ SD of three replicates. *Pc* *P. cinnamomi*



indicating that the decrease in epicatechin content had no influence on procyanidin synthesis.

We demonstrated that in vitro inoculation of avocado seedling roots with *P. cinnamomi* induced a sharp increase in NO content 72 h after treatment. Delledonne et al. (2001) demonstrated that NO and ROS produced during a pathogen-induced hypersensitive response (HR) cooperate to activate cell death. They proposed that the reaction of NO with H_2O_2 is required to elicit cell death in soybean cells (Delledonne et al. 2001). We investigated whether NO modulates root colonisation using SNP or CPTIO as donor and scavenger of NO, respectively. SNP had no effect on root colonisation, whereas CPTIO qualitatively inhibited root colonisation. These data support the suggestion that hypersensitive cell death may facilitate colonisation of the host tissue by this pathogen. Govrin and Levine (2000) showed that, although hypersensitive cell death is efficient against biotrophic pathogens, it does not protect plants against infection by necrotrophic pathogens like *B. cinerea* and *S. sclerotiorum*. In fact, *B. cinerea* triggers HR, which facilitates its colonisation of plants. Hence, these fungi can exploit a host

defence mechanism for their pathogenicity. In spite of their distinct evolutionary origins, fungi and oomycetes both might use similar infection strategies.

Using cellulase and SA as plant defence activators, we observed that only SA inhibited avocado root colonisation. SA induces defence against biotrophic pathogens that feed and reproduce on live host cells (Kessler and Baldwin 2002; Glazebrook 2005). Exogenously supplied SA also induces various defence-associated responses, including an increase in cytosolic calcium levels in tobacco suspension cells (Kawano et al. 1998), activation of mitogen-activated protein kinase SIPK in tobacco plants (Zhang and Klessig 1997), and induction of many defence genes, including those encoding pathogenesis-related proteins (Durner et al. 1997; Dempsey et al. 1999). In addition, if SA is provided before, or at the time of, pathogen infection or elicitor challenge, it can potentiate various defence responses, such as the generation of ROS (Kauss and Jeblick 1995; Shirasu et al. 1997), activation of hypersensitive cell death (Tenhaken and Rübel 1997), and expression of certain defence genes (Kauss et al. 1992; Thulke and Conrath

1998). To elucidate the mechanisms through which SA induces defence responses, several putative effector proteins have been identified. The first, termed salicylic acid-binding protein (SABP) is a cytosolic (peroxisomal) tobacco catalase (CAT) that reversibly binds SA (Chen and Klessig 1991; Chen et al. 1993). SA and its functional analogs inhibit the H_2O_2 -degrading activity of CAT, whereas biologically inactive analogs do not (Conrath et al. 1995; Anderson et al. 1998). Thus, it was hypothesised that SA-mediated inhibition of CAT might generate the H_2O_2 burst taking place during HR (Chen et al. 1993).

NO was shown to cause SA accumulation (Durner et al. 1998) but to suppress defence signalling regulated by JA, which activates defence against necrotrophic pathogens (Orozco-Cardenas and Ryan 2002; Huang et al. 2004).

Experiments are currently under way to investigate the induction of defence mechanisms such as increased production of antimicrobial compounds, in avocado roots treated with SA.

Acknowledgements This research was supported by the Consejo de la Investigación Científica, U.M.S.H., and by the Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología, Michoacán, México. The authors wish to thank Alfredo Saavedra-Molina (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) for critically reading this manuscript.

References

- Able AJ (2003) Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* 221:137–143
- Able AJ, Guest DL, Sutherland MW (1998) Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. *Plant Physiol* 117:491–499
- Anderson M, Chen Z, Klessig DF (1998) Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of *PR-1* gene expression. *Phytochemistry* 47:555–566
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399
- Barret DM, Gonzalez C (1994) Activity of softening enzymes during cherry maturation. *J Food Sci* 59:574–577
- Bittel P, Robatzek S (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 10:335–341
- Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379–406
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 72:248–254
- Bruce RJ, West CA (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol* 91:889–897
- Cabill DM, Rookes JE, Wilson BA, Gibson L, McDouglas KL (2008) *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control. *Aust J Bot* 56:279–310
- Cakmak I, Marschner RP (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide, ascorbate peroxidase, glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol* 98:1222–1227
- Chen Z, Klessig DF (1991) Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8179–8183
- Chen Y, Wang D (2005) Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis* 89:1268–1272
- Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262:1883–1886
- Conrath U, Chen Z, Ricigliano JW, Klessig DF (1995) Two inducers of plant defence responses, 2, 6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7143–7147
- De Gura I, Paciolla C, De Tullio MC, Mottac M, Arrigoni O (2000) Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiol Plant* 109:7–13
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13454–13459
- Dempsey DA, Shah J, Klessig DF (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 18:547–575
- Dickinson M (2003) Fungal and oomycete diseases—development of disease. In: Dickinson M (ed) *Molecular plant pathology*. Taylor and Francis, New York, pp 47–63
- Dong X, Braun EL, Grotewold E (2001) Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of *Arabidopsis* flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiol* 127:46–57
- Durner J, Shah J, Klessig DF (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 2:266–274
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10328–10333
- Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL (1997) The effects of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat Res* 390:141–151
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43:205–227

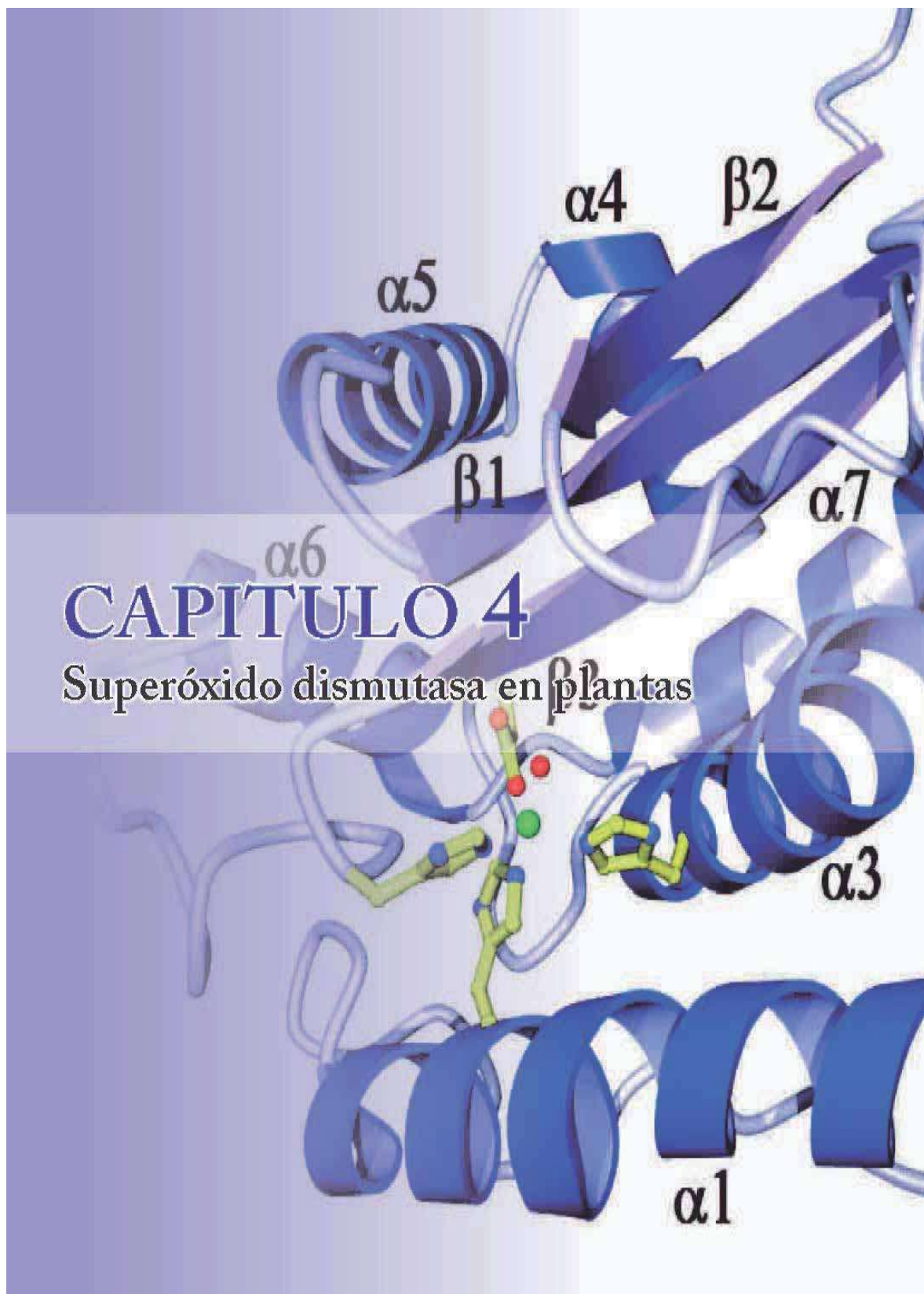
- Gess R, Coffey MD (1989) Evaluation of a strain of *Myrothecium roridum* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 79:1079–1084
- Govrin EM, Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* 10:751–757
- Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218:938–946
- Hutchinson SW (1998) Current concepts of active defence in plants. *Annu Rev Phytopathol* 36:59–90
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329
- Kaluza WZ, McGrath RM, Roberts TC, Schroder HH (1980) Separation of phenolics of sorghum bicolor (L.) Moench grain. *J Agric Food Chem* 28:1191–1196
- Kaus H, Theisinger-Hinkel E, Mindermann R, Conrath U (1992) Dichloroisocoumaric and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant J* 2:655–660
- Kaus H, Jeblick W (1995) Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H_2O_2 . *Plant Physiol* 108:1171–1178
- Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, Uozumi N, Muto S (1998) Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol* 39:721–730
- Kessler A, Baldwin IT (2002) Plant response to herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Plant Biol* 53:299–328
- Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol* 7:323–328
- Larijnhouwers M, de Wit JGM, Govers F (2003) Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiol* 11:462–469
- Messinger BJ, Menge JA, Pond E (2000) Effects of gypsum soil amendments on avocado growth, soil drainage, and resistance to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Dis* 84:612–616
- Mittler R, Vonderaawera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9:490–498
- Onozue-Cardenas ML, Rynn CA (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol* 130:487–493
- Pegg KG, Contes LM, Korsten L, Harding RM (2002) Foliar and soilborne diseases. In: Whitley AW, Schaffer B, Wolstenholme BN (eds) *The avocado: botany, production and uses*. CAB International, Wallingford, UK, pp 299–338
- Peng M, Kuc JA (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82:696–699
- Phillips D, Grant BR, Weste G (1987) Histological changes in the roots of an avocado cultivar, Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 77:691–698
- Prusky D, Kobiler I, Jacoby B, Sims JJ, Midland SL (1985) Effect of inhibitors of lipoxygenase activity and its possible relation to latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol Mol Plant Pathol* 27:269–279
- Prusky D, Kobiler I, Jacoby B (1988) Involvement of epicatechin in cultivar susceptibility of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides* after harvest. *Phytopathol Z* 123:140–146
- Punyasiri PAN, Abeysinghe ISB, Kumar V (2005) Preformed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infection. *J Chem Ecol* 31:1315–1324
- Schouten A, Tenberge KB, Vermeer J, Stewart J, Wagemakers L, Williamson B, van Kan JAL (2002) Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol* 3:227–238
- Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, Dixon RA, Lamb C (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defence mechanisms. *Plant Cell* 9:261–270
- Svalheim O, Robertsen B (1990) Induction of peroxidase in cucumber hypocotyl by wounding and fungal infection. *Physiol Plant* 78:261–267
- Tenberge KB (2004) Morphology and cellular organization in *Botrytis* interactions with plants. In: Elad Y et al (eds) *Botrytis: biology, pathology and control*. Kluwer, Dordrecht, pp 67–84
- Tenhaken R, Rübel C (1997) Salicylic acid is needed in hypersensitive cell death in soybean but does not act as a catalase inhibitor. *Plant Physiol* 115:291–298
- Thulke O, Conrath U (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *Plant J* 14:35–42
- Vance PC, Kirk TK, Sherwood RJ (1980) Lignification as mechanism of disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 18:259–288
- Van Kan JAL (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci* 11:247–253
- Wattad C, Dinooor A, Prusky D (1994) Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. *Mol Plant Microbe Interact* 7:293–297
- Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5:218–223
- Zhang S, Klessig DF (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9:809–824
- Zentmyer GA (1980) *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. *Phytopathological monograph* no. 10. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p 96
- Zhou B, Gou Z, Xing J, Huang B (2005) Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Syosanthos guianensis*. *J Exp Bot* 56:3223–3228

CAPÍTULO V
SUPEROXIDO DISMUTASA EN PLANTAS

Superóxido Dismutasa en Plantas

Araceli Arreola-Cortés, Elda Castro-Mercado y Ernesto García-Pineda

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se producen en las células como producto del metabolismo normal o bajo condiciones de estrés. Las ERO incluyen principalmente al peróxido de hidrógeno, anión superóxido y al radical hidroxilo, entre otros. El anión superóxido (O_2^-) se produce en diferentes compartimentos celulares que incluyen la mitocondria, cloroplastos, microsomas, glioxisomas, peroxisomas, apoplasto y el citosol. Las plantas han desarrollado sistemas de defensa en contra de la producción de las ERO, uno de ellos está constituido por la enzima superóxido dismutasa (SOD). La superóxido dismutasa es una metaloenzima que dismuta al anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno en plantas superiores teniendo un papel muy importante durante el estrés oxidativo. En plantas se han identificado tres clases de superóxido dismutasas, éstas se clasifican de acuerdo al metal presente en el sitio activo, el cual puede ser hierro (Fe SOD), manganeso (Mn SOD) o cobre y zinc (Cu-Zn SOD), además, se han localizado en diferentes compartimentos celulares, las Fe SODs se han localizado en el cloroplasto, las Mn SODs en la mitocondria y peroxisomas y las Cu-Zn SOD en el cloroplasto, citosol y el espacio extracelular.



4.1 Introducción

Las plantas son organismos sésiles, pues se encuentran ancladas al suelo a través de su sistema radicular para la adquisición de nutrientes y agua. Son desafiadas en cualquier momento de su crecimiento y en cualquiera de sus órganos (raíz, tallo, hojas, etc.) por microorganismos, herbívoros o insectos. Ante la presencia de estos desafíos han desarrollado una serie de estrategias de defensa basadas en sus barreras estructurales (la cutícula y la pared celular), en sus respuestas químicas y en sus respuestas metabólicas activas, estas últimas son inducibles, pues se activan después del contacto con un patógeno o del tratamiento con estimuladores. Cuando un patógeno lleva a cabo un ciclo de infección exitoso (inoculación, penetración, invasión, colonización y diseminación) en la planta de manera eficaz, se presenta la enfermedad. Las plantas responden con un conjunto de reacciones de defensa asociadas a la pared celular, dentro de las cuales se encuentra la llamada “explosión oxidativa”, la cual incluye la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el sitio de invasión por el patógeno. Las ERO comprenden la producción de: anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH^\bullet$). La producción de O_2^- se ha reportado en un amplio rango de interacciones entre plantas y patógenos tales como bacterias avirulentas, hongos y virus. El daño producido por insectos también conduce a la producción de ERO (Apel y Hirt, 2004; Hükelhoven 2007). Además, las respuestas inducidas por herida son dirigidas a la reparación del tejido dañado y a la activación de mecanismos de defensa para la prevención de futuros daños. Muchas de las

respuestas pueden ocurrir en los primeros 5 minutos o varias horas después del daño, estas incluyen la generación/liberación, percepción y transducción de señales específicas para la subsecuente activación de genes relacionados a la defensa por herida. Las proteínas que codifican los genes inducidos por herida tienen las siguientes funciones: 1) reparar el tejido dañado, 2) producción de sustancias que inhiben el crecimiento del insecto predador (por ejemplo: producción de toxinas o la baja digestibilidad del tejido de la planta), 3) participación en la activación de rutas de señalización por herida y 4) ajustar el metabolismo de la planta ante las demandas nutricionales (León *et al.*, 2001).

Por otro lado, los procesos aeróbicos tales como la respiración y la fotosíntesis inevitablemente conducen a la producción ERO en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. Sin embargo, su producción y detoxificación se encuentran en equilibrio pero este puede ser perturbado por factores abióticos de estrés tales como luz, sequía, bajas temperaturas, altas temperaturas y estrés mecánico (Apel y Hirt, 2004).

4.2 Producción de especies reactivas de oxígeno

El oxígeno molecular (O_2) es el primer aceptor de electrones biológico y tiene funciones fundamentales en las células, sin embargo también se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo

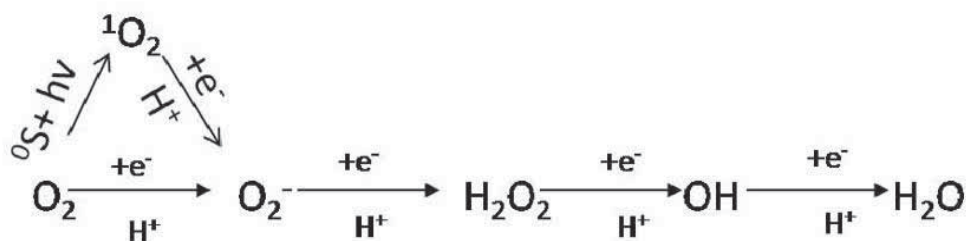


Figura 4.1. Rutas de reducción univalente del oxígeno a agua que conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno intermediarias (Tomado de Scandalios, 2005).

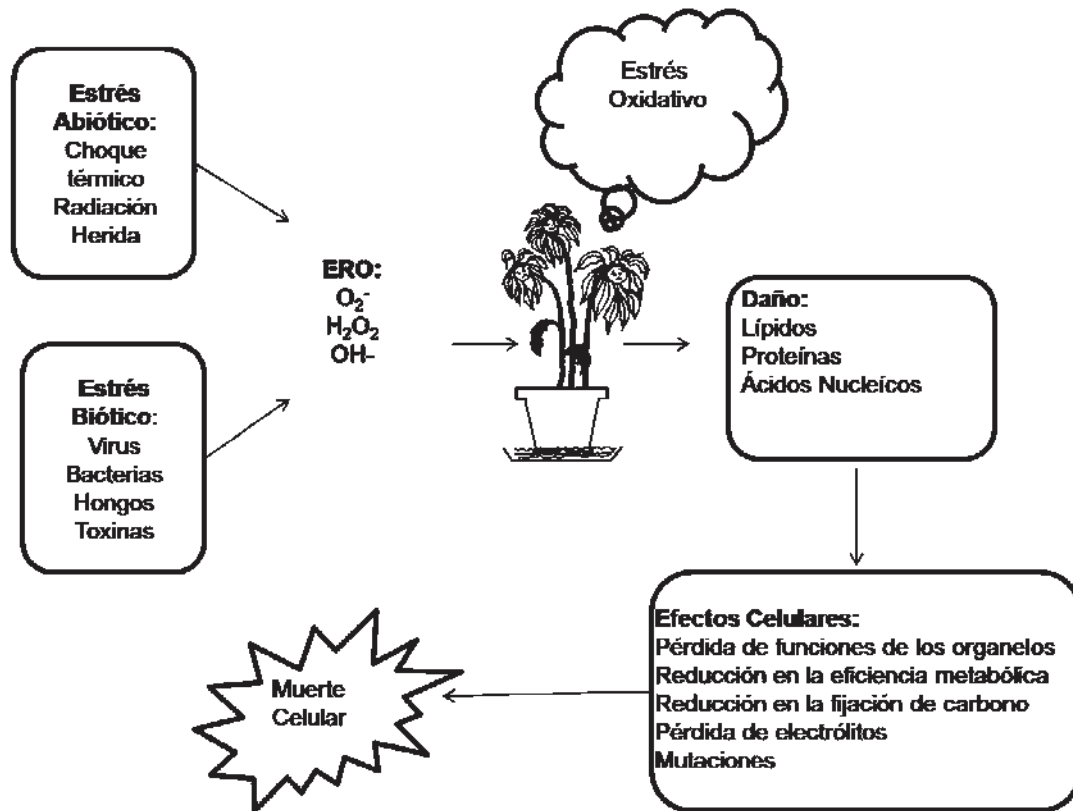


Figura 4.2. Esquema que muestra algunos de los iniciadores (tipos de estrés) de especies reactivas de oxígeno y las consecuencias fisiológicas que conducen a la muerte celular. Modificado de Scandalios, 2005.

(OII[•]) como consecuencia del metabolismo aerobio, generalmente como bioproductos de reacciones enzimáticas, por ejemplo: durante la actividad catalítica de la glicolato oxidasa en los peroxisomas durante la fotorrespiración, o en la mitocondria en la cadena de transporte de electrones (Figura 4.1) (Moller *et al.*, 2007).

En plantas, las ERO se producen continuamente como bioproductos de varias rutas metabólicas localizadas en diferentes compartimentos celulares, en condiciones fisiológicas, estas moléculas son removidas por diferentes defensas antioxidantes. El equilibrio entre la producción y detoxificación puede ser perturbado por diferentes factores ambientales adversos, lo que conduce al aumento de ERO. Las condiciones

adversas que afectan a las plantas pueden ser de origen biótico o abiótico (Figura 4.2). Una de las reacciones tempranas de defensa en plantas ante el ataque por patógenos es la llamada explosión oxidativa, que constituye la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en el sitio de invasión (Scandalios, 2005).

La NADPH oxidasa es una enzima que se localiza en la membrana plasmática y está implicada en la generación de ERO en plantas. Esta enzima cataliza la reducción con un electrón del oxígeno molecular para producir anión superóxido, usando al NADPH como donador de electrones. El O_2^- generado por esta enzima sirve como material inicial para una amplia variedad de oxidantes reactivos que incluyen radicales libres y oxígeno. El O_2^- puede ser convertido a H_2O_2

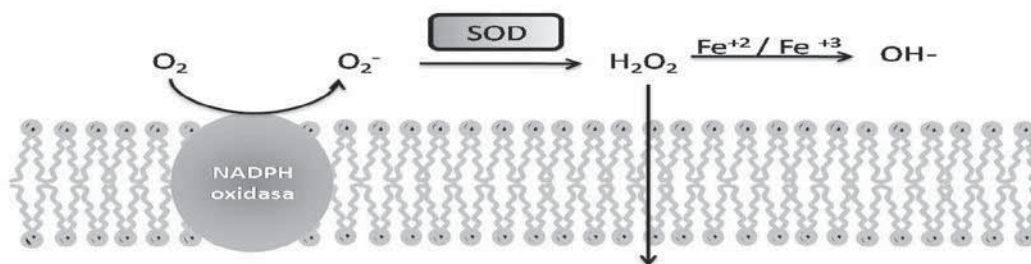


Figura 4.3. Producción de especies reactivas de oxígeno por la NADPH oxidasa en la membrana plasmática de las plantas.

por la superóxido dismutasa y el H_2O_2 producir $OH^\bullet$ a través de la reacción de Fenton, que es catalizada principalmente por iones metálicos de transición (Figura 4.3) (Moller *et al.*, 2007). La célula vegetal ha desarrollado mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para la remoción de las ERO, estos incluyen glutatión, ascorbato y α tocoferol; catalasas y peroxidasa, las cuales remueven el H_2O_2 y superóxido dismutasa que convierte O_2^- a H_2O_2 (Moller *et al.*, 2007).

4.3 Superóxido dismutasas

Las SOD son metaloproteínas que catalizan la dismutación del radical superóxido a oxígeno molecular y H_2O_2 . Esta actividad fue descrita por primera vez por

McCord y Fridovich con una proteína de cobre-zinc de eritrocitos bovinos. Las SOD son ubicuas en todos los organismos aerobios, anaerobios y algunos anaerobios obligados, virtualmente en todos los organismos que consumen oxígeno. Mutantes deficientes en SOD son hipersensibles a oxígeno (Fink y Scandalios, 2002). El anión superóxido es una molécula reactiva que no puede cruzar las membranas biológicas, consecuentemente el anión superóxido producido en un lugar en particular tiene que ser eliminado por una SOD en el sitio de su producción (Fink y Scandalios, 2002). Estas enzimas se han aislado de una amplia variedad de organismos y en plantas se han identificado tres grupos en base al cofactor metálico que usan: SOD de hierro (Fe SOD), SOD de manganeso (Mn SOD) y SOD de cobre y zinc (Cu-Zn SOD). La isoenzima Fe SOD se localiza en los cloroplastos, la Mn SOD en la mitocondria y peroxisomas y la Cu-Zn SOD en el citosol, cloroplasto y espacio extracelular (Figura 4.4). Las plantas tienen múltiples formas de cada una de las clases y son codificadas por más de un gen (Fink y Scandalios, 2002).

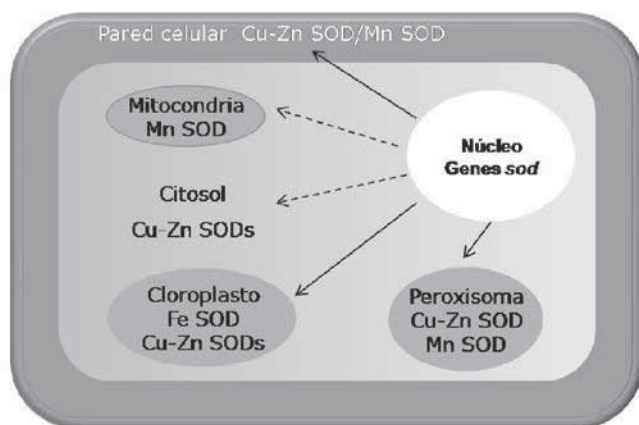


Figura 4.4. Localización de los diferentes tipos de superóxido dismutasas en plantas. Modificado de Alscher *et al.*, 2002

Comparando las secuencias de aminoácidos de estos tres tipos de isoenzimas se sugiere que las que contienen Mn y Fe son las más ancestrales y probablemente provienen de un ancestro en común, mientras que las que contienen Cu-Zn no tienen secuencias similares a las de Mn y Fe. Se sugiere que la razón de su evolución separada sea debido a la disponibilidad de los metales en la biosfera con relación al contenido de oxígeno en la atmósfera en las diferentes eras geológicas (Alscher *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2008).

4.4 Superóxido dismutasas de hierro

Las isoenzimas que contienen Fe SOD probablemente constituyen el grupo más ancestral de las SOD. Se ha sugerido que el hierro fue probablemente el primer metal usado como cofactor de la primera SOD debido a su abundancia en forma soluble, Fe (II). Cuando los niveles de O_2 en el ambiente se incrementaron, los componentes minerales del ambiente fueron oxidados, provocando un cambio en la disponibilidad de hierro soluble Fe (II) por el metal más disponible, el Mn (III) (Alscher *et al.*, 2002). Estas isoenzimas se encuentran en organismos procariontes y eucariontes, en eucariontes se han aislado de *Euglena gracilis* y de plantas superiores. Se inactivan por H_2O_2 y son resistentes a la inhibición por KCN. En las especies de plantas examinadas se ha localizado en los cloroplastos, usando anticuerpos policlonales, además se ha encontrado una secuencia blanco para cloroplasto de una Fe SOD en frijol de soya. La ausencia de Fe SOD en animales sugiere que el gen de Fe SOD se originó en los plastidios y se movió al genoma nuclear durante la evolución, regiones conservadas en plantas y cianobacterias de secuencias de Fe SOD apoyan esta teoría. Por otro lado, estas isoenzimas no están presentes en todas las plantas (Alscher *et al.*, 2002).

Hay dos distintos grupos de Fe SOD. El primer grupo es un homodímero formado por dos subunidades proteicas idénticas de 20 kDa, con 1-2 átomos-gramo de hierro en el sitio activo. Este tipo de Fe SOD se ha aislado de *Escherichia coli*, *Photobacterium sepiæ* y *P.*

leionathæ, de anaerobios facultativos como *Thiobacillus denitrificans*, de especies de plantas, *Ginkgo biloba*, *Brassica campestris* y *Nuphar luteum*. El segundo grupo de Fe SOD se encuentra en muchas plantas superiores, es un tetrámero de cuatro subunidades iguales con un peso molecular de 80-90 kDa (Figura 4.5A). Los miembros de este grupo contienen 2-4 átomos-gramo de hierro en el sitio activo. Las proteínas en este grupo han sido aisladas de tres procariontes: *Mycobacterium tuberculosis*, *Thermoplasma acidophilum* y *Methanobacterium bryantii* en adición a una eucarionte *Tetrahymena pyriformis* (Alscher *et al.*, 2002).

4.5 Superóxido dismutasa de manganeso

Cuando los niveles de O_2 en el ambiente aumentaron, la cantidad de Fe (II) en el ambiente decreció, causando un cambio por el metal más disponible, el manganeso Mn (III). Como consecuencia Mn SOD es la segunda SOD ancestral. Estas isoenzimas se han encontrado en la mitocondria y peroxisomas y poseen sólo un átomo del metal por subunidad. Esta enzima no puede funcionar sin el átomo de Mn en el sitio activo. Aún cuando tienen gran similitud en su estructura primaria con las Fe SOD y Mn SOD, estas enzimas han divergido lo suficiente de tal manera que el Fe (II) no puede restablecer la actividad de Mn SOD y viceversa (Fridovich, 1986). Su catálisis es a través de la atracción de las moléculas de O_2^- al sitio activo formado por aminoácidos positivamente cargados presentes en la enzima. El metal presente en el sitio activo dona un electrón directamente al O_2^- , reduciendo una molécula de O_2^- , el cual forma H_2O_2 al reaccionar con un protón (Asada, 1994; Bowler *et al.*, 1994).

Las Mn SOD son enzimas homodiméricas u homotetraméricas con un átomo de Mn (III) por subunidad (Figura 4.5B). La enzima no es inhibida por cianuro de potasio (KCN) ni es inactivada por H_2O_2 y está presente tanto en organismos eucariontes como en procariontes. Las Mn SOD de plantas tienen un 65% de similitud en secuencia, además presentan alta similitud con las Mn SOD de bacterias (Bowler *et al.*, 1994).

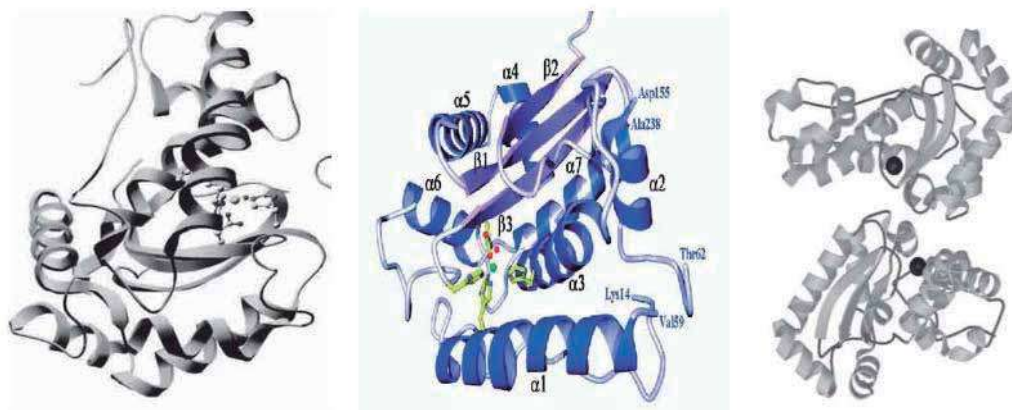


Figura 4.5. Estructura de las superóxido dismutasas. A: Fe SOD, B: Mn SOD y C: Cu-Zn SOD. Tomado de Bordo *et al.*, 1994 y Fink y Scandalios, 2002.

Aunque se han localizado en mitocondrias de células eucariontas, también se han encontrado en peroxisomas y en el espacio extracelular. En maíz se han reportado cuatro genes que codifican para Mn SOD. Además del maíz, se han encontrado en mitocondrias de tabaco (*Nicotiana tabacum*, Bowler *et al.*, 1994), piña, claveles (*Dianthus caryophyllus*, chícharo (*Pisum sativum*, Foster y Edwards, 1980) y espinacas (*Spinacea oleracea*), entre otras. Finalmente, se han reportado en las membranas de los tilacoides de algas verdes y cianobacterias (Alscher *et al.*, 2002).

4.6 Superóxido dismutasa de cobre y zinc

Cuando los niveles de O_2 aumentaron en la atmósfera, el Fe (II) ya no estuvo disponible y el Cu (I) fue convertido a su forma soluble Cu (II). En este estado el Cu (II) comenzó a ser usado como cofactor en el sitio activo de la enzima. Las isoenzimas de Fe y las de Mn tienen propiedades eléctricas similares, la transición del uso de Fe al uso del Mn requirió pocos cambios en la estructura de la proteína. Así las SOD de Fe y Mn son estructuralmente similares. Sin embargo, las propiedades eléctricas de las SODS Cu-Zn difieren ampliamente de

las de Fe y Mn. Por lo tanto hubo un cambio mayor en la estructura de la proteína después de que el Cu se usó como el metal cofactor. Las SOD de Fe y Mn están presentes en procariontes y eucariontes mientras que la de Cu-Zn está presente sólo en eucariontes, si bien estas últimas se han reportado en algunas bacterias por ejemplo: *Caulobacter crescentus* y *Pseudomonas* (Alscher *et al.*, 2002).

Hay tres tipos diferentes de Cu-Zn SOD, el primero consiste de formas citoplásmicas y periplásmicas, las cuales son homodiméricas. El segundo grupo de Cu-Zn SOD son cloroplásticas y extracelulares las cuales son homotetraméricas (Figura 4.5C). Los sitios activos de cada subunidad funcionan independientemente. Cuando estas subunidades son separadas y después acopladas a una subunidad inactiva, nuevamente la enzima muestra su actividad completa, lo cual provee evidencia de que las interacciones funcionales entre las subunidades no son esenciales para la actividad catalítica completa (Fridovich, 1986).

La isoenzima extracelular había sido reportada exclusivamente en mamíferos, dicha enzima es una glicoproteína y es localizada principalmente en la matriz intersticial de tejidos y en el glicocalix de la superficie celular, anclada a proteoglicanos. Sin embargo, hay evidencia de la ubicación extracelular de una isoenzima de Cu-Zn en plantas (Ogawa *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2006).

La secuencia de aminoácidos de las isoformas citosólicas y cloroplásticas presentan aproximadamente un 68% de similitud, mientras que dentro de las cloroplásticas hay un 90% de similitud y 80-90 % de similitud entre las citosólicas (Ogawa *et al.*, 1996). En espinaca se han identificado las dos isoformas (Asada y Kiso 1973; Asada 1973). Estudios de inmunolocalización realizados con anticuerpos para Cu-Zn SOD cloroplástica de espinaca mostraron que ésta se localiza en el estroma de la cara membranal del tilacoide (Ogawa *et al.*, 1995) donde se encuentra el fotosistema I. Las otras dos enzimas Cu-Zn SOD son consideradas citoplásmicas debido a que no se han detectado en cloroplastos intactos. Sin embargo, experimentos de localización mostraron que estas enzimas están presentes en el núcleo y en el apoplasto; más del 40% fueron localizadas en el apoplasto y aproximadamente el 25% están presentes en el núcleo (Ogawa *et al.*, 1996). La presencia de estas Cu-Zn SOD en el apoplasto sugiere su participación en procesos de lignificación y en el núcleo podrían proteger a la célula de mutaciones causadas por O_2 (Ogawa *et al.*, 1997).

4.7 Actividad y expresión de SOD bajo condiciones de estrés oxidativo.

Los Herbicidas del tipo bupiridilium pueden unirse a la membrana del tilacoide de los cloroplastos y transferir electrones al O_2 en una reacción en cadena causando una formación continua de O_2^- . Como resultado, el $NADP^+$ no puede ser reducido durante la fotosíntesis y cesa la fijación de carbono. El metil viologeno (1,1'-dimetil-4,4'-cloruro de bupiridilium) es un herbicida tipo bupiridilium ampliamente usado en plantas para estudiar los daños en el cloroplasto (Dodge, 1994). El metil violageno también afecta las reacciones de transducción de electrones en el retículo endoplásmico y en la mitocondria, así como los niveles de SOD cloroplástica, mitocondrial y citosólica (Dodge, 1994; Van Camp *et al.*, 1994). En plántulas de 16 días de edad de *Arabidopsis thaliana* bajo tratamientos con

metil viologeno se determinó la actividad enzimática y los niveles de proteína, mostrándose un incremento en la actividad de Fe SOD 5 horas después del tratamiento (Alscher *et al.*, 2002).

En estudios sobre el efecto de la luz UV B y la exposición a ozono en angiospermas, se ha sugerido que el ozono entra a las células del mesófilo a través de los estomas y éste es convertido a anión superóxido, radical hidróxilo y peróxido de hidrógeno. En plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas a ozono se induce la actividad de las isoformas de Cu-Zn SOD, los niveles de expresión de RNAm de Cu-Zn SOD se incrementan y los niveles de Fe SOD disminuyen, durante la adaptación al tratamiento con ozono. Estas respuestas indican que la regulación al estrés oxidativo está influenciada por componentes ambientales. Debido a que las isoformas de SOD están compartimentalizadas en diferentes organelos, los niveles de RNAm de SOD indican que cada estrés afecta diferentes compartimentos celulares. El efecto de la luz blanca sobre la abundancia de transcritos de SOD en hojas etioladas y verdes revela que las Fe SOD cloroplásticas son más afectadas por luz blanca. Durante la iluminación, los radicales de oxígeno se generan principalmente por la pérdida de electrones del fotosistema I y de la ferredoxina (Apel y Hirt, 2004).

Inducción de SOD por temperatura.

Estudiando el efecto de la temperatura sobre la SOD se ha observado que el ARNm que codifica para una Cu-Zn SOD se acumula durante este tipo de estrés y durante el periodo de recuperación después del estrés por frío. Sugiriendo que durante el estrés por frío el citosol es el sitio de formación de radicales, posiblemente un exceso en la actividad de Cu-Zn SOD citoplásmica aumente los niveles de H_2O_2 durante el choque térmico lo que puede activar los mecanismos de defensa de la célula (Sen y Xing, 2000). Por otro lado el nivel de expresión de Mn-SOD en plántulas de trigo durante estrés por frío aumentó a las tres semanas del tratamiento (Baek y Skinner, 2006).

Cambio en la expresión de SOD durante el desarrollo.

La función de estas enzimas para combatir los efectos tóxicos de las ERO, muestra que son reguladas durante procesos de desarrollo tales como la floración y la germinación. En la matriz extracelular o apoplasto, estabiliza la estructura física del tejido de la planta. Este tiene una función en el control del crecimiento, diferenciación, reparación de heridas y la resistencia a la invasión por patógenos. El número de enzimas en este compartimento es bajo, comparado con el citoplasma y consiste principalmente en hidroxilasas, peroxidasas, lacasas y otras oxidoreductasas. Las reducciones monovalentes o divalentes del oxígeno forman especies reactivas de oxígeno dentro de la matriz extracelular y el principal producto es el peróxido de hidrógeno, el cual está involucrado en la lignificación de la pared celular, reacciones de defensa contra infecciones microbianas y el entrecruzamiento de proteínas estructurales de pared celular. La enzima SOD fue inicialmente localizada como una enzima intracelular en plantas, pero también se ha encontrado en matrices extracelulares. Por ejemplo, se ha localizado en el apoplasto de nódulos de pino por medio de la purificación de fluidos extracelulares (Streller y Winsgle, 1994), además de su inmunolocalización en espinaca (Ogawa *et al.*, 1996). Las CuZn-SODs extracelulares se expresan durante el desarrollo en fibras de algodón sugiriendo su participación en la formación de lignina durante los procesos de desarrollo (Kim *et al.*, 2008).

4.8 Perspectivas

Las SOD se encuentran distribuidas en todas las células vegetales y constituyen elementos importantes para el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno, tanto bajo condiciones normales de desarrollo como durante situaciones de estrés provocado por diferentes factores bióticos y abióticos. El estudio de estas enzimas en el apoplasto en situación de estrés nos permitirá conocer el mecanismo de respuesta primario de las células ante diferentes factores ambientales y ataque por patógenos, ya que el apoplasto es la región de contacto

inicial de las células con su medio ambiente.

Referencias

- Alscher R.G., Erturk N. and Heath L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1331-1341.
- Apel K. and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 3373-3399.
- Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In Foyer CH, Mullineaux PM, eds. *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Boca Raton: CRC Press, 77-104.
- Asada K. and Kiso K., 1973. Initiation of aerobic oxidation of sulphite by illuminated spinach chloroplast. *Eur. J. Biochem.* 33: 253-257.
- Asada K., Urano M. and Takahashi M. 1973. Subcellular location of superoxide dismutase in spinach superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 36:257-266.
- Baek K.H. and Skinner D. Z. 2006. Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variant in near isogenic lines of wheat during cold acclimation. *Plant Cell Rep.* 25: 223-230.
- Bordo D., Djinnovic K. and Bolognesi M. 1994. Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *J. Mol. Biol.* 238:366-386.
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M. and Inzé D. 1994. Superoxide dismutases in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:199-218.
- Dodge A. 1994. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: Mullineaux P. Foyer C. eds. *Causes of photo oxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Boca Raton: CRC Press. 219-236.
- Fink R.C. and Scandalios J.G. 2002. Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families

- in angiosperms and their relationship to other eucaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch. Biochem. Biophys.* 399:19-36.
- Foster J.G., Edwards G.E., 1980. Localization of superoxide dismutase in leaves from C₃ and C₄ plants. *Plant Cell Physiology*. 21:895-906.
- Fridovich I. 1986. Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 58: 61-97.
- Hückelhoven R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 2.1-2.27.
- Kim H.J., Kato N. and Kim S. 2008. Cu/Zn superoxide dismutases in developing cotton fibers evidence for an extracellular form. *Planta* 228:281-292.
- Leon R, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ. 2001. Wounding signaling in plants. *JExp. Bot.* 52:1-9.
- Moller I.M., Jensen P.E. and Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:459-481.
- Ogawa K., Kanematsu S. and Asada K. 1996. Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 37: 790-799.
- Ogawa K., Kanematsu S. and Asada K. 1997. Generation of superoxide anion and localization of CuZn superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol.* 38: 1118-1126.
- Ogawa K., Kanematsu S., Takebe K. and Asada K. 1995. Attachment of Cu, Zn SOD to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immune-gold labeling after rapid freezing. *Plant Cell Physiol.* 36: 565-573.
- Scandalios JG., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 38: 995-1014.
- Sen S. and Xing W.D. 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *Bot. Rev.* 66: 89-98.
- Streller S. and Winglase G. 1994. *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta* 192: 195-201.
- Van Camp W., Willekens H., Bowler C., Van Montagu M., Inzé D, Langebartels C, and Sandermann H. 1994. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Bio/Tech.* 12:165-168.

CAPÍTULO VI

ERO EN FRUTO DE CHILE



Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect

Physiological and Molecular Plant Pathology 70 (2007) 69–76

PMPP

www.elsevier.com/locate/pmpp

Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) induced by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst

Arreola-Cortés Araceli^a, Castro-Mercado Elda^a,
Lozoya-Gloria Edmundo^b, García-Pineda Ernesto^{a,*}

^aInstituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B3, C.P. 58040 Morelia, Mich., Mexico

^bCentro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, Departamento de Ingeniería Genética, P.O. Box 629, C.P. 36500 Irapuato, Guanajuato, Mexico

Accepted 2 July 2007

Abstract

The oxidative burst and the role of H₂O₂ in regulating the capsidiol accumulation were investigated in pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). Immediately after arachidonic acid (AA) treatment an initial burst of reactive oxygen species (ROS) occurred. O₂^{•−} radicals and lipid peroxidation were evident at 30 min and 4 h, respectively and the maximum H₂O₂ production was reached within 6 h. Treatment with the DPI inhibitor indicated that the putative source of ROS was a plasma membrane NADPH-dependent oxidase. Exogenous treatment with H₂O₂ induced capsidiol phytoalexin accumulation. Addition of isophylline, an inhibitor of phospholipase D, decreased capsidiol accumulation in presence of AA. To investigate the involvement of the redox metabolism during defense activation, we analyzed the effect of AA on the ascorbate oxidase (APX) activity, which is an important enzyme to detoxify H₂O₂. APX activity decreased after 4 h of AA treatment, suggesting that this enzyme may be important to regulate the H₂O₂ accumulation in pepper. In addition to AA, other elicitors of plant defense responses like cellulase and salicylic acid were able to decrease the APX activity. The relevance and role of ROS and redox metabolism in pepper defense responses will be discussed.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Arachidonic acid; Hydrogen peroxide; Ascorbate peroxidase; Capsidiol; *Capsicum annuum*

1. Introduction

Important progresses have been made in understanding the mechanisms by which plants detect and defend themselves against external biotic aggressions. In response to microbial attack, plants activate a complex series of responses that lead to the local and systemic induction of a broad spectrum of antimicrobial defenses. Recent advances include the cloning and characterization of plant disease resistance genes ruling the recognition of specific pathogen strains, and the identification of components involved in the signal transduction pathways coupling pathogen recognition to the activation of defense responses [1].

Among the large variety of defense reactions activated in plant tissues or suspension cell cultures in response to pathogen attack, reactive oxygen species (ROS) production

is earliest. This term includes the superoxide radical (O₂^{•−}), hydrogen peroxide (H₂O₂) and the hydroxyl radical (OH[•]). They are produced by the sequential reduction of molecular oxygen. The H₂O₂ is relatively stable in solution but O₂^{•−} is unstable and can dismutate to H₂O₂ via either superoxide dismutase (SOD) enzyme reaction or non-enzymatically. These oxygen species are highly reactive damaging membrane lipids, proteins, pigments and nucleic acids resulting in a dramatic reduction of growth and productivity and finally resulting in plant death [2].

However, some evidence suggests that H₂O₂ is also functioning as a plant signal molecule [3,4]. Expression of defense-related genes such as *GST*, encoding glutathione-S-transferase, and *PAL* encoding phenylalanine ammonia lyase, both are induced by H₂O₂ [5–7]. Conserved signaling kinases such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), that modulate gene expression and transduce cellular responses to extracellular stimuli, are also H₂O₂ activated [8]. Furthermore, several studies indicate that H₂O₂ is a key factor mediating

*Corresponding author. Tel./fax: +52 01 443 326578.

E-mail address: egpineda@zeus.umich.mx (G.-P. Ernesto).

programmed cell death (PCD) in response to pathogens, elicitors, and hormones [9–11].

Plants have evolved various protective mechanisms to eliminate or reduce ROS damage like the enzymatic antioxidant system. This involves the sequential and simultaneous action of some enzymes including ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). APX (E.C. 1.11.1.11) has been reported in chloroplasts and cytosol and is the key enzyme of the ascorbate cycle. It uses H_2O_2 to convert ascorbic acid to dehydroascorbate [12]. According to its H_2O_2 -scavenging role, APX gene expression is induced in response to many environmental stresses resulting in ROS accumulation [13–15]. On the other hand, APX enzyme activity suppression has been suggested in order to accumulate H_2O_2 during hypersensitive response (HR), and activation of defense responses [16]. Furthermore, the expression of cytosolic APX gene was post-transcriptionally suppressed during viral-induced PCD in tobacco. This suppression should contribute to a reduction in the capability of cells to scavenge H_2O_2 , which is accumulated and then accelerating the PCD [17]. So, the induction repression of APX genes and respective biochemical regulation of corresponding enzymes activities seems to play a crucial role for the determinant consequences of specific H_2O_2 levels in the plant cell.

It is known that pepper fruits are among the richest regarding ascorbic acid levels and with high antioxidant activity in general. The concentration and changes in carotenoids, flavonoids, total soluble reducing equivalents, phenolic acids, ascorbic acid, and antioxidant activity in different pepper types (*Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, and *Capsicum chinense*) was increased as the pepper reached maturity [18]. Regarding the particular chemical plant defense response to microbial attack, the biosynthesis and induction mechanisms of the sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol produced in green pepper [19] and tobacco [20] had been studied. Previous results from our laboratory showed that capsidiol was induced in pepper fruits by treatment with arachidonic acid (AA) [21]. Also, changes in pepper ascorbate oxidase (AO) gene expression and enzyme activity, which catalyses ascorbate oxidation in the presence of oxygen, were observed after AA treatment [22].

Because capsidiol biosynthesis is one of the important defense mechanisms in pepper plants against pathogen attack [23], we were interested to know: (1) which are the possible interrelationships between ROS production and capsidiol biosynthesis in pepper fruits elicited by AA, and (2) how changes the ascorbate metabolism, specifically APX activity, in response to this elicitor. Some related results are shown and discussed in this work.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Pepper fruits (*C. annuum* L. cv. Ancho San Luis) were obtained from local market and used throughout this study. Commercially available green pepper seeds of cv.

Ancho San Luis (PETOSEED, San Quintin, BCN, Mexico) were germinated in darkened trays of damp vermiculite at 25/28 °C (night/day). On emergence each seedling was transplanted into a pot of compost. Seedlings were grown at 25/28 °C under 8-h light and 16-h darkness photoperiod. Experiments were performed on the leaves from plants that were 3 months old (third leaf fully expanded). Conditions for treatment of pepper fruits with AA, extraction and analysis of capsidiol phytoalexin were as described previously [21].

2.2. Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI) and were of the highest purity (> 99%).

2.3. NBT staining

Histochemical staining for $O_2^{\cdot-}$ production in whole tissue was based on the ability of cells to reduce nitroblue tetrazolium (NBT) as described [24]. Leaves were vacuum-infiltrated after AA treatment with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 0.05% NBT. After 15 min of staining at room temperature under light, the NBT-treated tissues were placed in 96% (v/v) ethanol to stop reaction, and soaked several times to remove chlorophyll, and to preserve tissue integrity.

2.4. Measurement of hydrogen peroxide

For hydrogen peroxide assay green mature pepper fruits were sliced in 0.5 g pieces and incubated for different times with 1 mM AA at room temperature. The assay was modified using peroxidase as catalyst and guaiacol as substrate [25]. The reagent mixture contained 0.05% guaiacol ($440 \mu\text{L}^{-1}$), and peroxidase from horseradish ($350 \mu\text{L}^{-1}$; 2500 U mL^{-1}) dissolved in 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). H_2O_2 in the medium was measured by incubating 100 μL with same volume reagent mixture for 15 min at room temperature in the dark. The reaction turns the reagent mixture to an unstable brown color and absorbance was measured immediately at 450 nm. Commercial hydrogen peroxide was used for standard curve. Medium samples and non-treated controls were assayed in the same way as inoculated samples.

To analyze the inhibitory effect of the diphenyleneiodonium (DPI) on H_2O_2 production, DPI was vacuum-infiltrated into the pepper tissues in the same buffer for 0.5 h before elicitor treatments.

2.5. Lipid peroxidation analysis

Lipid peroxidation was monitored with the spectrophotometric determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid [26]. Pieces of pepper fruit (0.5 g fresh weight) were incubated to different times with 1 mM AA, and then collected to lipid peroxidation assays. Briefly, pepper tissue

was homogenized in 1 mL of trichloroacetic acid (10%, w/v) and centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min. A 125 μ L aliquot of crude extract was added with 125 μ L of trichloroacetic acid (10%, w/v) plus 500 μ L of thiobarbituric acid (0.2%, w/v) in trichloroacetic acid (10%). The mixture was boiled at 95 °C for 5 min and cooled on ice for 5 min. After centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min, the A_{535} of supernatant was determined and the A_{260} nonspecific value was subtracted. The concentration of thiobarbituric acid (TBARS) was calculated by using the extinction coefficient of $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, and results were expressed as nanomols TBARS per gram FW.

2.6. Capsidiol extraction

Pepper fruits were incubated for 24 h with 1 mM AA or different H_2O_2 concentrations and the solution was extracted twice with same volume of chloroform, the combined extracts were dried in a fume hood. Residues were dissolved in ethyl acetate and capsidiol was qualitatively assayed on TLC silica gel plates developed with cyclohexane ethyl acetate (1:1). Color reaction was carried out after spraying with vanillin H_2SO_4 (2.8 g vanillin in 100 mL MeOH containing 0.5 mM concentrated H_2SO_4) and heating the plates at 80 °C by 3–5 min [23]. The capsidiol identity was previously confirmed by gas chromatography/mass spectrometry of pure capsidiol. Lisophylline (100 μ M), an inhibitor of phospholipase D, was inoculated into the pepper fruits, incubated by 2 h and then treated with 1 mM AA for 24 h. Phosphatidic acid (100 μ M) (PA) was inoculated and after 24 h capsidiol was extracted.

2.7. Ascorbate peroxidase enzyme activity

Apoplastic fluid was obtained from pepper fruit tissue [27]. Briefly, apoplastic soluble components were obtained from vacuum-infiltrated in medium composed of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.4), 0.3 M mannitol, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 , and 0.05% (w/v) cysteine at 4 °C for 5 min, followed by centrifugation at $1500 \times g$ for 5 min. APX enzyme activity was spectrophotometrically assayed following the H_2O_2 -dependent oxidation of ascorbate (ASC) at 265 nm in a reaction mixture composed of 50 μ M ASC, 90 μ M H_2O_2 , 50–100 μ g protein and 0.1 M phosphate buffer, pH 6.4. The non-enzymatic H_2O_2 -dependent oxidation of ASC was subtracted (extinction coefficient $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [28]. Protein measurement was performed using BSA as standard [29].

The presence of glucose 6-phosphate in the apoplast fluid was used as a marker for cytoplasm contamination.

3. Results

3.1. Histochemical localization of $\text{O}_2^{\cdot-}$

The accumulation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ in AA-treated pepper leaves was analyzed over 6 h period, using a direct in situ

detection with NBT. The addition of AA resulted in a significant increase in the accumulation of $\text{O}_2^{\cdot-}$, reached a maximum after 0.5 h, and decreased thereafter (Fig. 1A), in contrast $\text{O}_2^{\cdot-}$ accumulation was low in control leaves.

Also, AA treatment in pepper fruit tissues resulted in an increase in the production of H_2O_2 (Fig. 1B). Increase started within 2 h after treatment, reaching a maximum at about 6 h, and declined within 24 h. Control fruit tissue exhibited a baseline production of H_2O_2 equivalent to 20–40 μ M. When the tissue was previously incubated with different concentrations of DPI, H_2O_2 concentration was reduced to the baseline level (Table 1). Hence, the AA-induced increase of H_2O_2 was presumably rose by a plasma membrane NADPH oxidase.

The time course of lipid peroxidation was investigated in pepper fruit tissue. Fig. 1C shows that change in lipid peroxidation were observed 4 h after AA treatment. In water-infiltrated control tissues, basal lipid peroxidation was maintained for at least 24 h, whereas TBARS content was slightly increased from 4 h until 24 h after AA treatment.

3.2. Capsidiol induction by H_2O_2

Although H_2O_2 has been shown to be involved in a number of plant defense response processes, no evidence links H_2O_2 with phytoalexin accumulation directly in pepper fruits. To study H_2O_2 effect on capsidiol accumulation, different H_2O_2 concentrations were exogenously added to pepper fruits and capsidiol accumulation was monitored 24 h after treatment (Fig. 2). H_2O_2 induced capsidiol accumulation and optimal induction was observed with 0.2 mM H_2O_2 (Fig. 2A). These results are consistent with a role, as a diffusible signal, for endogenous H_2O_2 generated by elicitor treatment.

The time course of capsidiol accumulation was investigated using 0.2 mM H_2O_2 . Fig. 2B shows that capsidiol started to accumulate 8 h after treatment, and increasing sharply during the next 24 h, the response to H_2O_2 addition was similar to that observed by AA treatment (data not shown).

Phospholipids play an important role in many signaling pathways in animal and plant cells, specifically PA generated by phospholipase D has been identified as an important cellular messenger [30]. To analyze if phospholipase D was involved in the capsidiol production exogenous PA and lisophylline, a phospholipase D enzyme inhibitor, were added to pepper fruits before AA treatment (Fig. 3). Capsidiol accumulation decreased when lisophylline was present and PA alone stimulated it. These results showed that phospholipase D activity was involved in capsidiol production.

3.3. Ascorbate peroxidase levels in the apoplast of pepper fruits

To determine whether APX is sensitive to AA treatment, apoplastic fluid was prepared from AA-treated pepper fruits and analyzed for APX activity (Fig. 4). There was a

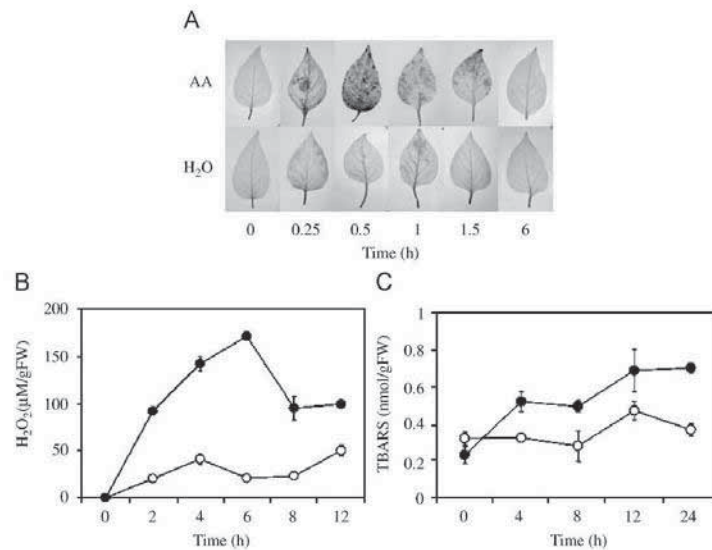


Fig. 1. ROS production in pepper by AA. (A) $O_2^{\cdot -}$ production in leaves detected by NBT staining in situ. Pepper leaves were infiltrated with AA and incubated for different times, then infiltrated with NBT at room temperature under light. NBT-treated tissues were placed in ethanol to stop reaction, remove chlorophyll, and preserve tissue integrity. (B) Pepper fruit tissues were incubated with AA solution and produced H_2O_2 was measured in the incubation medium. (C) Time course of lipid peroxidation in pepper fruit tissue in response to AA treatment. TBA-reactivity was measured after different times of incubation. All experiments were repeated at least three times. Data are means $\pm$ SD; $n = 4$. (●) AA; (○) H_2O .

Table 1
Effect of diphenyleneiodonium on H_2O_2 production in pepper fruits treated with arachidonic acid^a

Treatment	H_2O_2 ($\mu M g^{-1} FW$)
Control (H_2O)	15 $\pm$ 1.5
Arachidonic acid	104 $\pm$ 2.0
Diphenyleneiodonium (μM)	
0.5	98 $\pm$ 2.0
1	25 $\pm$ 1.8
5	5 $\pm$ 1.1
10	5 $\pm$ 0.5

^aExperiments were conducted as described in Material and Methods. Media and SE are calculated for three independent experiments.

marked decrease of APX activity 4 h after AA treatment, reaching a 50% inhibition after 24 h treatment (Fig. 4A).

The APX enzyme activity assay used in this study was specific for the apoplastic APX, since H_2O_2 depletion of buffer assay abolish the enzyme activity, as shown in Fig. 4B. There was no detectable glucose 6-phosphate in the apoplastic fluid. Thus, the previously described procedure to obtain apoplastic fluid was apparently not contaminated with intracellular material (data not shown).

The ROS production is increased when plants are exposed to various biotic and abiotic stresses [31]. In these studies, the effect on APX enzyme activity of two plant

defense elicitors, cellulase and salicylic acid, was investigated (Table 2). Interestingly, pepper fruit tissue treated with both elicitors resulted in a significantly lower APX activity than controls.

4. Discussion

In this work, we studied the oxidative burst elicited by AA and its relation with capsidiol and the redox metabolism in pepper fruit. The aim of the current work was to find evidence that H_2O_2 have a direct role to activate defense mechanism in this plant and that ascorbate metabolism is involved during this activation. The accumulation of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 started within 15 min and 2 h after AA treatment, respectively, and was very pronounced, lasting for several hours.

Evidence on ROS production in response to elicitor treatment in plants is well documented [32–35]. Based on the use of DPI inhibitor, a suicide inhibitor of the phagocyte plasma membrane NADPH-dependent oxidase [36], it has been proposed that a membrane-bound enzyme resembling the neutrophil NADPH oxidase likely contributes to the pathogen-induced oxidative burst in plants [37]. Our present results with pepper focused to study the ROS origin using different concentrations of DPI showed that ROS production may derive from an NADPH-dependent oxidase, because its production was abolished

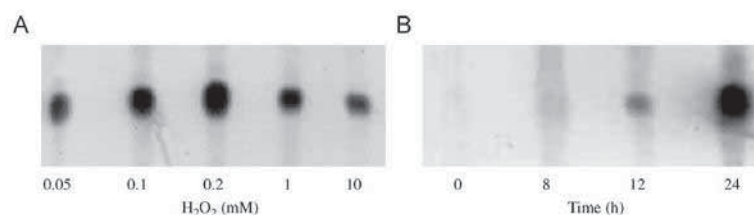


Fig. 2. Effect of H₂O₂ on capsidiol accumulation. (A) Induction of capsidiol phytoalexin by different concentrations of H₂O₂ injected into pepper fruits. After incubation, capsidiol was extracted and detected by TLC. (B) Time course of capsidiol production in pepper fruits treated with 0.2 mM H₂O₂. The experiments were repeated at least three times with similar results.

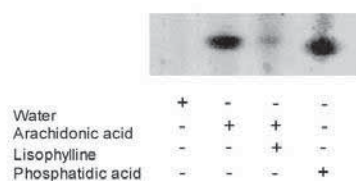


Fig. 3. Phosphatidic acid induces capsidiol production. Pepper fruits were treated as described in Material and Methods, after each treatment capsidiol was extracted and analyzed by TLC. The results are representatives of three independent experiments.

with μM levels of this inhibitor (Table 1). Although DPI has also been shown to inhibit the H₂O₂ generating activity of peroxidases, it is only able to do so at mM concentrations [38]. These results in addition with the recently cloned oxidase showing high homology with human gp^{91phox} from tomato [39] and the fact that an oxidase was shown to rise ROS in tobacco [40], support the indication that the NADPH-dependent oxidase-mediated generation of ROS is prevalent in Solanaceae. An additional support to explain the ROS origin in this plant family was the treatment of potato tubers with AA which caused a rapid but weak transient accumulation of H₂O₂, followed by a massive oxidative burst 6–9 h after treatment. This induced the *Strboh* gene expression in potato tubers, which is the homologous of gp^{91phox} gene [41].

Increasing evidence indicates that H₂O₂ functions as a signaling molecule in plants. H₂O₂ generation during the oxidative burst is one of the earliest cellular responses to pathogens and elicitor molecules [3], and it has been shown to induce the expression of defense-related genes [5, 8, 42]. Our data with exogenously H₂O₂ at various concentrations added to pepper fruit demonstrated that physiological doses of H₂O₂ induced capsidiol accumulation, indicating its requirement for the activation of this defense response in pepper (Fig. 2).

Using lisophylline, we have shown that phospholipase D activity was also important during capsidiol accumulation (Fig. 3). In plants, activation of this enzyme, which hydrolyzes phospholipids into free head groups and PA, is involved with osmotic stress, abscisic acid treatment,

wounding and plant defense [43]. Intracellular PA levels increase under various biotic and abiotic stress conditions, including pathogen elicitation [44, 45] and wounding [46]. It is suggested that a potential mechanism of PA action in plant stress responses is the activation of an NADPH oxidase that produces ROS, similar to the system in neutrophils [47, 48], and it has been shown that PA promotes ROS formation in Arabidopsis [49].

Although in potato tuber evidence have been provided which indicates that lipoxygenase acts as a mediator of AA-elicitation [50], and that 5-S-HPETE, the first product of the action of 5-lipoxygenase on AA, is capable of inducing phytoalexin accumulation at much lower concentrations than are required for AA [51], ours results using lisophylline, suggest that another way involving PA production also could be used by AA to activate capsidiol accumulation. The generation of superoxide phosphatidic acid-mediate, NADPH-dependent and sensitive to DPI in Arabidopsis [52], and the direct activation of NADPH oxidase by PA in intact neutrophils [53] support this possibility.

To test the possibility that during AA treatment a decrease in activity of antioxidant enzymes may result in ROS accumulation, APX activity from the apoplasto pepper fruit was assayed. This enzyme detoxifies hydrogen peroxide using ascorbate for reduction. A decrease in APX enzyme activity was observed in response to AA addition (Fig. 4). Increasing evidence points that the suppression of H₂O₂ scavenging activity probably contributes to the accumulation of threshold levels of H₂O₂ or changes in H₂O₂ homeostasis, which are necessary for the activation of plant defense responses [54]. In tobacco cells that undergo a hypersensitive reaction upon infiltration with a fungal elicitor, the accumulation of H₂O₂ is correlated with a decrease in CAT1 and CAT2 transcript and protein levels together with a decrease in total catalase activity [55]. Similarly, viral- and pathogen-induced HR-like cell death is accompanied by a post-transcriptional suppression of cytosolic APX production [18]. Also, it have been reported that salicylic acid and the synthetic inducer of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid inhibits APX. Enzyme activity inactivation correlated with their ability to induce defense-related genes in tobacco and enhance

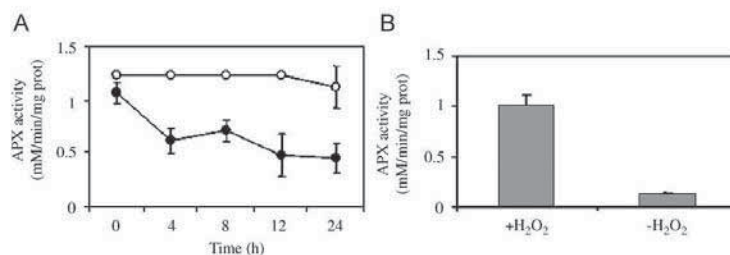


Fig. 4. Changes in APX enzyme activity in response to AA. (A) Pepper fruit tissues were incubated by different times with 1 mM AA and the APX enzyme activity from the apoplastic fluid was determined, following the H₂O₂-dependent oxidation of ASC at 265 nm. (B) APX enzyme requirement for H₂O₂. Enzyme activity was assayed from control pepper tissue with and without H₂O₂ in the reaction buffer. Data are means $\pm$ SD; $n = 4$. (●) AA; (○) H₂O.

Table 2
Effects of elicitors of plant defense responses on APX activity in pepper fruits^a

Treatment	APX activity (mM min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)
Cellulase (mg fruit ⁻¹)	
0	1.02 $\pm$ 0.10
1	0.22 $\pm$ 0.01
8	0.32 $\pm$ 0.03
15	0.34 $\pm$ 0.02
Salicylic acid (mM)	
0	1.02 $\pm$ 0.10
0.1	0.12 $\pm$ 0.03
1	0.11 $\pm$ 0.01
5	0.46 $\pm$ 0.06

^aPepper fruits were incubated for 24 h with different concentrations of cellulase or salicylic acid and then APX activity was assayed as described in Material and Methods. Media and SE are calculated for three independent experiments.

resistance to tobacco mosaic virus [16]. More recently was reported that pepper ascorbate peroxidase-like (CAPOA1), thioredoxin peroxidase-like (CAPOT1), and peroxidase-like (CAPO1) mRNA were down regulated in pepper leaves inoculated with avirulent strain Bv5-4a of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*; suggesting that the accumulation of H₂O₂ during the PCD may be due to the strong suppression of these genes [56].

In pepper, H₂O₂ production in response to elicitor may play a significant role during the activation of defense responses because the redox mechanisms involving APX and ascorbate oxidase [22] are regulated, perhaps to sustain ROS levels.

The apoplast is the first part of the cell contacting pathogen during a plant pathogen interaction. The apoplast is considered to be a bridge from the environment to the symplast, but it is more likely to act as a fundamental reservoir of metabolic information concerning the biotic and abiotic environment that surrounds the cell [57], thus, its redox state may be important in triggering the physiological response. Many examples of redox-regulated

signal molecules, including receptor tyrosine kinase and phosphatases, and one redox-regulated mitogen-activated protein (MAP) kinase has been described in plants [58]. H₂O₂ produced in the apoplast modulates the expression of various genes, including those encoding antioxidant enzymes and modulators of H₂O₂ production indicating the complex way in which intracellular H₂O₂ concentrations may be monitored and maintained at a constant level. However, it is still unknown whether H₂O₂-regulated transcription involves oxidative changes to transcription factors (TFs), in either the cytoplasm or the nucleus or other modifications such as phosphorylation that are ultimately initiated by H₂O₂ [59].

Acknowledgments

This research was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT) (P 43438 Z).

References

- [1] Kunkel BN, Brooks DM. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 2002;5:325–31.
- [2] Foyer CH, Lelandis M, Kunert KJ. Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* 1994;92:696–717.
- [3] Lamb C, Dixon RA. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997;48:251–75.
- [4] Pitzschke A, Hirt H. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiol* 2006;141:351–6.
- [5] Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 1994;79:583–93.
- [6] Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Neill SJ. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J* 1998;330:115–20.
- [7] Grant JJ, Yun B-W, Loake GJ. Oxidative burst and cognate redox signaling reported by luciferase imaging: indication of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-Ja but is dependent on MAPKK activity. *Plant J* 2000;24:569–82.
- [8] Samuel MA, Miles GP, Ellis BE. Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signaling in plants. *Plant J* 2000;22:367–76.
- [9] Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C. Function of oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4158–63.

- [10] Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Ellis BE. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hypersensitive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14165–70.
- [11] Kwak JM, Nguyen V, Schroeder JI. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol* 2006;141:323–9.
- [12] Asada K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 1992;85:235–41.
- [13] Mittler R, Zilinskas B. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J Biol Chem* 1992;267:802–7.
- [14] Thomsen B, Drumm-Herrel H, Mohr H. Control of the appearance of ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) in mustard seedling cotyledons by phytochrome and photooxidative treatments. *Planta* 1992;186:600–8.
- [15] Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Mullineaux PM. Photosynthetic electron regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* 1997;9:627–40.
- [16] Durrer J, Klessig DF. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11312–6.
- [17] Mittler R, Feng X, Cohen M. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 1998;10:461–73.
- [18] Howard LR, Talcott ST, Brenes CH, Villalon B. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* sp.) as influenced by maturity. *J Agric Food Chem* 2000;48:1713–20.
- [19] Stoned A, Unwin CH, Ward EWB. Postinfectious inhibitors from plants. I. Capsidiol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. *Phytopathol Z* 1972;74:141–52.
- [20] Bailey JA, Skipp RA. Toxicity of phytoalexins. *Ann Appl Biol* 1978;89:354–8.
- [21] García-Pineda E, Lozoya-Gloria E. Induced gene expression of L-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (acc oxidase) in pepper (*Capsicum annuum* L.) by arachidonic acid. *Plant Sci* 1999;45:11–21.
- [22] García-Pineda E, Castro-Mercado E, Lozoya-Gloria E. Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) ascorbate oxidase during elicitor or wounding stress. *Plant Sci* 2004;166:237–43.
- [23] Egea C, García-Pérez MD, Caudela ME. Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *J Plant Physiol* 1996;149:762–4.
- [24] Duke N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissue to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol Plant Pathol* 1983;23:345–57.
- [25] Cakmak I, Marschner RP. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide, ascorbate peroxidase, glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol* 1992;98:1222–7.
- [26] Popham PL, Novack A. Use of dimethyl sulfoxide to detect hydroxyl radical during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Plant Physiol* 1991;96:1157–62.
- [27] Takahama U, Oniki T. The association of ascorbate and ascorbate oxidase in the apoplast with LAA-enhanced elongation of epicotyls from *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol* 1995;35:257–66.
- [28] Arrigoni O, De Gara L, Tomás F, Leo R. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol* 1992;99:235–8.
- [29] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 1976;72:248–54.
- [30] Luxat AM, Munnik T. Phospholipid signaling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 2002;5:1–7.
- [31] Elstner EF. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol* 1982;33:131–54.
- [32] Legendre L, Rueter S, Heinlein PF, Low PS. Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol* 1993;102:233–40.
- [33] Robertson D, Davies DR, Gerrish C, Jupe SC, Bolwell GP. Rapid changes in oxidative metabolism as a consequence of elicitor treatment of suspension-cultured cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol Biol* 1995;27:59–67.
- [34] Rustucci C, Stallert V, Milit ML, Pugin A, Ricci P, Blein JP. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol* 1996;111:885–91.
- [35] Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock KK, Scheel D. Elicitor-stimulated ion fluxes and $O_2^{\cdot -}$ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4800–5.
- [36] Jones OTG. The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells. *Bioassays* 1994;16:919–23.
- [37] Duke N. NADPH-dependent $O_2^{\cdot -}$ generation in membrane fraction isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol* 1985;27:311–22.
- [38] Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK, Murphy TM. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol* 1998;116:1379–85.
- [39] Amacucci P, Gaschler K, Ward JM. NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curly leaf pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biol* 1999;1:324–8.
- [40] Simon-Plas F, Elmayer T, Blein JP. The plasma membrane oxidase NtrbD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* 2002;31:137–47.
- [41] Yoshioka H, Sugie K, Park H-J, Maeda H, Tsuba N, Kawakita K, et al. Induction of plant gp91 phox homologue by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant Microbe Interact* 2001;14:725–36.
- [42] Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 2001;13:179–91.
- [43] Munnik T. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* 2001;6:227–33.
- [44] Young SA, Wang X, Leach JE. Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistant interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Cell* 1996;8:1079–90.
- [45] van der Luit AH, Pintti T, van Doorn A, Masgrau A, Felix G, Bolter T, et al. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol* 2000;123:1507–16.
- [46] Ryu SB, Wang X. Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves. *Biochim Biophys Acta* 1996;1303:243–50.
- [47] Regier DS, Waite KA, Wallin R, McPhail LC. A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22^{phox}, an NADPH oxidase component. *J Biol Chem* 1999;274:36601–8.
- [48] Palicz A, Foubert TR, Jesaitis AJ, Marodi L, McPhail LC. Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components. *J Biol Chem* 2001;276:3090–7.
- [49] Sang Y, Cui D, Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001;126:1449–58.
- [50] Presing CL, Kuc JA. Inhibition by salicylhydroxamic acid, BW755C, nicotatetraenoic acid, and disulfiram of hypersensitive resistance elicited by arachidonic acid or poly-L-lysine in potato tuber. *Plant Physiol* 1987;84:891–4.

- [51] Cantoriz R, Pinelli C, Fabbri AA, Patel S. Mechanism of ascorbic acid involved in its diating activity in potato tuber. *Physiol Mol Plant Pathol* 1992;41:127–37.
- [52] Sang V, Cui D, Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2001;126:1499–58.
- [53] Pulice A, Poubert TR, Jaminis AJ, Marodi L, McPhail LC. Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with cytochrome components. *J Biol Chem* 2001;276:3090–7.
- [54] Van Breusegem F, Vranović E, Del JJ, Inzé D. The role of oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 2001;161:103–14.
- [55] Dorey S, Baulieu E, Samadpour P, Fritz B, Kauffmann S. Tobacco class I and II chitinases are differentially expressed during elicitor-induced hypersensitive cell death and localized acquired resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 1998;11:1102–9.
- [56] Do HM, Hong JK, Jung WT, Kim SJ, Han JJ, Hwang BK. Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *Peucedanea* in *Capsicum annuum*. *Mol Plant Microbe Interact* 2003;16:196–203.
- [57] Pignocchi C, Foyer CH. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. *New Opin Plant Biol* 2003;6:473–80.
- [58] Kerton Y, Chiu WL, Tsou G, Sheen J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2940–5.
- [59] Noll S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2004;7:388–95.

9. DISCUSIÓN

Las plantas se encuentran expuestas a factores abióticos tales como bajas y altas temperaturas, exposición a sales, sequía y metales pesados así como a factores bióticos como el ataque de patógenos e insectos y en algunas ocasiones simultáneamente son afectadas por ambos factores. Aún cuando no se encuentren deficiencias en la tierra y la práctica de la agricultura sea la adecuada, el impacto de estos factores puede reducir significativamente la productividad de los cultivos. Las plantas durante su metabolismo normal producen especies reactivas de oxígeno ($O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2). Una vez que existe un desbalance entre la producción de ERO y su destoxificación se presenta el estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno son moléculas pequeñas que no pueden ser fácilmente excluidas, pueden dañar proteínas (inactivación de enzimas), causar la oxidación de los ácidos nucleicos, de carbohidratos y la peroxidación de lípidos. Para tales daños causados a la célula por el estrés oxidativo, ésta cuenta con mecanismos de destoxificación enzimáticos y no enzimáticos, dentro de los cuales se involucra a la enzima superóxido dismutasa como la primera línea de defensa en la destoxificación de ERO por catalizar la reacción de dismutación de anión $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Gessler *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008).

En el caso del fruto de aguacate, al ser cosechado en estado inmaduro, está sujeto al daño mecánico, al almacenamiento ($4^{\circ}C$), y al ataque por patógenos postcosecha durante su transporte y hasta llegar a los anaqueles de venta, lo que puede conducir a la pérdida de la calidad del fruto y por consecuencia a pérdidas económicas.

9.1 Estrés oxidativo a bajas temperaturas ($4^{\circ}C$).

Durante el almacenamiento del fruto de aguacate a $4^{\circ}C$ se incrementó la acumulación de ERO a las 12 horas después de su almacenamiento, similar efecto tuvo la exposición a bajas temperaturas en *Arabidopsis thaliana* en donde se acumuló H_2O_2 y aumentaron las actividades de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidasa (O'kane *et al.*, 1996). Contrariamente, en arroz aumenta la

actividad de SOD cuando las plantas son transferidas de temperatura baja a temperatura ambiente (Suruyama y Tanida, 1995). En tanto en el fruto de aguacate disminuyó la actividad de la enzima SOD a los 24°C.

Las plantas experimentan un proceso de aclimatación que involucra la acumulación de ERO y los lípidos han sido foco de atención durante este tipo de estrés por ser el principal componente de membranas, además hay una relación interesante entre la tolerancia a bajas temperaturas y la biosíntesis o re-arreglo de biomembranas en respuesta a el cambio de temperatura (Upchurch, 2008).

Las bicapas de lípidos creadas artificialmente experimentan un cambio de alta fluidez-fase cristalina a una fase gel-sólida cuando la temperatura disminuye. Los ácidos grasos son componentes cruciales en las membranas celulares. La suberina, la cutina y la cera proveen una barrera contra el ambiente; sin embargo, también contribuyen a la resistencia inducida a través de la remodelación en la fluidez de la membrana (Iba, 2002). Por ejemplo, la liberación de ácido α -linoléico por medio de la actividad de una lipasa y como moduladores de la expresión de genes de defensa (Kachroo *et al.*, 2001).

La habilidad del ajuste de la fluidez de la membrana por cambios de los niveles de ácidos grasos insaturados es una característica de las plantas sometidas a la aclimatación. El ácido linolénico libre es por sí mismo una molécula señal y precursor de la biosíntesis de oxilipina (Bleé, 2002). Además los niveles de ácido oléico (18:1n9) provenientes del cloroplasto son críticos para la respuesta de defensa en plantas de *Arabidopsis*, además de incluir la muerte celular programada y la resistencia sistémica adquirida (Wilson *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2006).

En el mesocarpo de fruto de aguacate sometido a 4°C durante 12 horas no se mostró cambio en la concentración de ácido oléico (18:1n9); sin embargo con los datos analizados, el vaccénico o cis 11-octacaenoico (18:1n7) mostró aumento en su acumulación cuando el fruto fue sometido a 4°C. Sin embargo, el grado de daño durante el estrés por bajas temperaturas depende del tiempo de exposición,

lo que sugiere que a las 12 horas de almacenamiento a 4°C no influye en la composición de ácidos grasos (Solanke y Sharma, 2008).

Sin embargo, a bajas temperaturas las membranas vegetales experimentan una transición de líquido-cristalino a una fase parecida a un gel que reduce la fluidez de la membrana, provoca además una pérdida de iones y puede ocurrir la desactivación de proteínas de membrana. Se sugiere que a bajas temperaturas el fosfatidil glicerol saturado contenido en las membranas del cloroplasto es liberado y es relacionado con la adaptabilidad de las plantas a bajas temperaturas (Iba, 2002).

También, se ha relacionado el contenido de ácidos grasos con la adaptabilidad a bajas temperaturas. En plantas con contenidos menores al 20% toleran mejor el frío que plantas que contienen 40% o más de ácidos grasos saturados (Murata *et al.*, 1992; Wolter *et al.*, 1992). Así se sugiere que el mesocarpo del fruto de aguacate, al contener mayor cantidad de ácidos grasos insaturados tolere el estrés a bajas temperaturas, al no observarse un cambio en la composición de ácidos grasos en el mesocarpo del fruto.

9.2 Estrés oxidativo causado por herida y por *Colletotrichum gloeosporioides* en mesocarpo de fruto de aguacate

Una vez que el fruto de aguacate ha sido cosechado puede verse sujeto al daño por herida durante su transporte y manipulación y/o al ataque postcosecha por hongos como *C. gloeosporioides*, estos tipos de estrés ocasionan la producción de especies reactivas de oxígeno ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $OH^{\cdot-}$). En tanto que la acumulación de ERO en frutos de aguacate había sido analizada en frutos de aguacate (*Persea americana* Miller Cv. Fuerte), en donde el pericarpo fue aislado e inoculado con esporas de *C. gloeosporioides* y se observó la acumulación de anión superóxido a 1 hora después de la inoculación y una segunda acumulación a las 4 horas (Beno y Prusky, 2000), en éste trabajo se utilizaron frutos completos, los cuales fueron inoculados con la misma concentración de esporas de *C. gloeosporioides* en

dónde la acumulación de ERO fue analizada en el mesocarpo del fruto, mostrando una mayor acumulación del anión superóxido a la hora y otra a las 8 horas después de la inoculación. En cuanto a la acumulación de H_2O_2 en mesocarpo de fruto de aguacate se observó a las 2 horas después de la inoculación lo que coincide con lo reportado por Beno-Moualem y Prusky (2000) en el pericarpo de frutos de la cultivar fuerte. Una segunda acumulación de H_2O_2 fue observada lo que sugiere una interacción incompatible.

Varias fuentes enzimáticas han sido propuestas como la fuente en la producción de ERO durante las interacciones planta-patógeno, las cuales incluyen la enzima NADPH oxidasa de membrana plasmática, peroxidasas, xantina oxidasas y lipoxigenasas (Bolwell y Daudi, 2009). Varios reportes sugieren que la producción de ERO durante la interacción con *C. gloesporioides-Persea americana* inician en el espacio extracelular por la reducción con un electrón del oxígeno molecular por la enzima NADPH oxidasa de membrana plasmática así se produce el anión superóxido y éste es dismutado en el sitio de producción sugiriendo que sea una SOD de apoplasto la que se encargue de dismutarlo a la siguiente especie reactiva H_2O_2 . (fig. 1) (Beno y Prusky, 2000). Las SOD extracelulares habían sido caracterizadas solo en mamíferos (Alsher *et al.*, 2002); sin embargo se han localizado inmunológicamente SOD extracelulares en algodón (CuZn-SOD) y se ha sugerido que estas participen durante la formación de lignina en la pared celular, en procesos de crecimiento y desarrollo en la pared celular (Kim *et al.*, 2008). Además, se ha encontrado que las CuZn-SOD extracelulares tienen participación durante la respuesta al estrés biótico y abiótico (Kasai *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2008).

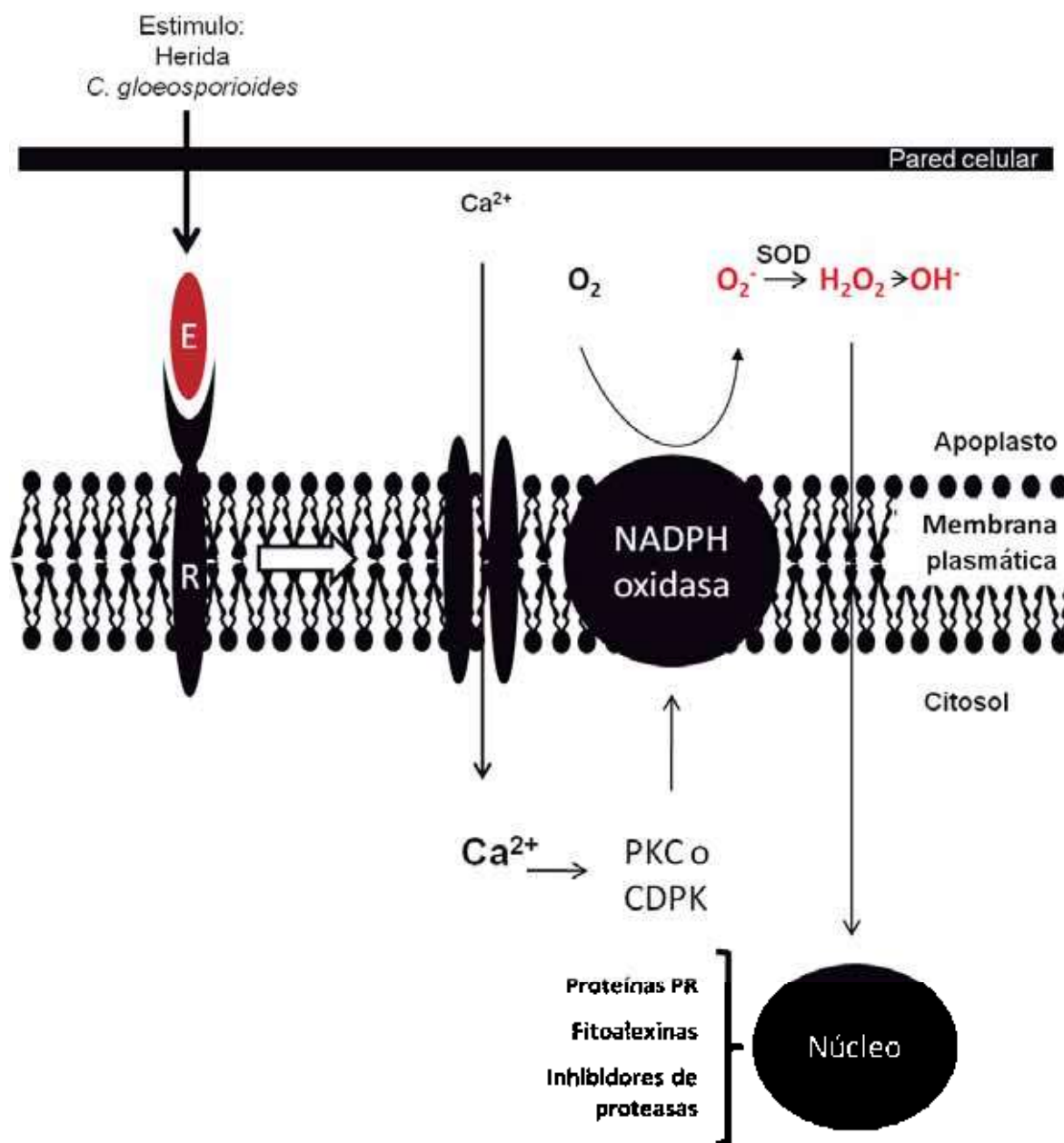


Figura.1 Producción de Especies reactivas de oxígeno después durante el estímulo por herida o por *C. gloeosporioides* en *Persea americana* Mill. Cv. Hass. Por lo que se sugiere que los niveles encontrados de H_2O_2 son regulados por la producción de O_2^- que involucra la participación de la enzima NADPH oxidasa de membrana plasmática y a la enzima SOD de apoplasto que dismuta al anión a H_2O_2 . E: estímulo, R: receptor.

Una vez que se presenta el estrés oxidativo en el mesocarpio, las ERO pueden reaccionar con carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. El mesocarpio del fruto de aguacate al tener altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles a la oxidación. El análisis en el perfil de ácidos grasos en el mesocarpio mostró una disminución de la concentración de los mismos a las 3 y 12 horas después de la interacción con *C. gloeosporioides*, además de que el ácido linoléico (18:2n9,12) no fue determinado durante la interacción; sin embargo los ácidos grasos esteárico (18:0) y gadoléico (20:1n9) fueron detectados durante la interacción.

El ácido oleico (18:1n9) libre ha sido relacionado con la regulación de la respuesta de defensa en plantas a patógenos, incluyendo la muerte celular programada y la resistencia sistémica adquirida (SAR). En plantas mutantes de *A. thaliana* que acumulaban altos niveles de 18:1n9 se disminuían las respuestas de defensa (Kachroo *et al.*, 2004).

Una de las respuestas al estrés por herida en plantas es la acumulación de ERO. La producción de las ERO en fruto de aguacate después del tratamiento con herida se presenta conforme a lo reportado por Castro (2009). La producción de $O_2^{\bullet-}$ se presenta a partir de los 10 minutos después del daño, observándose la máxima acumulación a los 25 minutos. En tanto la acumulación de H_2O_2 se observa a los 10 y 30 minutos después del tratamiento y al utilizar el inhibidor DPI, la acumulación de H_2O_2 disminuye, lo que sugiere que la fuente de producción de ERO sea a través de la enzima NADPH oxidasa de membrana plasmática (Fig.2). Hay diferentes fuentes en la producción de ERO incluyendo fuentes intracelulares como la mitocondria y peroxisomas; extracelulares como peroxidasas de pared celular, oxalato oxidasas de apoplasto, NADPH oxidasas de membrana plasmática y amino oxidasas. La enzima NADPH oxidasa transfiere electrones del citoplasma de NADPH al O_2 extracelular para formar el $O_2^{\bullet-}$, seguida por la dismutación de éste para formar el H_2O_2 ; la participación de NADPH oxidasa de membrana plasmática ha sido implicada como la fuente de producción de ERO en varios tipos de estrés; sin embargo, hay evidencia que está implicada durante el daño por

herida (Orozco-Cardenas *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2005; Sagi *et al.*, 2004) o por peroxidasas de pared celular como fuente de ERO.

Por otro lado la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ puede darse espontáneamente pero se requiere a la enzima superóxido dismutasa para que el proceso sea más rápido; las primeras SOD extracelulares descritas habían sido en mamífero; sin embargo en plantas se describieron las SOD extracelulares que participaban en la lignificación de la pared celular en algodón (Kim *et al.*, 2008). En el mesocarpo del fruto de aguacate se analizó la posible participación de alguna SOD extracelular durante el estrés por herida, sugiriendo la actividad de SOD's durante el daño por herida (Fig.1) y al utilizar los inhibidores de CuZn-SOD (KCN y H_2O_2) se muestra una disminución de la actividad total sugiriendo que la actividad de SOD proviene de CuZn-SOD.

Durante el estrés oxidativo causado por *C. gloeosporioides* y por el daño por herida la fuente en la producción de ERO se sugiere que sea la enzima NADPH oxidasa de membrana plasmática así que como el metabolismo de detoxificación se continúe con la actividad de la enzima superóxido dismutasa extracelular.

El perfil de ácidos grasos durante el estrés por herida se analizó a los 15 minutos después del tratamiento con herida, por ser el tiempo en el que se presentó mayor acumulación de H_2O_2 y mostró una disminución en los niveles de ácidos grasos con respecto al control cero horas; sin embargo, hay un aumento en los niveles de ácido oléico (18:1n9) y detección del ácido esteárico (18:0) y el ácido gadoleico (20:1) con respecto al control. El aumento de los niveles de el ácido oleico (18:1n9) está implicado en la señalización de la respuesta de defensa en plantas (Upchurch, 2008) pero la instauración del ácido graso de 18 carbonos se encuentra en posición diferente.

Dependiendo del tipo de estrés, la fuente de producción de ERO puede ser diferente, sin embargo durante el estrés por herida y la interacción con *C. gloeosporioides*-*P. americana* Mill. Cv. Hass se sugiere que puedan implicar a una NADPH oxidasa de membrana plasmática como fuente en la producción de ERO. La cinética de acumulación de ERO es diferente entre los dos tipos de estímulos

implicados, sugiriendo que sea diferente por el origen del estímulo para desencadenar una respuesta diferente. En tanto el cambio en el perfil de ácidos grasos, disminuyendo estos en ambos estímulos y se detecten tanto el ácido esteárico y el ácido gadoleíco; sin embargo en el estrés por herida aumenta la acumulación de ácido *cis* 11-ocatacaenoico (18:1n7) que pudiera estar implicado en la señalización por este tipo de estrés.

10. Conclusión

Los diferentes tipos de estrés aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno, pero no todos tienen una influencia sobre la composición de lípidos en el mesocarpo de fruto de aguacate

11. Bibliografía.

Ahmad, P., Sarwat, M. y Sharma, S. 2008. Reactive oxygen species antioxidants and signaling in plants. *J. of Plant Biol.* 51: 167-173.

Alscher R.G., Erturk N. y Heath L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1331- 1341.

Apel K. y Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 3373- 399.

Asada K, 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue., ends causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. Foyer CH, y Mullineaux PM eds. Boca Raton: CRC Press, 77-104.

Ausubel F. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunol.* 10: 973-979.

Baker, C. J., Mock, N. M., Glazener, J. A., y Orlandi, E. W., 1993a. Recognition responses in pathogen/non- host and race/cultivar interactions involving soybean (*Glycine max*) and *Pseudomonas syringae* pathovars, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43:81–94.

Baker, C. y Orlandi E. 1999. Sources and effects of reactive oxygen species in plants. In: *Molecular Plant Pathology Reactive Oxygen Species in Biological Systems*, edited by Gilbert and Colton. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. Pp. 481-50.

Beno-Moualem, D y Prusky, D. 2000 Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology* 90:553-559.

Ble' e E 2002 Impact of phyto-oxylipins in plant defense. Trends Plant Sci 7:315–321.

Boller, T. y He, S. Y. 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. Science 324:742-744

Bolwell P y Daudi A. 2009 Reactive oxygen species in plant–pathogen Interactions. Reactive oxygen species in plant signaling. In: *Signaling and communication in plants*. L.A. del Río and A. Puppo (eds.), Pp. 113-133.

Chai y Doke, 1987. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. Ann Rev Plant Biol 53:225–245.

De Wit P. 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. Visions & Reflections (Minireview). Cell. Mol. Life Sci. 64: 2726 – 2732

Dickinson M. 2003. Signalling in plant disease resistance mechanisms. In: *Molecular Plant Pathology*. BIOS Scientific Publishers, London, UK (eds). Pp. 224

Ent, S. y Koornneef, A. 2008. Induced resistance – orchestrating defence mechanisms through crosstalk and priming. Annu. Plant Rev. 34:334-370.

Gechev TS, Hille J. 2005 Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. J. Cell Biol. 168, 17–20.

Gessler, N., Aver'yanov, A. Y Belozerskaya, T. 2007. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. Biochemistry (Moscow). 72: 1091-1109.

Glyan'ko, A. Vasil'eva, G. Ischenko, A. Mironova, N. y Alekseenko, A. 2010. The NADPH oxidase activity of pea seedling roots in rhizobial infection depending on abiotic and biotic factors. Appl. Biochem. Microbiol. 46:438-443.

Guest J. y Brown. 1997. Plant defense as against pathogen. In: *Plant pathogens and plant diseases*. Printed by the University New England Printer. Pp. 286

Haga, M., Kohno, Y., Iwata, M., and Sekizawa, Y., 1995. Superoxide anion generation in rice blade protoplasts with the blast fungus proteoglucomannan elicitor as determined by CLA-phenyl luminescence and its suppression by treating the elicitor with x-D-mannosidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:969–973.

Hammond-Kosack, K E y Jones, J D. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell.* 8: 1773-1791.

Imlay J. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77:755–76.

Kachroo A, Venugopal SC, Lapchyk L, Falcone D, Hildebrand D, y Kachroo P. 2004 Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5152– 5157

Kachroo P, Shanklin J, Shah J, Whittle J, y Klessig DF .2001. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9448–9453.

Kasai T, Suzuki T, Ono K, Owaga K, Inagati Y, Ichinose y, Touyoda K , y Shirashi T. 2006. Pea extracellular Cu/Zn-superoxide dismutase responsive to signal molecules from a fungal pathogen. *J Gen Plan. Pathol.* 72:265-272

Kültz D. 2005 Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67:225-257.

Laloi C, Stachowiak M, Pers-Kamczyc E, Warzych E, Murgia I, y Apel K. 2007 Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of

stress responses in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 672–677.

Lamb C, Dixon RA .1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 251–275

Liu Y., Huang W, Zhan J. y Pan Q. 2005. Systemic induction of H₂O₂ in pea seedlings pretreated by wounding and exogenous jasmonic acid. Science in China Series C. 48: 202-212.

Liu, Y. Pan, Q. -H. Yang, H. -R. Liu, Y. -Y. y Huang, W. D. 2008. Relationship between H₂O₂ and jasmonic acid in pea leaf wounding response. Russ. Plant Physiol. 55: 765-775.

Miller G., S. Vladimir, y R Mittler. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. Physiol. Plant. 133:481-489.

Mishina, T. y Zeier, J. 2007. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. Plant J. 50: 500–513

Murata N, Ishizaki-Nishizawa O, Higashi S, Hayashi H, y Tasaka Y. 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. Nature 356:710–713.

Nürnberg T. y Lipka V. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon review. Mol. Plant Pathol. 6: 335–345.

O’Kane D, Gill V, Boyd P, y Burdon R. 1996. Chilling, oxidative stress and anti-oxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. Planta 198:371–77.

Odjakova M. y Hadjiivanova C. 2001. The complexity of pathogen defense in plants. Bulg. J. Plant. Physiol. 27:101–109

Orozco-Cardenas, M. y Ryan, C., 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6553–6557.

Park J.M. y Paek KH. 2007. Recognition and response in plant-pathogen Interactions. *Plant Biol*, 50: 132-138

Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, y Schroeder JI. 2000 Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406:731–734.

Platt-Aloia, K.A. y Thomson, W.W. 1987. Freeze-fracture evidence for lateral phase separation in the plasmalemma of chilling-injured avocado fruit, *Protoplasma* 136:71–80.

Ry-S,. 2005. Non-host resistance in plants : new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.* 6: 335–345.

Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J.W., y Fluhr, R., 2004 Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*, *Plant Cell*, 16: 616–628.

Saruyama H y Tanida M. 1995. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.* 109:105–113.

Scandalios JG. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 38: 995-1014.

Shah, J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 459-464.

- Solanke, A.U, y Sharma, A. K. 2008. Signal transduction during cold stress in plants. *Physiol Mol Biol Plants* 14:69-79.
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JI (2006) Reactive oxygen species signalling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373–378.
- Upchurch, R. G. 2008 Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.* 30: 967-77.
- Vlot AC, Dempsey D'M A y Klessing. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177-206.
- Wilson RA, Calvo AM, Chang P-K, y Keller NP. 2004 Characterization of the *Aspergillus parasiticus* D12-desaturase gene: a role for lipid metabolism in the *Aspergillus*-seed interaction. *Microbiology* 150:2881–2888.
- Wolter FP, Schmidt R, y Heinz E. 1992 Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids. *EMBO J* 11:4685–4692.
- Xue HQ, Upchurch RG, y Kwanyuen P. 2006 Ergosterol as a quantifiable biomass marker for *Diaporthe phaseolorum* and *Cercospora kikuchii*. *Plant Dis* 90:1395–1398.
- Zhang, H, Xia, Y, Wang, y G, Shen, Z. 2008. Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper-zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta* 227: 465-475.
- Zhou, Y., Huang, L., Zhang, Y., Shi, K., Yu, J. y Nogués, S. 2007. Chill-induced decrease in capacity of RuBP carboxylation and associated H₂O₂ accumulation in cucumber leaves are alleviated by grafting onto figleaf gourd. *Annals of Botany* 100: 839–848.