



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO BIOLÓGICAS**

**PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO EN RESPUESTA
AL DAÑO POR HERIDA EN FRUTOS DE AGUACATE (*Persea americana*
Mill cv Hass)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA
ELDA CASTRO MERCADO**

**ASESOR DE TESIS
D.C. ERNESTO GARCIA PINEDA**

MORELIA, MICH.

AGOSTO DE 2006

Contenido

PARTE 1	Antecedentes	1
1.1	Respuestas de defensa en plantas	2
1.2	Especies reactivas de oxígeno (ERO)	4
1.3	Química de las ERO	5
1.4	Señalización por especies reactivas de oxígeno	8
1.5	Reguladores de la señalización por ERO	10
1.5.1	<i>Cambio en los niveles de calcio</i>	10
1.5.2	<i>Fosforilación de proteínas</i>	12
1.5.3	<i>Regulación de la expresión genética</i>	12
1.5.4	<i>Regulación de la producción de ERO</i>	14
1.5.5	<i>Remoción de ERO</i>	15
1.5.5	<i>ERO y herida</i>	16
1.6	Ascorbato, Metabolismo y Funciones	16
1.6.1	<i>Distribución y localización subcelular</i>	16
1.6.2	<i>Reciclamiento del ascorbato</i>	18
1.6.3	<i>Las funciones del ascorbato</i>	19
1.7	Respuestas a herida y herbívoros en plantas	19
1.7.1	<i>Respuestas de defensa</i>	20
1.7.2	<i>Señalización por herida</i>	22
1.7.2.1	<i>Flujo de iones</i>	22
1.7.2.2	<i>Señalización por calcio</i>	23
1.7.2.3	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>	23
1.7.2.4	<i>Fosforilación de proteínas</i>	24

1.7.3	<i>Estimuladores de la expresión de las respuestas de defensa</i>	25
1.7.3.1	<i>Ácido jasmónico (AJ)</i>	25
1.7.3.2	<i>Etileno</i>	26
1.7.3.3	<i>Sistemina –Un péptido implicado en la señalización por herida</i>	26
1.8	Características del fruto de aguacate	27
1.8.1	<i>Anatomía del fruto</i>	28
1.8.2	<i>Manejo del aguacate</i>	29
PARTE 2	Justificación	30
PARTE 3	Hipótesis	32
PARTE 4	Objetivos	34
	Objetivo General	35
4.1	Objetivos Específicos	35
PARTE 5	Metodología	36
5.1	Establecimiento del modelo de estudio	37
a)	Tinción para observar la estructura	37

b)	Determinación de firmeza	37
c)	Medición de la actividad de la enzima celulasa en fruto de aguacate verde y maduro	38
d)	Medición de la actividad de la enzima poligalacturonasa en fruto de aguacate verde y maduro	39
5.2	Alcalinización del medio	40
5.3	Medición de las especies reactivas de oxígeno	40
a)	Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	40
b)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	41
c)	Análisis del radical hidroxilo (OH^{\cdot})	42
5.4	Medición de la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation	43
a)	Medición de la enzima deshidroascorbato-reductasa	43
b)	Medición de la enzima glutatión –reductasa	45
5.5	Medición de la actividad de la enzima ascorbato oxidasa	46
PARTE 6 Resultados		48
<hr/>		
6.1	Establecimiento del modelo de estudio	49
6.2	Cambio en el pH en respuesta al daño por herida	52
6.3	Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno	53
6.3.1	<i>Producción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)</i>	53
6.3.2	<i>Producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)</i>	55

6.3.3	<i>Producción de radical hidroxilo (OH[•])</i>	56
6.4	Análisis de enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido ascórbico	57
6.4.1	<i>Actividad de la enzima glutatión reductasa</i>	57
6.4.2	<i>Actividad de la enzima deshidroascorbato reductasa</i>	58
6.5	Análisis de la enzima ascorbato oxidasa	59
PARTE 7	Discusión	61
7.1	Modelo de estudio	62
7.2	Cambio en el pH	63
7.3	Producción de especies reactivas de oxígeno	65
7.4	Análisis de las enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido ascórbico	67
7.4.1	<i>Deshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa</i>	67
7.4.2	<i>Ascorbato oxidasa</i>	71
7.5	Modelo propuesto para la integración de resultados	73
PARTE 8	Literatura citada	76

PARTE

1

Antecedentes

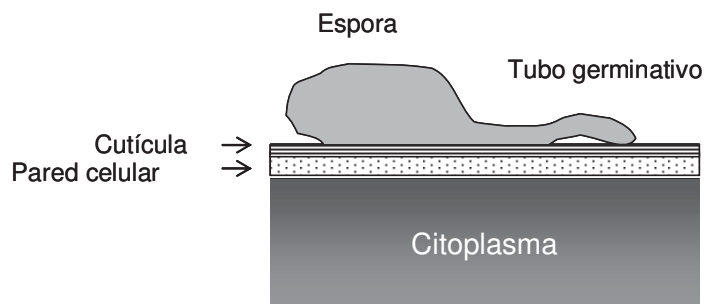
1.1 Respuestas de defensa en plantas.

Las plantas responden activamente a diferentes tipos de estrés provocados por el medio ambiente a través de cambios específicos en su metabolismo y en su patrón de expresión genética.

Estas respuestas se pueden dividir en dos tipos (Figura 1):

- a) Pasivas. Son aquellas relacionadas con la estructura de la planta, un ejemplo es la pared celular compuesta por polímeros complejos derivados de los carbohidratos y cuyo principal componente es la celulosa; otro caso es la cutícula, la cual se deposita sobre la pared celular y está formada principalmente por moléculas derivadas de ácidos grasos. Estas dos estructuras proporcionan barreras mecánicas contra la penetración de patógenos, contribuyendo así a la defensa de la planta.
- b) Inducibles. Las plantas cuentan con estrategias que dependen de la producción de compuestos químicos tóxicos (para los microorganismos), cuya síntesis se estimula cuando la planta reconoce la presencia de un posible patógeno. Estos mecanismos incluyen la acumulación de compuestos de bajo peso molecular (conocidos como fitoalexinas) y la deposición, en la pared celular, de glicoproteínas ricas en el aminoácido prolina; las cuales se entrecruzan químicamente con los componentes de la pared celular incrementando su fuerza y la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno molecular.

A) Pasivos o constitutivos



B) Inducibles

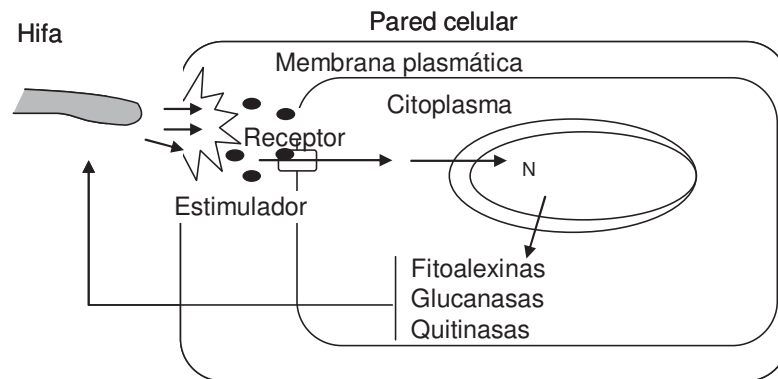


Figura 1. Mecanismos de defensa en plantas.

1.2 Especies reactivas de oxígeno.

El término especies reactivas de oxígeno (ERO) se usan para describir a las formas del oxígeno que son energéticamente más reactivas que el oxígeno molecular. Típicamente las ERO (algunas veces llamadas especies activas de oxígeno o intermediarios reactivos del oxígeno) son especies moleculares que sufren la adición de electrones y por lo tanto son formas reducidas del oxígeno. Las ERO incluyen a dos especies de radicales libres, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y su forma protonada el radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}), la especie no cargada peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que no se considera un radical y el altamente reactivo radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Las ERO también incluyen a los singuletes de oxígeno (1O_2) generados por la fotoexcitación de la clorofila. Todas estas moléculas son tóxicas y su poder destructivo depende de su reactividad. Las altas concentraciones de ellas pueden resultar en una oxidación no controlada de gran variedad de estructuras celulares, incluyen al ADN, proteínas y lípidos de membrana, lo que puede resultar en la perturbación del metabolismo y la destrucción de las estructuras celulares (Desikan et al., 2005).

Las ERO se generan en plantas por muchos mecanismos en varios compartimentos celulares (Mittler, 2002). Estos incluyen mecanismos no enzimáticos tales como la transferencia de electrones al oxígeno molecular durante la fotosíntesis y la respiración en los peroxisomas, la amino oxidasa y oxalato oxidasa en el apoplasto y xantina

oxidasa y enzimas de oxidación de los ácidos grasos en el peroxisoma. Algunos agobios abióticos tales como las bajas y las altas temperaturas, el exceso de irradiación, la sequía y la salinidad modifican el balance celular e incrementan la generación de ERO. La célula vegetal también contiene enzimas cuya función específica parece ser la generación de ERO, estas incluyen a la NADPH oxidasa y a las peroxidasas de la pared celular (Bolwell et al., 2002; Nelly et al., 2002). La generación de superóxido y de peróxido de hidrógeno por estas enzimas se incrementa por varios agobios tales como la herida, las temperaturas extremas, la anoxia, los contaminantes ambientales, la radiación UV y la luz intensa.

1.3 Química de las ERO.

Las ERO se producen por una reducción secuencial del oxígeno molecular (Figura 2). La reducción con solo electrón del O_2 resulta en la generación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este es usualmente, pero no siempre, el primer ERO que se forma. Es relativamente reactivo y como el electrón que recibe esta es un estado no apareado, esta molécula se clasifica como un radical libre. La dismutación del anión superóxido es inevitable, especialmente a bajo pH, cuando un electrón de anión superóxido es traspasado a otra molécula de anión superóxido, y junto con una protonación se genera peróxido de hidrógeno. El peróxido es un agente oxidante débil y puede reaccionar con moléculas biológicas tales como proteínas. La reacción de dismutación es también catalizada muy eficientemente por la enzima superóxido dismutasa. Existen algunos

tipos de superóxido dismutasa en plantas localizadas en diferentes compartimentos celulares.

Ambas moléculas son potenciales moléculas señal en plantas, si bien se ha realizado más trabajo en este sentido con el peróxido de hidrógeno. El H_2O_2 es relativamente pequeño, no tiene carga y puede atravesar las membranas y es rápidamente destruido. Estas son características favorables para una molécula señal. Por otro lado, el anión superóxido tiene una vida media relativamente corta y tiene carga. Su acción por lo tanto puede ser restringida a la proximidad de su sitio de generación. Sin embargo esta molécula puede ser protonada para formar el radical perhidroxilo, y esta tiene el potencial para pernear a través de la membrana, y tener una función como molécula señal (Jabs, 1999).

En presencia de metales de transición tales como el hierro y el cobre las ERO sufren reacciones adicionales, tales como la reacción de Fenton y la Haber-Weis para producir radicales hidroxilo. Estos son extremadamente reactivos y reaccionan a una velocidad limitada por su difusión. La presencia y concentración de los metales de transición en diferentes partes de la célula podría determinar la formación de estos radicales, generando manchas localizadas de acción de estas moléculas. Así, los efectos del daño de estos radicales podrían estar localizados en regiones bien definidas de la célula. Por lo tanto este radical reaccionará con la primera molécula que encuentre, ya sea proteína, lípido o ácido nucleico.

El anión superóxido puede reaccionar con otro radical libre de señalización, el óxido nítrico ($NO\cdot$), para producir peroxinitrito ($OONO\cdot$). El $OONO\cdot$ es altamente

reactivo y si bien puede ser una molécula tóxica es sistemas animales no se han reportado evidencias que indiquen lo mismo en plantas.

El singlete de oxígeno es otra forma de oxígeno reactivo pero en esta molécula no hay una adición de un electrón extra al oxígeno molecular, sino que un electrón es elevado a un orbital de energía superior. Este movimiento electrónico provoca que el singlete de oxígeno reaccione rápidamente con moléculas orgánicas, provocándoles daños. En plantas el singlete puede ser formado por la fotooxidación de la clorofila y su reacción con el oxígeno, lo que puede provocar daño a los lípidos. Normalmente los carotenoides previenen la formación del singlete. Datos recientes indican que el singlete también puede actuar como una molécula de señalización, regulando la expresión de varios genes (Op den Camp et al., 2003).

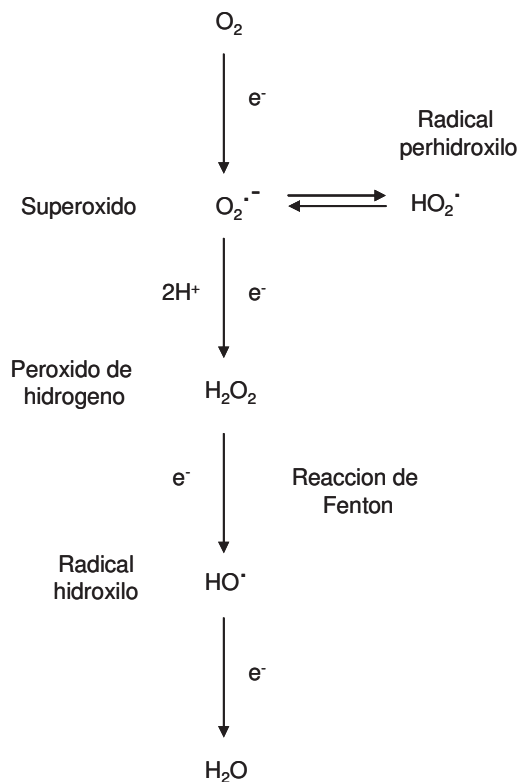


Figura 2. Reacciones secuenciales para la producción de ERO, a partir del oxígeno molecular.

1.4 Señalización por ERO.

Para que las ERO funcionen como moléculas de señalización, éstas deben de ser percibidas de alguna manera para que la señal sea propagada y regular las respuestas celulares. Idealmente se debe de efectuar un cambio en la molécula receptora, y el próximo componente de la señalización debe también de ser afectado a través de la inhibición, activación o el reclutamiento con otras moléculas. El peróxido de hidrógeno es una molécula pequeña y parece improbable que exista un receptor que lo reconozca como una reacción clásica ligando / receptor. Sin embargo, el H_2O_2 es un agente oxidante débil, y podría ser que a través de esta actividad transmita su “información” (Danon, 2002). Las proteínas involucradas podrían estar en dos estados, un estado de señalización y un estado quiescente, y se ha sugerido el término nanotransductores para el potencial grupo de proteínas de señalización sensibles a ERO (Cooper etc al., 2002). Es también posible que la microlocalización de las ERO dentro de una célula determine la eficiencia con la cual actúan como señal.

Dependiendo de su localización celular podrían interactuar con diferentes proteínas, posiblemente formando complejos macromoleculares. Tales “señalosomas” podrían estar localizados en regiones definidas dentro de la célula donde puedan regular un efecto.

Se han identificado proteínas sensores en levaduras las cuales probablemente capten la presencia de las ERO y transformen (transduscan) esta señal en una respuesta celular. Se ha propuesto que el sistema histidina cinasa de dos componentes puede actuar como un receptor para H_2O_2 , de tal manera que la percepción de ERO podría conducir a un evento de fosforilación que terminaría en una respuesta al estrés oxidativo

(Buck etc., 2001). Se han reportado algunas histidina cinasa en plantas (Hwang, et al., 2002), pero no se ha establecido su relación con el estrés oxidativo.

Otros sensores potenciales de ERO se podrían encontrar dentro de la célula, y estos podrían incluir a tiol peroxidasas, proteín cinasas o fosfatasas. En levaduras se ha identificado una tiol peroxidasa citosólica la cual es un blanco directo para la oxidación por el H_2O_2 (Delaunay et al., 2002). Algunos factores de transcripción pueden actuar también como blancos para la señalización redox. Por lo tanto, existen potenciales blancos para las EROS en diferentes partes de la célula y es posible que múltiples proteínas sensen y transmitan las señales para activar una respuesta celular específica.

Se ha sugerido que las ERO reaccionan con proteínas que contienen un grupo tiol, o $-SH$ de un residuo de cisteína o de metionina. En muchas proteínas el grupo $-SH$ puede ser modificado oxidativamente a $-S-S-$, lo cual ayuda en la estabilidad conformacional de la proteína. La oxidación de un grupo $-SH$ a través del H_2O_2 puede establecer la formación de puentes entre las cisternas en las proteínas, con un cambio resultante en la conformación de la molécula. Tal cambio puede modular la actividad de la proteína o permitir que interactúe con otras proteínas que anteriormente no lo hacía (Desikan et al., 2005).

Por otra parte, la oxidación de las proteínas debe de ser revertida para terminar la señal. Las proteínas tioredoxinas podrían cumplir esta función. Estas proteínas son disulfuro oxidoreductasa ubicuas en plantas que contienen dos grupos de cisterna activos dentro de un dominio estructural conservado (Buchanan et al., 2002). Las tioredoxinas catalizan reacciones de reducción que incluyen la conservación de puentes $-S-S-$ a grupos $-SH$.

1.5 Reguladores de la señalización por ERO.

1.5.1 *Cambio en los niveles de calcio.*

El calcio es un segundo mensajero ubicuo en las plantas. Las concentraciones incrementadas de calcio citosólico activan varias proteínas de señalización tales como cinasas y fosfatasas y subsecuentes respuestas al interior de la célula (Scrase–Field y Knight, 2003) (Figura 3). Las ERO parecen estar estrechamente relacionados con los niveles de calcio. En células guarda, el H₂O₂ activa canales catiónicos permeables al calcio en la membrana plasmática, conduciendo a un influjo de calcio y al cierre de los estomas (Pei et al., 2000). La regularización por ERO de los niveles de calcio no solo se observa en las células guarda. En raíces, la aplicación de radicales hidroxilo causa un incremento en las concentraciones de calcio citosólico, lo cual regula el crecimiento y la elongación (Foreman et al., 2003). Durante el desafío por un patógeno, las ERO causan un incremento en los niveles de calcio citosólico, pero el calcio también incrementa los niveles de ERO (Bowler y Fluhr, 2000). Por lo tanto, el calcio y las ERO interactúan muy estrechamente para regular la homeostasis intracelular de ambos componentes.

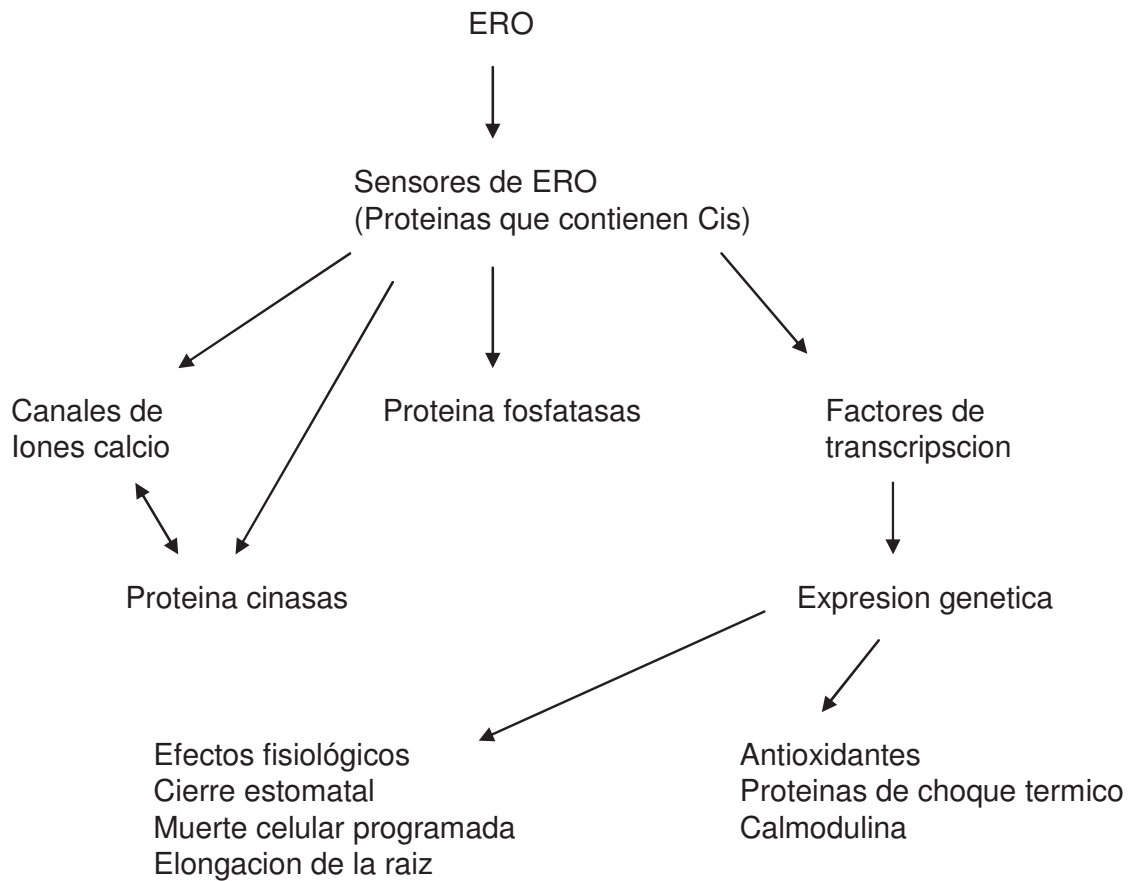


Figura 3. Señalización por ERO. La señalización intracelular iniciada por ERO involucra muchos componentes de la transducción de la señal, incluyendo canales iónicos, proteína cinasa, proteína fosfatasa y factores de transcripción. Tal señalización puede conducir a efectos fisiológicos directos o a la expresión genética. Tomado de Desikan et al., 2005.

1.5.3 Fosforilación de proteínas.

La fosforilación de proteínas es un evento de señalización celular clave, y las ERO tales como el H_2O_2 activan varias proteínas cinasas, incluyendo aquellas que pertenecen a la familia de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés, mitogen activated protein kinase). Las MAPK son una familia altamente conservadora de cinasas en eucariontes que forman parte de una cascada de señalización por fosforilación. Después de recibir un estímulo una MAPKKK fosforila una MAPKK, la cual subsecuentemente fosforila una MAPK sobre residuos conservados de treonina y tirosina. La activación de una MAPK puede conducir a la fosforilación de factores de transcripción, los cuales finalmente regularán la expresión genética. En *Arabidopsis*, el H_2O_2 conduce a la activación de las MAPK, AtMOK3 y AtMAPK6, este proceso es esencial para medir la tolerancia a varios estímulos (Kovtun et al., 2000).

La fosforilación de proteínas usualmente se acompaña de una desfosforilación catalizada por fosfatasas. Se ha reportado la regulación de la actividad de fosfatasas por H_2O_2 inhibe la actividad de fosfatasa, incrementando por lo tanto los niveles de fosforilación en una célula (Desikan et al., 2005).

1.5.3 Regulación de la expresión genética.

La expresión genética se podría activar ya sea directamente como resultado de la señalización por las ERO a través de la modificación de factores de transcripción, indirectamente a través de la cascada de transducción de la señal involucrando a las MAPK. Si bien la mayoría de los estudios implican al H_2O_2 como el principal ERO que altera la expresión genética, se ha demostrado que diferentes ERO tienen efectos similares.

Los cambios globales en la expresión genética en respuesta al tratamiento con H_2O_2 exógeno han permitido identificar varios genes cuya función se puede asignar a la transducción de la señal, la defensa, la transcripción, el metabolismo y la estructura celular (Vandenabeele et al., 2003). Genes para la transducción de la señal incluyeron aquellos que codifican las cinasas, calmodulina, histidina cinasa y una tirosina fosfatasa. También se indujeron genes que codifican para factores de transcripción. Genes relacionados con el ácido salicílico, óxido nítrico, ácido jasmónico y etileno también fueron regulados por H_2O_2 , indicando un potencial cruce de rutas metabólicas (Vranova et al., 2002). Un análisis adicional de un subconjunto de genes regulados por H_2O_2 mostró una regulación adicional por sequía, radiación UV-B y tratamiento con estimulador (Desikan et al., 2001).

Los cambios en la expresión genética pueden ser regulados por las ERO ya sea directa o indirectamente. Esto podría suceder vía la modificación directa de factores de transcripción, como se describió anteriormente, o vía la activación de otras proteínas de señalización que subsecuentemente activarían a los factores de transcripción. Actualmente no se han identificado factores de transcripción sensibles a ERO en plantas,

si bien algunos genes regulados por H_2O_2 poseen elementos en cis que podrían ser sensibles a este ERO (Desikan et al., 2001).

1.5.4 Regulación de la producción de ERO.

El sitio exacto de producción de ERO determina su acción. La ERO se producen dentro de la célula en bajos niveles vía rutas no enzimáticas, durante la fotosíntesis y la respiración en los cloroplastos y la mitocondria, respectivamente. ERO tales como el H_2O_2 se pueden producir a través de enzimas específicas (Desikan et al., 2004b), como la NADPH oxidasa o peroxidasas, que tienen la capacidad de reducir el oxígeno para producir ERO en el apoplasto. Otras enzimas que generan ERO incluyen a la xantina oxidasa, oxalato oxidasa y amino oxidasa.

La investigación sobre la regulación de la producción de ERO se ha enfocado al estudio de las enzimas semejantes a la NADPH oxidasa, una de las principales rutas enzimáticas de síntesis de ERO en células vegetales (llamadas rboh, respiratory burst oxidase homologue). Uno de los homólogos clonados en plantas se ha reportado como una enzima unida a la membrana (Séller et al., 1998), y mostró una estrecha similitud con la subunidad grande del complejo NADPH oxidasa de mamíferos, gp91^{-phox}, si bien una proteína vegetal contiene una región adicional que une calcio. Se han identificado algunas isoformas en tomate, tabaco, chícharo y *Arabidopsis* (Torres et al., 1998).

Al igual que su contraparte en mamíferos, la oxidasa vegetal contiene secuencias consenso que potencialmente unen grupos prostéticos redox, como flavinas y hemos, lo

cual podría resultar en la formación de superóxido de la reducción del oxígeno molecular. Si bien se han identificado algunos homólogos en plantas, solo hay un estudio a la fecha que demuestra su capacidad para generar superóxido *in vitro* (Sagi y Fluhr, 2001). Como se considera que las proteínas Rboh están asociadas a la membrana plasmática, la generación de superóxido por Rboh sugiere que sus productos y resultados de acción estarán fuera de la célula. (Desikan et al., 2005).

Las peroxidasas son otra fuente enzimática para producir ERO. Estas enzimas se localizan en la pared celular, se ha observado que producen ERO durante el desafío con un patógeno (Bolwell et al., 2002). Por lo tanto, es posible que el mismo estímulo induzca la producción de ERO vía múltiples rutas enzimáticas, pero a diferentes niveles y que la pérdida de la una será compensada por la otra.

La regulación de la síntesis de ERO a través de la NADPH oxidasa ocurre vía la actividad de otras moléculas de señalización, tales como proteínas G, inositol fosfato y proteínas cinasa / fosfatasa.

1.5.5 Remoción de ERO.

La respuesta de un tejido para producir ERO podría resultar no solo de la presencia y la función de distintas proteínas que producen ERO, sino también de la presencia o ausencia de antioxidantes en la célula. En células de aleurona de cebada, el tratamiento con giberelina provoca un decremento en las actividades de la catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa, lo que resulta en niveles incrementados de H₂O₂ y en la muerte celular (Fath et al., 2001). Diferentes antioxidantes tienen diferentes

afinidades por ERO lo cual podría determinar la eficiencia para su remoción, por ejemplo, la catalasa tiene alta afinidad por el H_2O_2 mientras que la ascorbato oxidasa tiene baja afinidad (Mittler, 2002). La localización y la acción de estas enzimas podrían afectar su regulación. La manipulación de los niveles de antioxidantes dentro de la célula ya sea por medio de la sobreexpresión o abatimiento de los mismos ha manifestado relaciones no identificadas previamente entre ERO y respuestas fisiológicas.

1.5.6 ERO y herida.

La herida induce la generación de ERO a través de la liberación de ácido jasmónico (AJ), y estos actúan como señales para la expresión de varios genes relacionados con la defensa (Orozco-Cárdenas et al., 2001). En células guarda, el derivado del AJ, metil jasmonato (MeJa) provoca la alcalinización del citoplasma y la acumulación de ERO dependiente de NADPH oxidasa, la activación de canales de K^+ y el cierre estomacal (Suhita et al., 2004).

1.6 Ascorbato, Metabolismo y Funciones.

1.8.3 Distribución y localización subcelular.

El ascorbato se encuentra en casi todos los tejidos vegetales, con excepción de las semillas secas (DeGara et al., 1997). Tiende a encontrarse en mayores concentraciones

en las hojas y en los meristemos que en la raíz. Es transportado en el floema de las hojas fuentes a los tejidos que lo demandan, como los meristemos (Hancock et al., 2003). Normalmente se asocian altas concentraciones de ascorbato con los frutos, particularmente los cítricos, sin embargo, su concentración en frutos no es siempre más alta que en las hojas, y puede ser mucho menor en muchas especies (Davey et al., 2000).

El ascorbato se localiza en todos los compartimientos subcelulares incluyendo la pared celular, pero generalmente se encuentra en bajas concentraciones en las vacuolas (Davey et al., 2000). Las estructuras del ácido ascórbico y sus productos de oxidación se muestran en la figura 4.

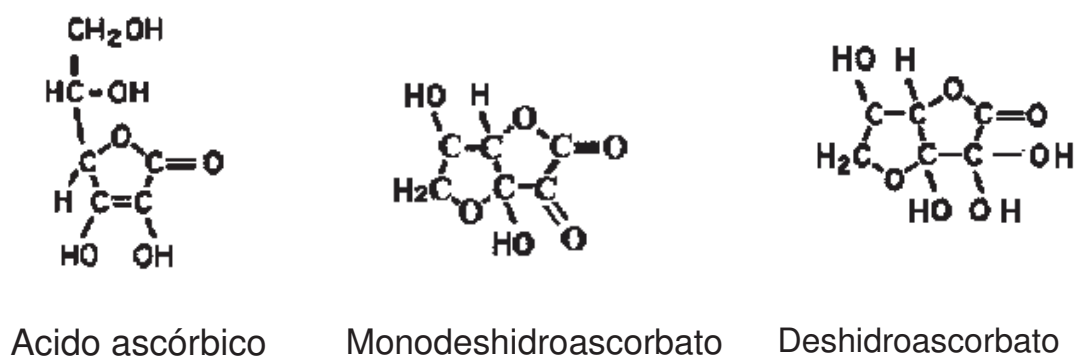


Figura 4. El ácido ascórbico y sus productos de oxidación.

A pH fisiológico, se encuentra predominantemente como el anión ascorbato. Cuando pierde por completo un electrón de su grupo ene-diol se produce el radical monodeshidroascorbato (MHA). Una oxidación adicional resulta en el deshidroascorbato (DHA), el cual no tiene carga. La habilidad del ascorbato para donar un electrón y la relativamente baja reactividad del radical MHA es la base de su

actividad biológica como antioxidante y6 buscador de radicales libres (Buettner y Schafer, 2004).

1.8.4 *Reciclamiento del ascorbato.*

El ascorbato es oxidado cuando actúa como un oxidante o como reductante por enzimas dioxigenasas. El primer producto es el radical MHA (Algunas veces llamado radical ascorbil o semideshidroascrobato) (Figura 5).

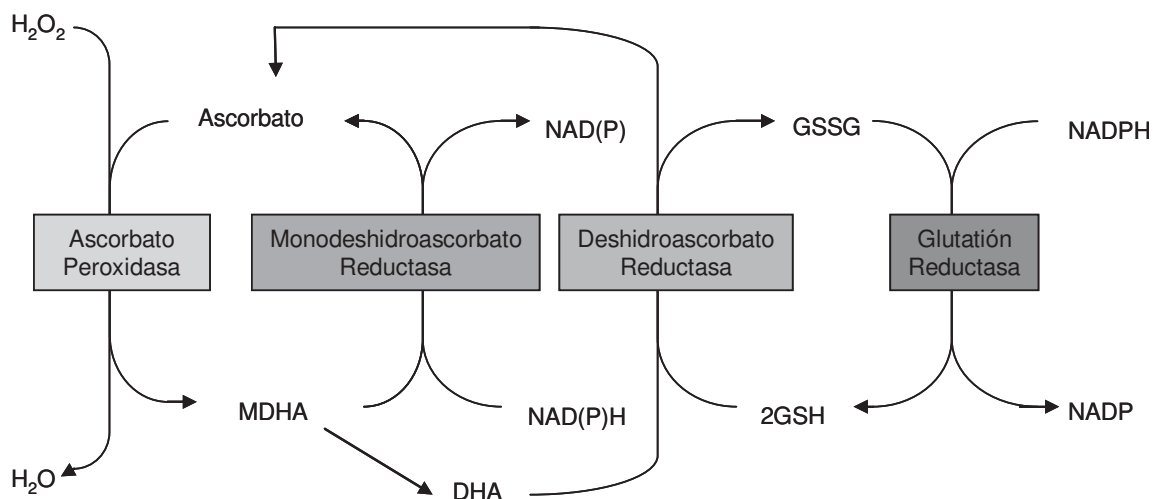


Figura 5. Ciclo del ácido ascórbico.

El DHA se produce cuando reaccionan dos radicales MHA y se producen ascorbato y DHA (Buettner y Schafer, 2004). El contenido de ascorbato en hojas sanas está usualmente 90% reducido, con la mayoría del resto presente como DHA (Doctor y Foyer, 1998). Tiende a estar más oxidado en las paredes celulares (Sanmartin et al., 2003). El MHA no se acumula en altos niveles. En circunstancias normales, el total de ascorbato se conserva reducido por un sistema de regeneración que involucra varios componentes. Estos incluyen a la enzima monodeshidroascorbato reductasa (MHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y al glutatión como componentes del ciclo ascorbato-glutatión. La enzima MHAR se localiza en el citosol, cloroplastos, peroxisomas, mitocondria y membrana plasmática (Noctor y Foyer, 1998). Son enzimas que contienen FAD y catalizan la reducción dependiente de NAD(P)H de MHA a ascorbato (Hossain y Asada, 1985). Se han identificado aproximadamente 25 secuencias de MHAR de 11 especies. El genoma de *A. thaliana* contiene cinco genes con una actividad predicha de MHAR (Chef et al., 2003).

El DHA puede ser reducido no enzimáticamente a ascorbato por tioles tales como el glutatión y por varias proteínas que contienen SH. Estas enzimas incluyen a la deshidroascorbato reductasa dependiente de glutatión, glutaredoxinas, glutatión-S-transferasa y tioredoxina reductasa (May y Asard, 2004). La actividad de DHAR dependiente de glutatión se ha reportado en los cloroplastos, mitocondria y peroxisomas (Doctor y Foyer, 1998). Existen cinco genes para DHAR en *A. thaliana* (Chef et al., 2003).

1.9 Respuestas a herida y herbívoros en plantas.

Las plantas pueden sufrir daño físico por muchos medios, quizás los más comunes sean el daño mecánico y el provocado por herbívoros. Puesto que las plantas pueden ser atacadas por diversos patógenos por los sitios dañados, han evolucionado sistemas de defensa complejos en contra de herbívoros y patógenos. Muchas de estas respuestas son inducibles y se activan específicamente como resultado de la herida. Las respuestas a herida han sido sujeto de estudio desde los últimos 30 años. La motivación para estos estudios surgió a raíz de los descubrimientos de Ryan y colaboradores a principios de los años 70 de que proteínas de defensa se acumularon en hojas de tomate y de papa heridas mecánicamente (Green y Ryan, 1972). Las proteínas detectadas en este estudio se caracterizaron como inhibidores de proteínasa y que subsecuentemente se encontró que inhiben las proteasas digestivas de insectos herbívoros (Ryan, 1990). Los inhibidores de proteínasa se han encontrado también como genes inducibles por herida en diversas especies vegetales, desde hierbas hasta árboles, se usan comúnmente como genes marcadores de respuesta a herida.

El tejido dañado activa un conjunto de respuestas inducibles como resultado de herida. Estas incluyen eventos localizados que sellan el sitio herido y protegen en contra de la invasión de patógenos oportunistas, la producción de proteínas defensivas y metabolitos secundarios. Los eventos de señalización que regulan estas diferentes respuestas son de interés para los biólogos vegetales no solo por su importancia intrínseca, sino también desde el punto de vista agronómico. El conocimiento de las

diferentes rutas de defensa en contra de diferentes patógenos es esencial para el desarrollo óptimo de estrategias de protección de los cultivos.

1.9.1 Respuestas de defensa.

Dentro de la vecindad inmediata del sitio herido habrá una capa de células dañadas irreparablemente, las cuales a pesar de ser incapaces de activar una respuesta ellas mismas, pueden liberar muchas moléculas diferentes que podrían actuar ya sea como estimuladores de respuestas en células vecinas sanas o como toxinas de defensa. Las células sanas que rodean el sitio herido pueden ser los blancos de las señales generadas por las células dañadas (Figura 6).

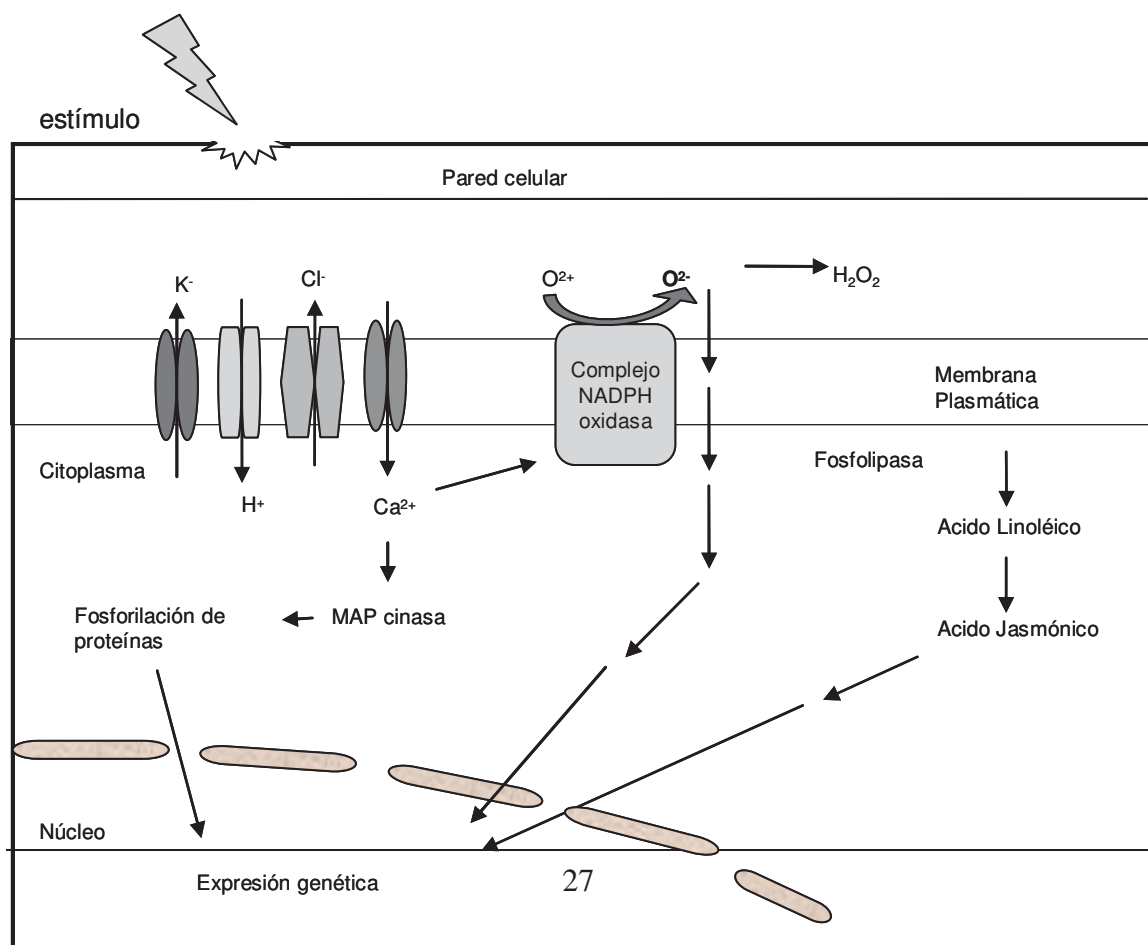


Figura 6. Posibles rutas de señalización que activan respuestas de defensa.

Una de las primeras funciones de las células sanas es formar una barrera física para restringir la invasión de patógenos. El reforzamiento de la pared celular se realiza en parte por el entrecruzamiento oxidativo rápido de proteínas de la pared celular que tiene lugar a los pocos minutos después de la herida (Bradley et al., 1992). Se ha observado que después sucede la síntesis de novo de glicoproteínas de pared celular ricas en hidroxiprolina que tienen función estructural, tales como las extensinas (Showalter, 1993). Otras respuestas incluyen la producción de polímeros derivados de fenólicos tales como la lignina y la suberina, los cuales están involucrados en sellar la herida.

También se producen compuestos químicos en respuesta a la herida. Estas defensas químicas se pueden dividir en dos categorías: metabolitos secundarios y proteínas. Los metabolitos secundarios incluyen a los terpenoides, alcaloides y fenólicos que forman fitoalexinas. Las proteínas inducibles por herida incluyen a los inhibidores de proteasas, inhibidores de alfa-amilasa, polifenol oxidasa, quitinazas y glucanasas (Constabel, 1999).

1.9.2 Señalización por herida.

1.9.2.1 Flujo de iones.

Uno de los eventos más rápidos que se activan después del daño es el cambio en el flujo de iones en la membrana plasmática. El daño por herida provoca una rápida despolarización del potencial eléctrico de la membrana plasmática. Este evento de despolarización está asociado con el flujo de iones K^+ , un concomitante influjo de protones y una alcalinización del medio extracelular. Agentes químicos que interrumpen estos flujos de iones demuestran que se afecta la subsecuente expresión de genes de defensa. La toxina fungal fusicoccina, que activa la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática y la hiperpolariza, es un potente inhibidor de la expresión de genes inducidos por herida (Schaller y Oecking, 1999). Estos resultados sugieren que la actividad de la H^+ -ATPasa puede regular la respuesta a herida, sin embargo esto no ha sido demostrado plenamente.

1.9.2.2 Señalización por calcio.

Otro ión que se ha implicado en la señalización por herida es el ión calcio, un ubicuo e importante segundo mensajero en eucariontes. Algunos estudios han demostrado un rápido incremento de concentraciones de Ca^{2+} citosólico después del daño por herida (Knight et al., 1993). Bloqueadores de canales de calcio, ionóforos de calcio y agentes

que movilizan Ca^{2+} de almacenes intracelulares muestran regulación de la expresión de genes, sugiriendo un papel importante en la señalización (León et al., 1998).

1.9.2.3 Especies reactivas de oxígeno.

La producción de especies reactivas de oxígeno es un evento primario en la respuesta de las plantas a la herida, sin embargo, la naturaleza y función de la explosión oxidativa en respuesta a la herida o a herbívoros no son completamente conocidas. El análisis de esta respuesta descrito en la literatura sugiere que ocurren dos fases principales de producción durante una respuesta a herida. La primera es una explosión muy rápida de anión superóxido y peróxido de hidrógeno que es máxima en los primeros minutos después de la herida en el mesocarpio de calabaza (Watanabe y Sakai, 1998). Una segunda y más sostenida producción de H_2O_2 se observó en un periodo de horas (Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999).

Experimentos para medir actividad enzimática usando inhibidores sugieren que la principal fuente de oxígeno reactivo es la producción de anión superóxido a través del complejo NADPH oxidasa unido a la membrana plasmática (Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999). La producción de peróxido de hidrógeno se realiza entonces del superóxido por la acción de la enzima superóxido dismutasa (Watanabe y Sakai, 1998).

La segunda fase de producción de H_2O_2 correlaciona con la actividad de poligalacturonasa inducida por herida, lo que sugiere que la actividad regulada de esta enzima puede liberar oligogalacturónidos endógenos que pueden actuar como estimuladores de la producción de H_2O_2 de manera local y sistemática. Este escenario

coloca al H₂O₂ en un lugar inferior de eventos que unen a la herida con la expresión de genes de defensa. La primera fase de la explosión oxidativa puede ser análoga a la primera explosión oxidativa estimulada por patógenos, lo cual es importante para la señalización de defensa.

1.9.2.4 Fosforilación de proteínas.

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo ubicuo para la regulación de su actividad, y se emplea comúnmente en las rutas de transducción, incluyendo la respuesta a herida (Rojo et al., 1998). Se han identificado proteínas cinasas que se inducen por herida (Lee et al., 1998). Las funciones precisas de estas enzimas se desconocen en la actualidad, sin embargo, las proteínas cinasas que han sido estudiado con más detalle son miembros de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). En sistemas animales estas proteínas regulan la señalización de respuesta a estrés. En plantas de tabaco, *Arabidopsis*, alfalfa y tomate se han identificado actividades enzimáticas equivalentes inducidas por heridas (Usami et al., 1995; Stratmann y Ryan, 1997).

Algunos investigadores han propuesto modelos en los cuales las cinasas inducidas por herida activarían a la enzima fosfolipasa A2, liberando ácido linoléico de la membrana de la membrana plasmática que actuaría como un sustrato para la biosíntesis de ácido jasmónico (Narváez-Vasquez et al., 1999).

1.9.3 Estimuladores de la expresión de las respuestas de defensa

1.9.3.1 *Ácido jasmónico (AJ)*

El ácido jasmónico originalmente se identificó como una señal potencial generada como respuesta al daño por herida por que su derivado volátil, el metil jasmonato, es un potente inductor de genes inhibidores de proteínasa en tomate (Farmer y Ryan, 1990). Además se observó que el ácido jasmónico se acumuló endógenamente en hojas heridas (Creelman et al., 1992). Actualmente se considera ácido jasmónico como una señal intracelular clave que regula respuestas al ataque por insectos, herida y estimuladores.

La biosíntesis de AJ es catalizada por un conjunto de enzimas que colectivamente se conocen como la ruta octadecanoide. Su biosíntesis comienza cuando precursores lipídicos se liberan de las membranas celulares. La enzima fosfolipasa A2 (FLPA2) inducida por herida es un candidato para la liberación de lípidos (Narváez-Vásquez et al., 1999). Recientemente la fosfolipasa D (FLD) también parece ser esencial para la síntesis de AJ en *Arabidopsis* (Wang et al., 2000). La FLD puede producir sustratos para la FLPA2 o directamente activar directamente lipoxigenasas involucradas en la síntesis de AJ. Las lipoxigenasas convierten el ácido linolénico e lípidos hidróperóxidos que son convertidos en el intermediario clave ácido 12-oxo-fitodienoico (AOFD). Este ácido es oxidado para producir AJ. Muchos de los genes que codifican para las enzimas biosintéticas para AJ son inducidos por herida (León y Sánchez-Serrano, 1999).

1.9.3.2 *Etileno*

La hormona etileno está involucrado en el desarrollo vegetal y se produce en respuesta a muchos estreses (Kende, 1993). El etileno por herida se produce como resultado de la activación de las enzimas 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) y 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO).

1.9.3.3 Sistemina –Un péptido implicado en la señalización por herida.

La sistemina es un péptido de 18 aminoácidos originalmente identificado como un potente factor inductor de inhibidor de proteinasa en hojas de tomate (Pearce et al., 1991).

Desde entonces los datos acumulados apoyan la propuesta de que la sistemina es una señal a herida sistemática móvil (Ryan and Pearce, 1998). Si bien se han identificado péptidos relacionados en otras especies de solanáceas, no es claro si la sistemina representa un mecanismo general de señalización basado en péptidos o si solo se produce en una familia específica de plantas.

La sistemina se expresa en las plantas como un precursor mucho más grande (200 aminoácidos), conocido como prosistemina (McGurl et al., 1992). El gen para la prosistemina se expresa primeramente en la región vascular de las partes de la planta y es inducible por herida (Jacinto et al., 1997).

1.10 Características del fruto de aguacate

El aguacate es un fruto dicotiledóneo perteneciente al orden de las ranales y a la familia de las Lauráceas. Fue clasificado por Gaetneer como *Persea gratissima* y como *Persea americana* por Mill. El fruto es una baya de forma piriforme, esférica u oval, de tamaño medio. El color del pericarpio es variable y puede ser verde, rojizo o violáceo (Coria, 1994). Se reconocen tres razas ecológicas (Mexicana, Guatemalteca y Antillana), dentro de las cuales se encuentran un gran número de híbridos y variedades. El aguacate “Hass” es un fruto de la raza guatemalteca; es hermafrodita y se encuentra clasificado como semitropical (Kadam y Salunkhe, 1995). El fruto de aguacate se caracteriza por un alto contenido de aceite y bajo en carbohidratos, es recomendado como un alimento energético para diabéticos (Salunkhe y Desai, 1984).

Los principales países productores de aguacate son México, Estados Unidos, República Dominicana, Brasil y Colombia. La producción de México representa el 21.9% convirtiéndolo en el productor número uno del mundo (Nogalingam, 1993). Michoacán es la principal entidad productora del aguacate del país aportando 40% de la producción mundial y el 85% de la nacional (Bárcenas y Aguirre, 1999). La zona aguacatera es la más alta productora “Hass” a nivel mundial. Los destinos de exportación del fruto son Francia, Japón, EUA, Canadá, Bélgica, Costa Rica y Reino Unido (Centro de Estadística Agropecuaria SAGAR, 1999).

1.10.1 Anatomía del fruto.

El pericarpio, que comprende a todo el fruto excluyendo únicamente la semilla, comprende la cáscara conocida como exocarpio, la pulpa o la parte comestible que es el

mesocarpio y una delgada capa cercana a la cáscara de la semilla conocida como endocarpio (Figura 7). El mesocarpio se encuentra totalmente irrigado a través de tejido conductivo o sistema vascular (Biale y Young, 1971). Las diferencias en tamaño entre la variedad de aguacates están determinadas más por la división de células que por el alargamiento de las mismas (Bowler y Cutting, 1998). La diferencia en el grosor del exocarpio entre las diversas variedades es atribuida a la densidad y cantidad de las células que conforman el tejido. De igual forma a través del tejido del mesocarpio se encuentran células especializadas en el almacenamiento de aceite, llamadas idioblastos, las cuales se distinguen por su gran tamaño y la lignificación de sus paredes (Biale y Young, 1971).

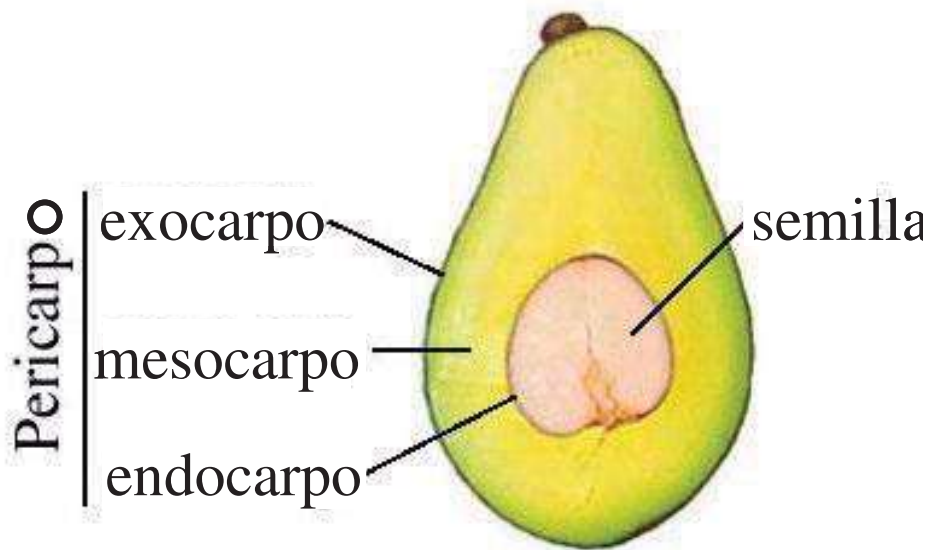


Figura 7. Anatomía del fruto de aguacate

1.10.2 Manejo del aguacate.

Las frutas y hortalizas presentan varios cambios desde la cosecha hasta su consumo. Dentro de los atributos de calidad de frutos frescos se incluyen la apariencia, textura, sabor y valor nutritivo. Una vez que los frutos han sido cosechados, la calidad del mismo puede verse deteriorada por diversos factores. Estos factores incluyen varios tipos de daño físico tales como: daños en la superficie del fruto, golpes por impacto y golpes por vibración. Los daños mecánicos aceleran la pérdida de agua, aumentan la velocidad de respiración y la velocidad de producción de etileno (Kader y Barret, 1996).

PARTE

2

Justificación

Dada la importancia económica que tiene este fruto en el país, particularmente en el Estado de Michoacán, se planteó el estudio sobre cuales son algunas de las reacciones de defensa relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta al daño por herida.

PARTE

3

Hipótesis

Frutos de aguacate responden al daño por herida produciendo derivados reactivos del oxígeno y alterando la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo antioxidativo.

PARTE

4

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Analizar la producción de derivados del oxígeno en frutos de aguacate en respuesta al daño por herida.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Establecer el modelo de estudio.
- b) Determinar la producción del anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo en fruto de aguacate dañado por herida.
- c) Medir la actividad de las enzimas deshidroascorbato reductasa y glutathione reductasa en frutos de aguacate dañados por herida.
- d) Medir actividad de la enzima ascorbato en frutos de aguacate dañados por herida.

PARTE

5

Metodología

5.6 ESTABLECIMIENTO DEL MODELO

Para establecer el modelo de estudio se llevaron a cabo 4 técnicas y son las siguientes:

e) **Tinción para observar la estructura**

Se cortaron láminas muy finas (de menos de 1 mm de espesor) de mesocarpio (pulpa) de aguacate. Esta lámina se colocó sobre un portaobjetos de vidrio y se le agregó una cantidad de azul de toluidina al 0.5% hasta cubrir en su totalidad el tejido; esta preparación se dejó incubando por 5 minutos a 25° C. Transcurrido este tiempo, la preparación se enjuagó con abundante agua destilada y se observó a una ampliación de 40X, usando un microscopio de luz.

f) **Determinación de firmeza**

La firmeza es uno de los atributos más importantes de la textura para evaluar la calidad del fruto y está determinada por las características morfológicas y fisiológicas del fruto tales como la firmeza del epicarpio, mesocarpio y su estado de madurez. Frecuentemente las mediciones de la misma no siempre están asociadas con la percepción humana (Looney y Kupferman, 1996).

La prueba para determinar la firmeza se llevó a cabo en un Texturómetro Universal Xtrad, Modelo TA-XT2i con una capacidad de 25kg. Se utilizó una sonda de aguja (p2,

cilíndrica de acero inoxidable de 2mm de diámetro) a una velocidad de penetración de 1 mm/s; a una distancia de 5 mm.

La fuerza máxima de punción del aguacate se midió en Kg. El experimento se realizó por cuadruplicado y se repitió 9 veces, obteniendo un n=36. Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar.

g) Medición de la actividad de la enzima celulasa en fruto de aguacate verde y maduro

Extracción de la enzima: (todo en frío)

La extracción de la enzima celulasa se hizo como a continuación se describe:

Se pulverizaron 5g de tejido de mesocarpio de aguacate **verde** en un mortero con nitrógeno líquido, el polvo obtenido se colocó en un tubo Falcon que contenían 10ml de NaCl (Cloruro de sodio) 1M, se mezcló muy bien y se centrifugó a 20,000Xg por 30 minutos a 4°C, la fase líquida se filtró con papel Whatman 3, humedecido en NaCl (cloruro de sodio) 1M, se midió el volumen obtenido y en base a este se le adicionó poco a poco el reactivo sulfato de amonio en agitación constante, hasta un 85% de saturación (proceso que dura hasta 3 h). Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 20,000Xg por 10 minutos a 4°C y la pastilla obtenida se suspendió en 10 ml de agua destilada, desionizada y estéril. Este extracto se usó para realizar la reacción enzimática. Este procedimiento de extracción se realizó de la misma manera para las muestras de aguacate **maduro**.

Reacción enzimática: (Para ambos estadios de maduración del aguacate: verde y maduro).

La reacción enzimática para celulasa se hizo de la siguiente manera:

Se mezclaron 80 μ l del extracto enzimático con 120 μ l de ácido carbiximetilcelulosa, 0.5% (en buffer de acetato de sodio, 50 Mm, pH 5.0). Esta mezcla se incubó por 2 h a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 1ml de buffer de borato 100 mM, pH 9,0, posteriormente se le adicionaron 200 μ l de 2-cianoacetamida al 1%, (para determinar los grupos reductores) se mezcló perfectamente bien y se hirvió por 10 minutos en baño maría a ebullición. Se equilibró la temperatura a 25°C y se midió la absorbencia a 276 nm para cuantificar los grupos reductores liberados, en un espectrofotómetro Beckman DU Serie 500 (CA, USA).

h) Medición de la actividad de la enzima poligalacturonasa en fruto de aguacate verde y maduro.

Extracción de la enzima: (todo en frío)

La extracción de la enzima poligalacturonasa se realizó igual que para celulasa.

Reacción enzimática: (para ambos estadios de maduración del aguacate: verde y maduro).

La reacción enzimática para poligalacturonasa se hizo de la siguiente manera:

Se mezclaron 80 μ l del extracto con 80 μ l de ácido poligalacturónico, 0.5% (en buffer de acetato de sodio 50Mm, Ph 5.0), esta mezcla se incubó por 2 h a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 1 ml de buffer de borato 100mM, pH 9.0, posteriormente se le adicionaron 200 μ l de 2-cianoacetamida al 1%, se mezcló muy bien y se hirvió por 10 minutos en baño maría a ebullición. Se equilibró la temperatura a 25°C y se midió la absorbencia a 176 nm para cuantificar los grupos reductores liberados, en un espectrofotómetro Beckman DU Serie 500 (CA, USA).

5.7 ALCANIZACION DEL MEDIO

A 24.3 °C se midió el pH a 20 ml de agua des-ionizada, el cual resultó de 5.9.

Se cortaron círculos de mesocarpio de aguacate de 2cm de diámetro por 3 mm de espesor, se colocaron en un vaso de precipitado y se le adicionaron los 20 ml de agua desionizada estéril, registrando inmediatamente el pH, este se monitoreó cada 10 minutos por una hora y posteriormente se continuó el registro de cada hora durante 24 horas.

5.8 MEDICIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

d) Anión Superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

La detección del anión superóxido *in situ* fue realizada de acuerdo al método establecido por Doke (1983), modificado por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, de este Instituto.

Mediante esta técnica se detecta la presencia del anión superóxido por la formación del complejo insoluble azul de formazán, resultado de la reducción del NBT (Nitroblue tetrazolium) por el anión superóxido.

Se cortaron círculos de mesocarpio de aguacate de 2cm de diámetro por 3mm de espesor y se incubaron a una temperatura de 25°C por los diferentes tiempos 0h, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 6 y 24h, pasado este tiempo, se pusieron en una solución de NBT (Nitroblue trtrazolium) 0.25% disuelto en buffer de KH₂PO₄. (fosfato de potasio) 10 mM, pH 7.8 incubándose por 5 minutos a la misma temperatura; posteriormente se eliminó el NBT y se incubaron de nuevo por 5 minutos.

Transcurrido este tiempo el tejido teñido se clarificó en el etanol de 96 grados a ebullición por 5 minutos, para detener la reacción y remover la clorofila. El resultado obtenido se documento fotográficamente.

El experimento se realizó cuadruplicado y se repitió 9 veces, obteniendo una n=36. Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar.

b) Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

La detección del peróxido de hidrógeno *in situ* fue realizada de acuerdo al método descrito por Adam et al., (1995), modificado también por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de plantas de este Instituto.

La producción del peróxido de hidrógeno se midió en fruto de aguacate en estado de madurez fisiológica.

Se cortaron círculos de mesocarpio de aguacate de 2cm de diámetro por 3 mm de espesor y se incubaron a una temperatura de 25°C por los diferentes tiempos; 0h, 15 minutos, 1,6,15 y 24 h, pasado este tiempo, se pusieron en una solución de 1mg/ml de DAB[3,3'-Diamonobenzidina (3,3',4,4'-tetra-aminobiofenio) (disuelto en agua)] y se dejaron incubando por un lapso de 2 horas en esta solución a la misma temperatura.

Transcurrido este tiempo el tejido teñido se clarificó en etanol de 96 grados a ebullición por 10 minutos, para detener la reacción y remover la clorofila. El resultado obtenido se documentó fotográficamente.

El experimento se realizó por cuadruplicado y se repitió 9 veces, obteniendo una n=36, Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar.

c) Análisis del Radical Hidroxilo (OH[•])

El análisis del radical hidroxilo fue realizado en base al método establecido por Popham y Novacky (1991), modificado por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de plantas.

La producción de este radical se analizó de manera indirecta, por la determinación espectrofotométrica del compuesto malondialdehído el cual se produce por la peroxidación de lípidos y es reactivo al ácido tiobarbitúrico.

Se cortaron trozos de mesocarpio de aguacate de 0.5g y se incubaron a una temperatura de 25°C a diferentes tiempos: 0h, 30 min, 1h, 2h, 4h, 24h, posterior a la incubación se pulverizó el tejido en un mortero con nitrógeno líquido; el polvo obtenido se colocó en un tubo eppendorf y se hogenizó con 1ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en un vortex Fisher Genie 2 (N.Y. USA.), posteriormente se centrifugó por 20 min a 15,000Xg; el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se le adicionó un volumen igual de 2-ácido tiobarbitúrico (TBA) al 5% disuelto en TCA al 20%, esta mezcla se hirvió por 40 minutos a baño María y transcurrido este tiempo se enfrió en agua con hielo por 15 minutos. De nuevo se centrifugó por 10 minutos a 10,000Xg y de inmediato se determinó la absorbancia a 532 y 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU Serie 500 (CA, USA).

A 600 nm se mide el valor no específico que será restado a la lectura media a 532 nm.

La concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico se calcula usando el coeficiente de extinción de $155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y los resultados se expresan en TBARS por gramo de tejido.

5.9 MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DEL CICLO ASCORBATO-GLUTATION.

c) **Medición de la enzima Deshidroascorbato-reductasa**

Extracción de la enzima:

Se cortaron trozos de mesocarpio de aguacate de 0.5g y se incubaron a los tiempos:0, 1, 2, 4, 6, 8, y 24 h, se pulverizó el tejido en un mortero con nitrógeno líquido, el polvo se colocó en un tubo Eppendorf y se le adicionó 1 ml de Hepes-NaOH, 100 mM. pH 7.5 y se homogenizó la mezcla, acto seguido se centrifugo a 12,000Xg por 20 minutos a 4°C, el sobrenadante, que es el extracto, se colocó en un tubo nuevo y se guardó para su posterior utilización.

Medición de la actividad enzimática

La reacción enzimática para deshidroascorbato-reductasa se hizo como a continuación se describe:

Se mezclaron 20 μ l del extracto (*) con 1 ml de la siguiente mezcla de reacción:

50 mM de fosfato de Potasio, pH 6.5

1 mM de EDTA

2 mM de ácido deshidroascórbico (DHA)

2.5 mM de glutatión reducido (GSH)

Agua para ajustar el volumen a 1 ml.

La reducción de DHA, dependiente de GSH se monitoreó a 265 nm en un espectrofotómetro Beckman DU Serie 500 (CA, USA), con un coeficiente de extinción de $14 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

d) Medición de la enzima glutatión –reductasa

Extracción de la enzima:

Se cortaron trozos de mesocarpio de aguacate de 0.5g y se incubaron a los tiempos de: 0, 2, 8, 12 y 24 h, se pulverizó el tejido en un mortero con nitrógeno líquido; el polvo se colocó en un tubo Eppendorf y se le adicionaron 2 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía:

Tris-HCL 0.1 M, Ph 8.5

MgCl 20 mM

EDTA 1 mM.

Esta mezcla se agitó en un vortex GENIE por 10 s y en seguida se centrifugo a $40,000 \times g$ por 15 minutos a 4°C , el sobrenadante obtenido se utilizó para los ensayos enzimáticos requeridos.

Medición de la actividad enzimática.

La reacción enzimática para glutatión-reductasa (GR) se hizo como a continuación se describe:

Se mezclaron 50 μ l del extracto en un volumen total de 1 ml de la siguiente mezcla de reacción:

0.1 M de Tris-HCL, Ph 8.0

1 mM de EDTA

0.1 mM de nicotin-adenin-dinucleótido disfosfato NADPH

1 nM de glutatión oxidado (GSSG)

Agua, para ajustar el volumen.

La actividad se midió por el decremento de la absorbencia a 334nm; esto debido a la oxidación del NADPH por medio de la enzima GR. El coeficiente de extinción NADPH es de $6.2 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.10 MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ASCORBATO OXIDASA.

Extracción de la enzima:

Se cortaron trozos de mesocarpio de aguacate de 0.5g y se incubaron a los tiempos de: 0, 1, 2, 8, 12, y 24 h, se pulverizó el tejido en un mortero con nitrógeno líquido; el polvo se colocó en un tubo Eppendorf y se le adicionó una solución amortiguadora que contenía

PMSF 0.5mM 300 μ l

PVPP 1.5%

Acetato de sodio 0.1M pH 5.6 600 μ l

Esta mezcla se agitó en un vortex Fisher Genie 2 (N.Y. USA.), por 10 s y en seguida se centrífugo a 12,500rpm por 1 minuto a 4°C, el sobrenadante obtenido se utilizó para los ensayos enzimáticos requeridos.

Medición de la Actividad Enzimática.

La reacción enzimática para ascorbato –oxidasa (AO) se hizo como a continuación se describe:

En un volumen total de 1ml se preparó la siguiente mezcla de reacción:

20 μ l del extracto.

930 μ l de amortiguador B. (Citrato de Sodio 0.025M + Fosfato de potasio 0.05M pH 5.6).

30 μ l de sustrato. (Acido ascórbico 0.05% + EDTA disodio 1% neutralizado)

20 μ l de albúmina. (Preparada al 1%)

Este ensayo espectrofotométrico se basa en el hecho de que el ascorbato absorbe a 265 nm, mientras que su producto de oxidación, el deshidroascorbato, no absorbe a esta longitud de onda.

La actividad se midió en un espectrofoómetro Beckman SU Serie 500 (CA, USA), utilizando el coeficiente de extinción para el ácido ascórbico de $9246 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 265 nm.

PARTE

6

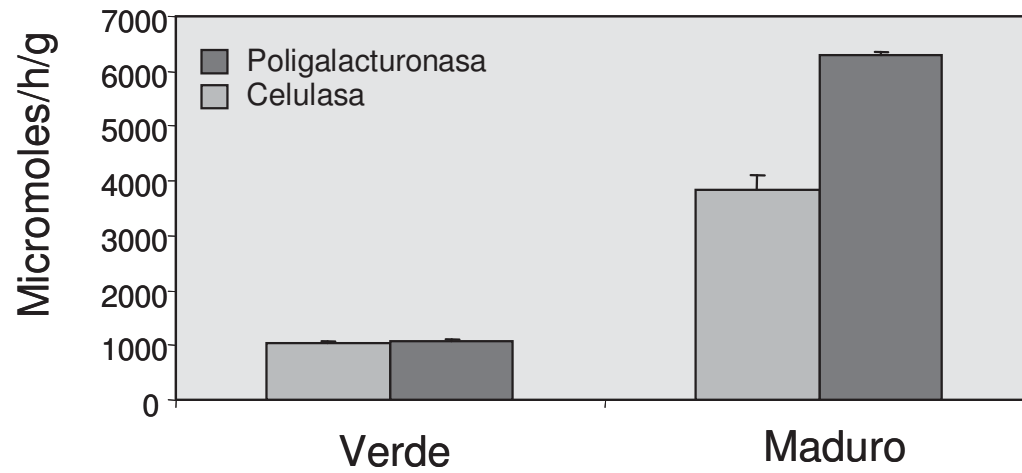
Resultados

6.6 Establecimiento del modelo de estudio.

El fruto del aguacate ha sido clasificado como climatérico. Este comienza a madurar después de que es separado de la planta. Después de la cosecha el cambio más obvio durante la maduración es una rápida transición del mesocarpio de un estado duro a un estado suave, con una consistencia similar a la mantequilla.

Debido a nuestro interés por estudiar la respuesta del fruto ante el daño provocado por herida fue necesario establecer las condiciones de nuestro modelo de estudio, para utilizar el fruto en un estado de maduración específico durante nuestra experimentación.

Como primer paso se analizaron las actividades de las enzimas celulasa y poligalacturonasa, las cuales tienen una función importante durante la maduración de frutos climatéricos. Se utilizaron dos estadios de maduración a los que se les denominaron arbitrariamente verde y maduro (Figura 8).



Firmeza (kg)

23.773

0.682

Figura 8. Estados de maduración del fruto de aguacate.

La actividad de celulasa en el estadio verde fue un promedio de 1000 micromoles/h/g de peso fresco, durante el estadio maduro esta enzima incremento su actividad hasta 4000 micromoles/h/g de peso fresco. La actividad de poligalacturanasa en el estadio verde fue similar a la de la celulasa pero durante el estadio maduro se incrementó hasta 6000 micromoles/h/g de peso fresco. Las dos enzimas incrementaron notoriamente su actividad durante el estadio maduro, y fue mayor el incremento para la enzima poligalacturanasa la cual se incrementó cinco veces en relación con la celulasa, la cual mostró un incremento de tres veces su actividad en relación con el estadio verde.

Para establecer la firmeza de ambos frutos se utilizó un texturómetro. El valor de firmeza para el fruto verde fue mucho que para el fruto maduro, 23.7 kilos y 0.68 kilos respectivamente. Un último análisis que se realizó para establecer el modelo de estudio fue analizar la estructura del tejido, utilizando el microscopio y un colorante (azul de toluidina) para observar la pared celular de ambos frutos (Figura 9).

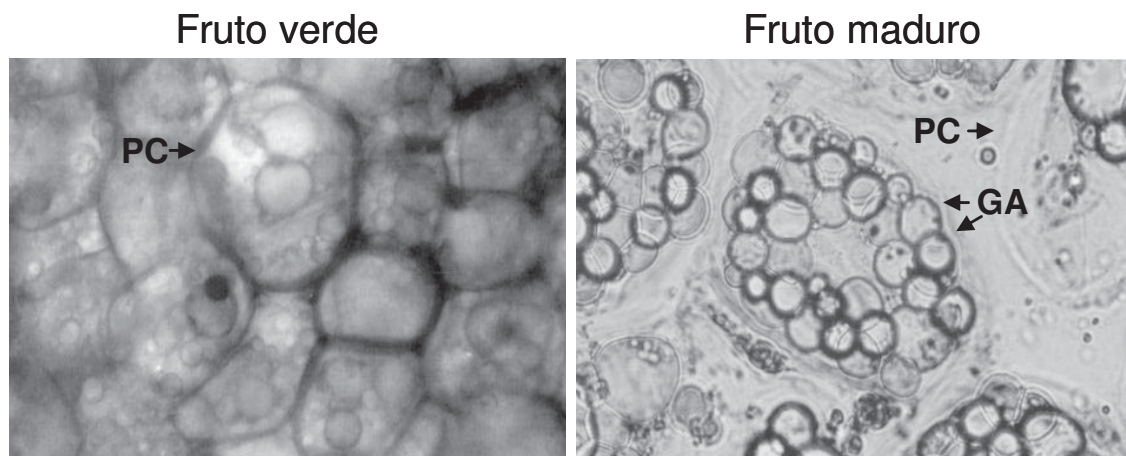


Figura 9. Tinción de tejido de mesocarpio de aguacate con azul de toluidiana. PC = Pared celular; GA = Gota de aceite.

Este experimento se consideró importante para constatar la integridad del tejido ya que las enzimas analizadas anteriormente ejercen su función sobre los componentes principales de la pared celular degradándolos y cambiando la estructura del tejido y por lo tanto posiblemente su modo de responder al daño por herida. El tejido del fruto verde mostró una estructura organizada, con las paredes celulares bien definidas y con gotas de aceite, características de este fruto, dentro de las células. En el tejido del fruto maduro no se observó una pared celular bien definida, más espacio intercelular y un mayor número de gotas de aceite dentro de las células. Una vez caracterizado nuestro modelo de estudio el fruto verde se utilizó para realizar todos los experimentos que a continuación se describen.

6.7 Cambio en el pH en respuesta al daño por herida.

Se ha reportado que la alcalinización extracelular es un factor importante para la producción de derivados reactivos de oxígeno en algunas plantas. Como un primer ensayo para analizar la respuesta de aguacate al daño por herida se realizaron experimentos para medir el cambio de pH en trozos de fruto de aguacate (Figura 10).

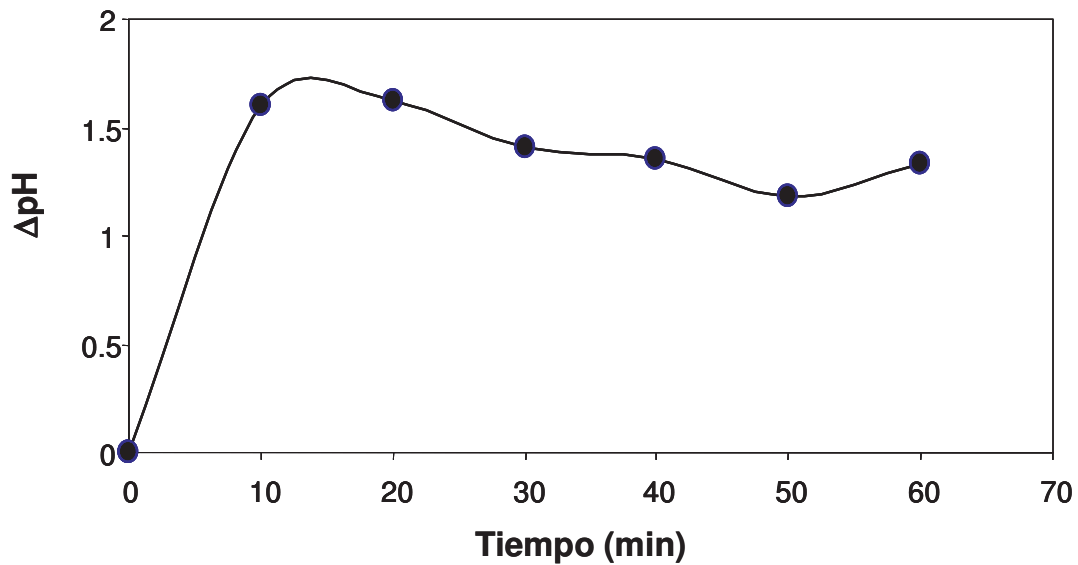


Figura 10. Cambio en el pH en tejido de fruto tratado por herida.

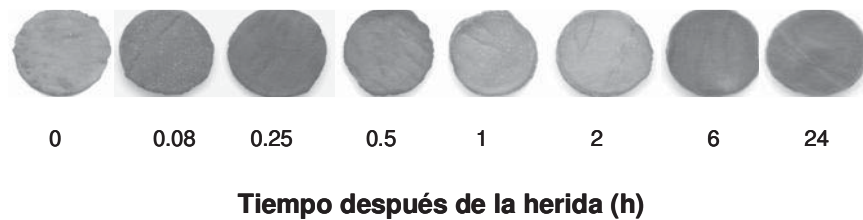
Como se observa en la figura, el tejido respondió con un incremento notable en el pH, de 5.5 de su valor inicial a 6.5, diez minutos después del tratamiento. Este incremento se mantuvo constantemente incrementado a lo largo del experimento, sugiriendo una tendencia a la alcalinización extracelular en respuesta al tratamiento.

6.8 Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno

6.8.1 Producción del anión superóxido (O_2^-).

Se analizó la producción del anión superóxido en respuesta al daño por herida en tejido de fruto verde. Para su detección se utilizó el reactivo NBT el cual se reduce en presencia del anión y forma un pigmento azul. Como se observa en la figura 11A, a un tiempo de 0 horas se detectó una producción basal del compuesto, la cual se incrementó notablemente hasta alcanzar un máximo a los 15 minutos del tratamiento. Después de este tiempo se observó una disminución en su producción hasta las dos horas, pero se acumuló de nuevo a las 6 horas, para mantenerse constante hasta las 24 horas. Así, claramente se observó una doble tendencia de acumulación del anión superóxido (Figura 11B) en respuesta al daño por herida, la primera a tiempos cortos (5 Y 15 minutos) y la segunda a tiempos más largos (6 horas).

A



B

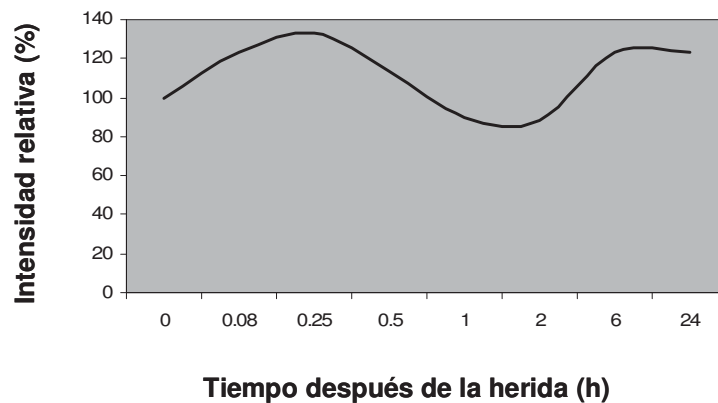
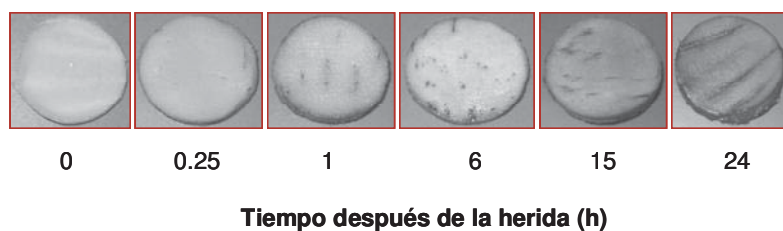


Figura 11. Producción de anión superóxido en fruto de aguacate dañado por herida.

6.8.2 Producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Para el análisis de la producción de hidrógeno se utilizó el reactivo SAD, el cual se oxida en presencia de peróxido de hidrógeno y forma un precipitado insoluble café que se acumula en el sitio de producción. En la figura 12A se observa que a 0 horas no hay producción de peróxido de hidrógeno, pero este se comenzó a acumular a partir de los 15 minutos y continuó acumulándose de manera proporcional al tiempo de tratamiento, de manera que a mayor tiempo de tratamiento se observó una mayor acumulación de peróxido (Figura 12B).

A



B

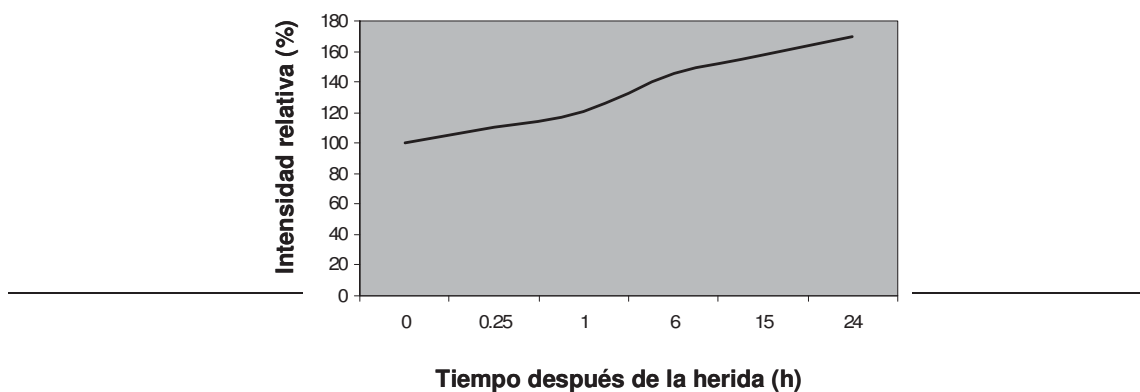


Figura 12. Producción de peróxido de hidrógeno en fruto de aguacate tratado por herida.

6.8.3 Producción de radical hidroxilo (OH).

El análisis de la producción del radical hidróxilo se realizó cuantificando las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 13). Al tiempo 0 se observó una acumulación de 4 nanomoles/g de tejido de TBARS, esta cantidad mostró un ligero incremento 1 hora después del tratamiento, pero a las 2 horas se observó una notable acumulación de 9 nanomoles/g de tejido, la cual disminuyó a las 4 horas, para finalmente a las 24 se obtener valores similares a los e 0 horas.

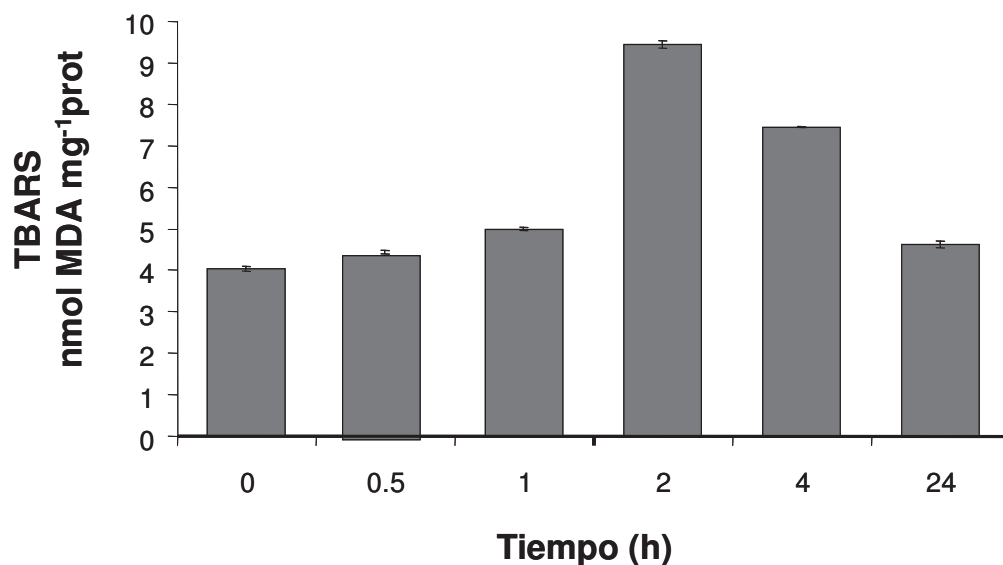


Figura 13. Producción del radical hidroxilo en tejido de fruto tratado por herida.

6.9 Análisis de enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido ascórbico.

Una planta que ha sufrido una estimulación generalmente ha desarrollado mecanismos para regresar a un estado metabólico normal. Existen diversos mecanismos de adaptación en este sentido. Uno de los más conocidos es el que involucra al ciclo del ácido ascórbico, en el cual participan varias enzimas que lo metabolizan, entre las que se encuentran las enzimas ascorbato peroxidasa, monodeshidroascorbato reductasa, deshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa. Las enzimas deshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa son muy importantes para la regeneración de los niveles de ácido ascórbico y por lo tanto fueron las enzimas que se consideraron para analizar durante el tratamiento por herida de frutos de aguacate, pues su análisis nos proporcionaría información sobre el papel de estas enzimas durante este tipo de estrés.

6.9.1 Actividad de la enzima glutatión reductasa

El análisis de actividad mostró que a 0 horas de tratamiento no se observó una actividad basal importante, y que a tiempos cortos de tratamiento incremento notablemente su actividad, pues a 2 horas se incremento hasta 5 nmol/min/mg prot. La actividad se mantuvo alta hasta las 8 horas de tratamiento, después de este tiempo la actividad disminuyo ligeramente, pero aún fue mayor que al tiempo 0. Después de 24 horas de tratamiento la actividad se mantuvo por arriba del valor de 0 horas de tratamiento (Figura 14).

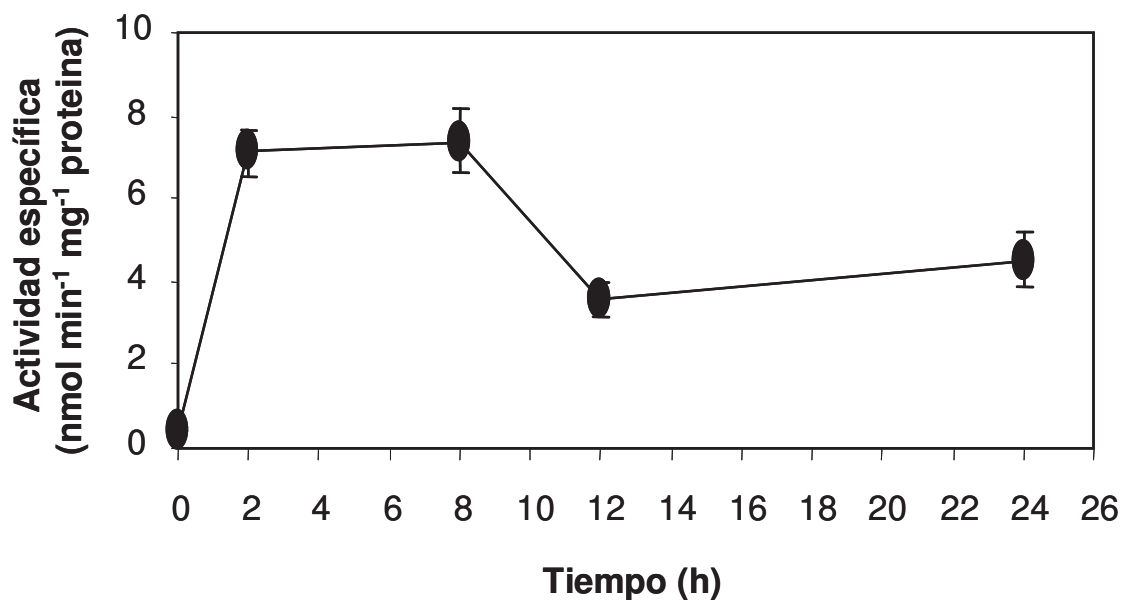


Figura 14. Actividad de la enzima glutati3n reductasa en tejido tratado por herida

6.9.2 Actividad de la enzima deshidroascorbato reductasa.

Cuando se analizó la actividad de esta enzima se observó un valor basal en su actividad de aproximadamente 200 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ prot., y esta actividad se incrementó 1 hora después del tratamiento a un valor máximo de aproximadamente 350 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ prot. Después de este tiempo la actividad decreció hasta cerca de los valores del control a las 8 horas de tratamiento, pero se observó un segundo incremento a las 24 horas, que fue el tiempo máximo de duración del experimento (Figura 15).

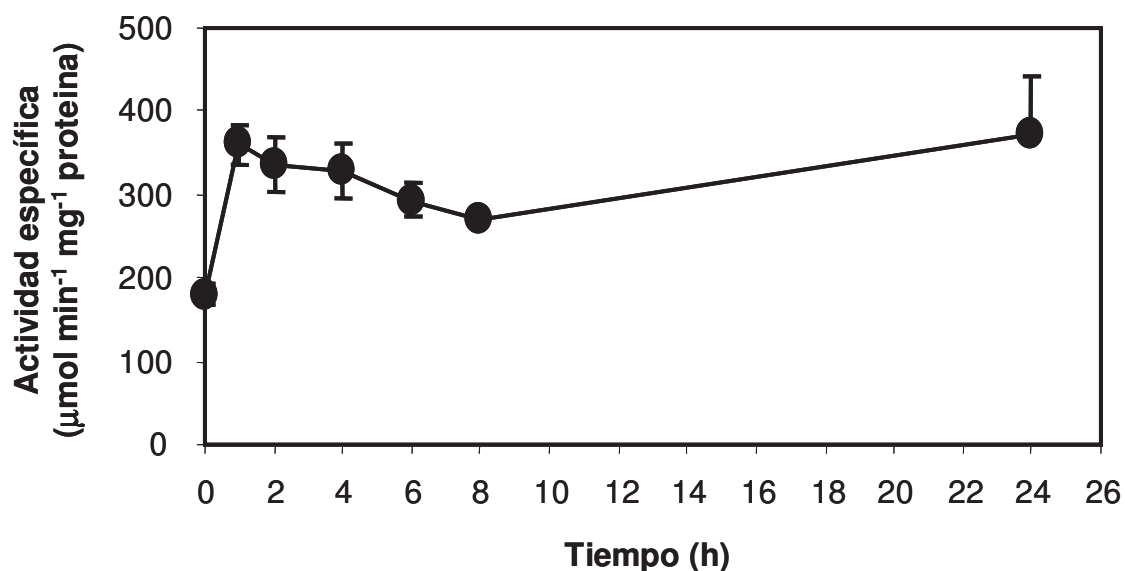


Figura 15. Actividad de desidroascorbato reductasa en tejido tratado por herida.

6.10 Análisis de la enzima ascorbato oxidasa.

Esta enzima oxida el ácido ascórbico a su producto de oxidación el deshidroascorbato, limitando la disponibilidad de este metabolito en el apoplasto, que es el sitio de ubicación de la enzima. En respuesta a la herida, esta enzima incremento su actividad después de 2 horas de tratamiento, alcanzando un nivel máximo de actividad a las 8 horas de tratamiento, posteriormente disminuyó su actividad a las 12 horas y a las 24 horas después del tratamiento, los valores de actividad del último tiempo analizado fueron similares a los de 0 horas de tratamiento (Figura 16).

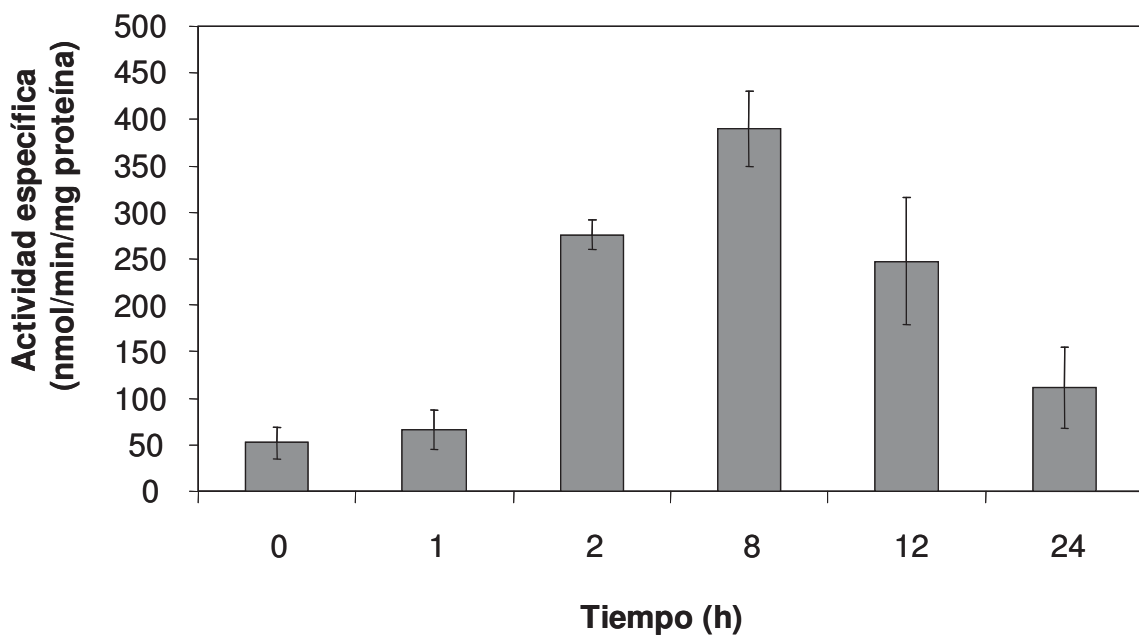


Figura 16. Efecto del daño por herida en fruto de aguacate sobre la actividad de la enzima ascorbato oxidasa.

PARTE

7

Discusión

Las plantas pueden sufrir daño físico por muchos medios, y este daño puede ser aprovechado por diversos patógenos para invadir el tejido dañado. Resulta interesante estudiar las respuestas de las plantas ante el daño por herida porque nos permite conocer los mecanismos que han desarrollado las plantas para confrontarlo. Fue de nuestro interés estudiar algunas de las respuesta relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno y analizar algunas de las actividades enzimáticas involucradas en su destoxificación en fruto de aguacate. El interés por estas respuestas se basa en el hecho de que forman parte de las primeras respuestas que se activa ante la presencia de diversos tipos de estrés, incluyendo a la herida y a que están involucradas con la activación de otros tipos de respuestas, algunas de las cuales se mencionaron previamente en los antecedentes. Además, siendo el aguacate tan importante económicamente para el país, los aspectos bioquímicos relacionados la defensa en contra de patógenos son muy poco conocidos.

7.1 Modelo de estudio.

Para realizar nuestra investigación fue necesario establecer el modelo de estudio, para lo cual se seleccionaron frutos de aguacate en estadio verde de maduración y se compararon con el estadio maduro. Se analizaron las actividades de las enzimas celulasa y poligalacturonasa en ambos estadios de maduración y se encontraron bajas para ambas enzimas en el estadio verde (poligalacturonasa, aprox. 1000 micromoles/h/g; celulasa, aprox. 1000 micromoles/h/g) en relación con el estadio maduro (poligalacturonasa, aprox. 6000 micromoles/h/g; celulasa, aprox. 4000 micromoles/h/g). Además, se

realizaron observaciones al microscopio para analizar la estructura del tejido en ambos estadios. En el aguacate verde se distinguieron células delimitadas por paredes celulares bien definidas y en el tejido maduro no se observaron de manera clara las paredes celulares, posiblemente debido a la acción de las enzimas que degradan la pared celular y cuya actividad se incremento durante la maduración del fruto. Debido a que la fisiología del fruto cambia durante el proceso de maduración, seleccionamos al estadio verde de maduración para nuestros estudios, además de que durante esta etapa fisiológica todavía se conserva la integridad del tejido y posiblemente su capacidad de respuesta ante el daño por herida este intacta.

El fruto de aguacate comienza a madurar solo después de haber sido separado del árbol. Después de la cosecha, los cambios más obvios durante la maduración son la transición rápida del mesocarpio de duro a suave, con una consistencia semejante a la mantequilla y una pérdida total de la integridad estructural. Algunos investigadores han estudiado la relación entre el ablandamiento del fruto de aguacate y la actividad de enzimas que degradan la pared celular. Lewis et al. (1974) fueron los primeros en notar que el mesocarpio duro del aguacate contenía niveles bajos de actividad de celulasa, mientras que fue alta en tejido suave. Pesis et al., (1978) encontraron una correlación directa entre actividad de celulasa, ablandamiento, respiración y producción de etileno. Finalmente, Raymond and Phaff (1965) reportaron una relación positiva entre la actividad de la enzima poligalacturonasa y el ablandamiento del fruto.

7.2 Cambio en el pH.

En este estudio se demuestra que el tratamiento por herida en fruto de aguacate induce cambios en el flujo de iones, manifestados como cambios en el pH del medio en donde se incubaba el tejido tratado. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con reportes previos de que la estimulación del tejido vegetal induce cambios en la alcalinización del medio (Atkinson y Baker, 1989; Kuchitsu et al., 1994).

Se ha reportado que el flujo de algunos iones parece estar asociado con los eventos primarios de respuestas de defensa en cultivos celulares (Amano et al., 1997). Sin embargo poco se sabe sobre la asociación entre flujo de iones y respuestas de defensa en tejido dañado por herida.

Un elicitador glicopeptido de un patógeno de chíncharo, *Mycosphaerella pinodes*, indujo una rápida alcalinización e incrementos en los niveles de los iones Na⁺ y K⁺ en la solución extracelular después del contacto con el tejido. La presencia de monensina y lidocaina inhibió estos cambios, mientras que no sucedió lo mismo con la valinomicina. La producción de fitoalexinas fue fuertemente inhibida por los primeros compuestos. Estos estudios indican que cambios en el flujo de iones, en particular el eflujo de Na⁺ y K⁺, podrían estar estrechamente asociados con el sistema de transducción de señales para la respuesta de defensa en el tejido vegetal.

Además, el ácido oligogalacturónico (OGA) indujo una rápida y transitoria alcalinización extracelular en plántulas intactas de pepino (*Cucumis sativus*), específicamente las moléculas con un grado de polimerización entre 10 y 13 indujeron una respuesta de alcalinización máxima de 0.48 unidades de pH (Spiro et al., 2002).

También se ha reportado una alcalinización extracelular inducida por OGA en células de tabaco cultivadas en suspensión (Mathieu et al., 1991; Spiro et al., 1998).

Las respuestas de alcalinización en raíces de pepino y en células de tabaco difirieron en su magnitud, en su cinética y en respuesta a varias concentraciones de OGA. El tratamiento con OGA de células de tabaco condujo a una respuesta de alcalinización máxima a los 14 minutos y el pH regreso a su valor original 120 minutos después del tratamiento, independientemente de la concentración de OGA utilizada.

En contraste las cinéticas de alcalinización y reacidificación en raíces de pepino fueron independientes de la concentración de OGA y mucho más lentas. OGA indujo una alcalinización máxima 60 minutos después del tratamiento seguida por una reacidificación dentro de 4 horas. Estas diferencias cinéticas podrían deberse al uso de tejido intacto y tejido vegetal en cultivo.

7.3 Producción de especies reactivas de oxígeno.

La detección del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno estuvo basada en la formación de complejos insolubles utilizando NBT y DAB, respectivamente, debido a esto, los ensayos proveen una medida de su generación potencial más que niveles de acumulación. Debido a la alta reactividad del anión superóxido y a su bajo nivel de difusión en el apoplasto, se sugiere que los resultados observados representan las respuestas de unas pocas capas de células cerca de la superficie del tejido tratado.

Una característica de la producción del anión superóxido fue el patrón bifásico que se observó, el primero a los 15 minutos y el segundo a las 6 h después del tratamiento. El comportamiento de esta respuesta fue similar a la reportada por Johnson et al., (2003) en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) tratados por daño mecánico. Estos autores

reportan que la producción del radical superóxido mostró un patrón bifásico reproducible sobre el tiempo con picos de generación en 2 y 5 horas. Una consecuencia concomitante de la generación de estos radicales fueron niveles elevados de proteínas modificadas oxidativamente. Extractos libres de células de tejido estresado mecánicamente, fragmentos pécticos y productos de escisión generados de paredes celulares fueron capaces de inducir la generación de superóxido en tejido no estresado, indicando la participación de factores activos biológicamente que inducen una fase adicional de la síntesis de superóxido (Johnson et al., 2003).

Un fenómeno similar se observó para la producción de peróxido de hidrógeno por Baker y Orlando (1995) en células vegetales cultivadas tratadas con un estimulador derivado de patógeno. Estos últimos investigadores observaron que la producción de peróxido de hidrógeno mostró dos picos de generación en un periodo de 6 horas. La primera fase sugirió ser una respuesta biológica no específica al estrés, mientras que la segunda fase pareció deberse a una interacción específica entre el patógeno y los receptores de la planta que conducen a la muerte celular hipersensible.

El estrés mecánico se produce en las células vegetales por una variedad de estímulos físicos y conduce a una amplia variedad de respuestas celulares. Los primeros estudios sobre estrés mecánico usaron contacto físico simple en tejido de tallo de frijol para estudiar respuestas en crecimiento celular (timogénesis), deposición de calosa y síntesis de etileno (Jaffe, 1973; Jaffe y Forbes, 1993). Legendre et al., (1993), Yahraus et al., (1995), y Cazalé et al., (1998) más recientemente expusieron células de frijol soya (*Glicine max*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) a estrés mecánico por agitación de cultivos en suspensión o a medio hipoosmótico para incrementar la turgencia celular. Usando

estos sistemas demostraron la generación temprana de peróxido de hidrógeno por éstas células. Yahraus et al., (1995) ejercieron presión directa sobre células de frijol soya en cultivo colocadas en un portaobjetos para microscopio y observaron histoquímicamente la generación de peróxido de hidrógeno. Además, la herida provoca la iniciación de la peroxidación de lípidos por lipoxigenasas, induciendo una reacción en cadena de producción de radicales libres que causan un rápido deterioro de la membrana plasmática (Thompson et al., 1987).

7.4 Análisis de las enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido ascórbico.

7.4.1 *Deshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa.*

En nuestro análisis sobre las enzimas deshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa observamos que ambas actividades de incrementaron en respuesta al daño por herida (figuras 13 y 14), y se mantuvieron incrementadas durante todo el tiempo de experimentación. Este comportamiento sugiere que la herida ocasionada al tejido estimula el incremento en la concentración de ácido ascórbico a través de la acción de estas enzimas y que este incremento le permite a la célula destoxificar las especies reactivas de oxígeno, generadas como respuesta a la herida. Estas enzimas reciclan el ascorbato contribuyendo a mantener alto el estado reducido del ascorbato, son parte del ciclo denominado “ciclo del ascorbato-glutatión”, formado por una serie de reacciones coordinadas en las cuales el ascorbato requerido para la remoción de H₂O₂ es

continuamente regenerado, utilizando equivalentes reducidos de nucleótidos de piridina (Noctor y Foyer, 1998).

En relación a esto, Mondy y Leja (1986) estudiaron el efecto del daño mecánico por herida sobre el contenido de ácido ascórbico en cultivares de tubérculo de papa cultivar Belrus. La herida involucro realización de rebanadas de 1 mm y tiras de 10 x 20 mm del tubérculo. Ambos tejidos exhibieron un incremento altamente significativo de ácido ascórbico después de la herida. El incremento más grande (400%) se observó en rebanadas a los 2 días. Se sugirió que la acumulación de ácido ascórbico después de la herida en papa podría inhibir la oxidación de fenoles, disminuyendo el oscurecimiento de tejido.

Además, Grantz et al., (1995) aislaron una clona de ADN complementario de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), que codifica para la enzima reductasa del radical ascorbato libre (EC 1.6.5.4), también conocida como monodeshidroascorbato reductasa (MDHR). La abundancia del mensajero para la enzima se incremento dramáticamente en respuesta a herida, un tratamiento que induce hidroxilación de prolina dependiente de ascorbato y que se requiere para la acumulación de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina. La abundancia relativa del mensajero correlacionó directamente con la actividad de la enzima en el tejido analizado. Esta enzima puede contribuir a mantener los niveles de ácido ascórbico para la protección en contra del daño provocado por radicales libres inducidos por herida. Estos resultados sugirieron que la actividad de la enzima se regula a nivel de abundancia de su mensajero por bajo contenido de ascorbato o por factores que promueven su utilización.

La vitamina C es un importante metabolito primario de las plantas que funciona como un antioxidante, cofactor de enzimas y modulador de la señalización celular en procesos fisiológicos que incluyen la biosíntesis de la pared celular, fitohormonas y metabolitos secundarios, resistencia a estrés, fotoprotección, división celular y crecimiento. Las plantas sintetizan ácido ascórbico a través de una vía de novo, pero también es reciclado a través del ciclo del ascorbato-glutation. La regulación de su reciclamiento no es muy conocida. El ácido jasmonico y su derivado metil ester, ácido jasmonico, regulan las respuestas de las plantas a muchos estrés bióticos y abióticos por disparar una reprogramación transcripcional de la célula. Usando ^{14}C -manosa radiomarcada y analizando el perfil de transcritos, (Wolucka et al., 2005) demostró que el tratamiento con metil jasmonato incrementa la síntesis de novo de ácido ascórbico en *Arabidopsis* y en células en suspensión de tabaco Bright Yellow-2 (BY-2). En células BY-2 esta estimulación coincidió con una transcripción incrementada de al menos dos genes que responden a metil jasmonato y que codifican para las enzimas que sintetizan ácido ascórbico: GDP manosa 3", 5"-epimerasa y una posible gulo-1.4-lactona deshidrogenasa/oxidasa.

El peróxido de hidrógeno y otras ERO son intermediarios clave en las rutas de señalización celular cuya producción puede ser balanceada por antioxidantes (Carcomo et al., 2004). El peróxido de hidrógeno es un mensajero secundario que regula respuestas a hormonas, estrés del medio ambiente biótico y abiótico y a procesos de desarrollo (Neill et al., 2002). Interesantemente, también actúa como segundo mensajero para la inducción de genes de defensa tardíos en respuesta a metiljasmonato (Orozco-Cardenas y Ryan, 1999; Orozco-Cardenas et al., 2001). El incremento transitorio en los niveles de

H₂O₂ requiere de una actividad para eliminar la producción de ERO en sus sitios de acumulación para neutralizar sus efectos adversos. Por lo tanto, el ácido ascórbico podría estar involucrado en el control de la fuerza y la propagación de la señal por H₂O₂ dentro y fuera de la célula, y del resultado final de la señalización, por ejemplo, la muerte celular. La modulación de la concentración de ácido ascórbico (por incremento en los niveles de ascorbato o la relación ascorbato-deshidroascorbato) puede resultar en cambios en la señalización por H₂O₂ y conducir a alteraciones no deseadas en las plantas.

El ascorbato puede ser utilizado como cofactor de algunas enzimas específicas tales como oxigenasas, oxidasas, depoxidasas y tioglucosidasas. La mayoría de estas enzimas catalizan reacciones tales como hidroxilaciones, deshidrogenaciones y epoxidaciones (Prescott y John, 1996). Las oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato están involucradas en rutas importantes que conducen a la biosíntesis de glicoproteínas de pared celular ricas en hidroxiprolina (GRHP), metabolitos secundarios relacionados con la defensa tales como fenilpropanoides y alcaloides.

Las GRHP representan una superfamilia de proteínas de pared celular que incluyen a las extensinas, proteínas que contienen arabinogalactanos, nodulinas y lectinas, que cumplen papeles en crecimiento, desarrollo, defensa y señalización celular (Cassab, 1998). La síntesis de GRHP se induce por herida e infección (Corbin et al., 1987; Wycoff et al., 1995). Además, el ácido ascórbico actúa como un activador transcripcional de un gen que codifica para una GRHP en maíz (García-Muniz et al., 1998).

El tejido herido en plantas sufre algunos cambios celulares debido a la descompartamentación, liberación de materiales almacenados y pérdida excesiva de agua. Un gran número de moléculas, tales como péptidos, hormonas y especies reactivas de oxígeno se han relacionado con la respuesta a herida (Leon et al., 2001). La respuesta inicial es activar la expresión de genes relevantes muchos de los cuales se han caracterizado como inhibidores de proteasas, defensinas y tanninas (Reymond et al., 2000). Sin embargo los procesos que regulan la percepción y la transducción de las señales generadas por la herida no se conocen completamente.

Pocos son los estudios que se han realizado para analizar los componentes de la transducción de la señal por herida. En una de estas investigaciones se describe el posible mecanismo de transmisión de la señal que podrían utilizar las proteínas cinasas. La proteína cinasa de tabaco (*Nicotiana tabacum*) inducida por herida (PCIH) es una de las mejor caracterizadas. Esta involucrada en las respuestas a herida y patógenos (Romeis et al., 1999; Zhang et al., 2000). Yap et al., () reportaron la identificación de un gen que codifica para una proteína que interactúa directamente con PCIH en *N. tabacum* y la denominaron “factor que interactúa con PCIH”. La región N-terminal mostró una alta similitud con un dominio de unión a ADN específico para plantas. La región C-terminal pareció ser esencial para la interacción con PCIH. Ensayos de fosforilación *in vitro* indicaron que PCIH fosforiló eficientemente a este factor. Estos resultados sugieren que el factor que interactúa con PCIH es un factor de transcripción que es fosforilado directamente por PCIH, siendo activado de esta manera para la transcripción de genes involucrados en las respuestas a herida y a patógenos.

7.4.2 *Ascorbato oxidasa.*

La actividad de la enzima ascorbato oxidasa se incremento en respuesta al daño por herida (figura 15) el fruto de aguacate. Esto sugiere que la oxidación del ácido ascórbico en el apoplasto es importante para la producción de especies reactivas de oxígeno, ya que el ácido ascórbico es un antioxidante muy importante y se encuentra presente en altas concentraciones en el apoplasto (Foyer et al., 1991).

Esta enzima oxida el ácido ascórbico y lo convierte en deshidroascorbato y se ha reportado que regula el estado redox del ácido ascórbico extracelular (Pignocchi et al., 2003; Sanmartín et al., 2003), además, se considera como el primer paso en la ruta de degradación en el apoplasto (Green y Fry, 2005).

La cantidad de ácido ascórbico en el apoplasto es un determinante clave de la duración de una señal oxidante, así como del estado redox del apoplasto (Foyer y Noctor, 2005). Bajos niveles de AA podrían permitir que las señales oxidativas persistan y se acumulen en el apoplasto, esto podría ser fundamental para controlar la acumulación y la transmisión de señales reguladas por ERO que se activan en respuesta a contaminantes atmosféricos, patógenos y hormonas (Pignocchi et al., 2003), y en este caso en fruto de aguacate dañado por herida.

7.5 Modelo propuesto para la integración de resultados.

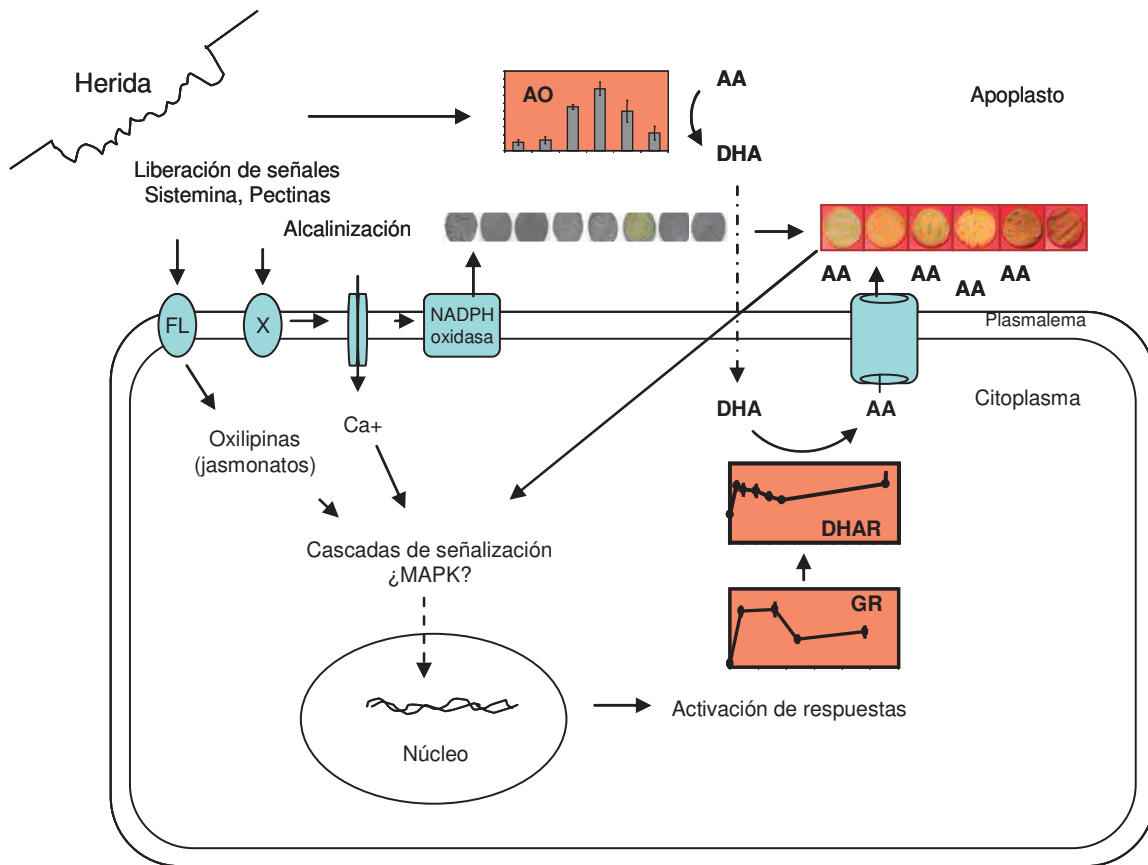


Figura 17. Modelo de integración sobre la producción de especies reactivas de oxígeno y mecanismos enzimáticos antioxidantes en el tejido de fruto de aguacate tratado por herida.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre el análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad de algunas enzimas relacionadas con la reducción del ácido ascórbico en fruto de aguacate tratado por herida, se propone el modelo esquematizado en la figura 16 para integrar dichos resultados. Cuando el tejido de fruto es dañado por herida es posible que se generen señales liberadas de la pared celular, las cuales activen enzimas fosfolipasas localizadas en la pared celular de células integra y que estas enzimas sinteticen moléculas relacionadas con el metabolismo de lípidos tales como los jasmonatos, los cuales, como se menciona en la discusión están relacionadas con la respuesta a herida en las Solanaceas. Estas moléculas podrían activar la expresión genética de genes relacionados con la respuesta a herida. En nuestro caso se analizó la actividad de enzimas relacionadas con la reducción del ácido ascórbico, deshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa, y se observó que sus actividades se incrementan en respuesta al daño por herida, con nuestros datos no es posible saber si este incremento en actividad se debe a un incremento en la expresión genética o a una activación postraduccional de las enzimas analizadas.

Por otro lado, el daño ocasionado por la herida también podría activar a otras proteínas ubicadas en la membrana plasmática, las cuales podrían interactuar con canales de iones y modificar el flujo de iones a través de la membrana. En nuestro estudio observamos que el tratamiento por herida provocó un incremento en el pH del medio en donde se incubó el tejido, lo que refuerza la propuesta del posible efecto de la herida en el flujo de iones en el tejido de aguacate. Este cambio en el flujo de iones también podría activar a la enzima NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática. Se ha reportado que

esta enzima esta relacionada con la producción de anion superóxido en tejidos vegetales. En nuestro estudio detectamos histoquímicamente la producción de anion superóxido a tiempos cortos después del tratamiento, es posible que este se genere por acción de la enzima NADPH, sin embargo no se descarta la posibilidad de que se produzca por otras vías. También es posible que el anion superóxido sea el sustrato para la acumulación de peroxido de hidrogeno detectado en el tejido. Como resultado del incremento en la actividad de las enzimas DHAR y GR se favorece el reciclamiento del acido ascórbico a través de la reducción del deshidroascorbato, el cual se genera por la oxidación del acido ascórbico en el apoplasto por la acción de la enzima ascorbato oxidasa y es transportado al interior de la célula en donde se localizan las mencionadas enzimas. El acido ascórbico así regenerado podría ser transportado hacia el apoplasto utilizarse para controlar los niveles de peroxido de hidrogeno, de esta manera manteniendo a la célula en un estado de homeostasis.

PARTE

8

Literatura citada

- Amano M, Toyoda K, Ichinose Y, Yamada T, Shiraishi T. 1997.** Association between ion fluxes and defense responses in pea and cowpea. *Plant Cell Physiol.* 38, 698-706.
- Atkinson M, Baker CJ. 1989.** Role of the plasmalemma H⁺-ATPase in *Pseudomonas syringae*-induced K⁺/H⁺ exchange in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 91, 298-303.
- Baker GJ, Orlandi EW. (1995).** Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321.
- Biale JB, Young RE. 1971.** The avocado pear. In: *The biochemistry of fruits and their products* Vol. 2 (Ed.) Hulme AC. Academic Press. P.p. 1-63.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA. 2002.** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany.* 53, 1367-1376.
- Bowler C, Fluhr R. 2000.** The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trend in Plant Science.* 5,241-245.
- Bowler JP, Cutting JGM. 1998.** Avocado fruit development and ripening physiology. *Horticultural Reviews.* 10, 229-271.
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ. 1992.** Elicitor-induced and wound induced oxidative cross-linking of a praline-rich plant-cell wall protein – a novel, rapid defense response. *Cell* 70, 21-30.

- Buchanan BB, Scürrmann P, Wolosiuk RA, Jacquot JP. 2002.** The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynthetic Research*. 73, 215-222.
- Buck V, Quinn J, Pino TS. 2001.** Peroxide sensors for the fision yeast stress activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular Biology of the Cell*. 12, 407-419.
- Carcamo JM, Pedraza A, Bojorquez-Ojeda O, Zhang B, Sanchez R, Golde DW. 2004.** Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits IkappaBalph kinase beta. *Molecular and Cell Biology*. 24, 6645-6652.
- Cassab GI. 1998.** Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49, 281-309.
- Cazalé AC, Rouet-Mayer MA, Heberle-Bors H, Barbier-Brygoo, Mathieu Y, Lauriere C. (1998).** Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol*. 116, 659-669.
- Constabel CP. 1999.** A survey of herbivory-inducible defensive proteins and phytochemicals. In: *Induce Plants Defenses Against Pathogenes and Herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture*. Pp. 137-166. Agrawal, A.A., Tuzun, S., and Bent, E., APS Press, St Paul, Minnesota.
- Cooper CE, Patel RP, Brookes PS, Darley-Usmar, V.M. 2002.** Nanostransducer in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 489-492.

- Corbin DR, Sauer N, Lamb CJ. 1987.** Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Molecular and Cell Biology*. 7, 4337-4344.
- Coria AVM. 1994.** Sanidad del cultivo. En: Guía para el cultivo del aguacate. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto nacional de investigaciones forestales y Agropecuarias. Centro de Investigación del Pacífico Centro. Pp. 31-50.
- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE. 1992.** Jasmonic acid methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene-expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4938-4941.
- Danon A. 2002.** Redox reactions of regulatory proteins: do kinetics promote specificity?. *Trends in Biochemical Sciences*. 27, 197-203.
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledane MB. 2002.** A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*. 111, 471-481.
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ. 2004.** ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stimulate guard cells. *Journal of Experimental Botany*. 55, 205-212.
- Desikan R, Hancock J, Nelly S. 2005.** Reactive oxygen species as signalling molecules, in *Antioxidant and reactive oxygen species in plants* (ed. N, Smirnoff), Blackwell Publishing, Chennai, India, 169-196.
- Desikan R, Mockeries S, Hancock JT, Neill SJ. 2001a.** Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*. 127, 159-172.
- Doke N. 1983.** Generation of superoxide anion generation by potato protoplasts during the hypersensitive response to the hyphal wall components of *Phytophthora*

- infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity response. *Plant Pathol.* 23, 359-367.
- Farmer EE, Ryan CA. 1990.** Interplant communication –airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plants leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7713-7716.
- Fath A, Bethke PC, Rochon A, et al. 2003.** The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *The plant Cell.* 15, 2181-2191.
- Foreman J, Demichik V, Bothwell JHF, et al. 2003.** Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 422, 442-446.
- Foyer CH, Lelandis M, Edward EA, Mullineaux PM. 1991.** The role of ascorbate in plants; interactions with photosynthesis and regulatory significance, in *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*, Vol. 6, Pell, E. and Steffen, K., Eds., 131.
- Foyer CH, Noctor G. 2005.** Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 28: 1056–1071.
- Garcia-Muniz N, Martinez-Izquierdo JA, Puigdomenech P. 1998.** Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors. *Plant Molecular Biology.* 38,623-632.
- Grantz AA, Brummel DA, Bennet AB. 1995.** Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant Physiol.* 108, 411-418.

- Green MA, Fry SC. 2005.** Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* 433: 83–87
- Green TR, Ryan CA. 1972.** Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves; a possible defence mechanism against insects. *Science*. 175, 776, 776-777.
- Hwang I, Chen H-C, Scheen J. 2002.** Two- component signal transduction pathways in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 129, 500-515.
- Jabs T. 1999.** Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants animals. *Biochemical Pharmacology*. 57, 231-245.
- Jacinto T, McGurl B, Franceschi V, Delano-Freier J, Ryan CA. 1997.** Tomato prosystemin promoter confers wound-inducible, vascular bundle-specific expression of the β -glucorodinase gene in transgenic tomato plants. 20, 406-412.
- Jaffe MJ, Forbes S. 1993.** Thigmomorphogenesis: the effects of mechanical perturbation on plants. *Plant Growth Regul*. 12, 313-324.
- Jaffe MJ, Huberman M, Johnson J, Telewski FW. 1985.** Thigmomorphogenesis: the induction of callose formation and ethylene evolution by mechanical perturbation in bean stems. *Physiol. Plant*. 64, 271-279.
- Jaffe MJ. 1973.** Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to chemical simulation. *Planta* 114, 143-157.
- Johnson SM, Doherty SJ, Croy RRD. (2003).** Biphasic superoxide generation in potato tuber. A self-amplifying response to stress. *Plant Physiology*. 131, 1440-1449.

- Kadam SS, Salunkhe DK. 1995.** Avocado. In: Handbook of fruit science and technology, production, composition, storage and processing. Kadam SS and Salunkhe DK (Eds). Marcel Dekker Inc. Pp. 263-375.
- Kader AA, Barret DM. 1996.** Classification, composition of fruits, and postharvest maintenance of quality. Processing fruits. In: Science and technology. Biology principles and applications Vol.I Somogyi LP, Ramaswamy HS and Hui YH (Eds). Technomic publication. Pp. 1-21.
- Keller T, Damude HG, Doerner PDRA, Lamb C. 1998.** A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91-phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. The Plant Cell.10, 255-266
- Kende H. 1993.** Ethylene biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. 44,283-307.
- Knight MR, Read ND, Campbell AK, Trewavas AJ. 1993.** Imaging calcium dynamics in living plants using semisynthetic recombinant aequorins.J.Cell Biol. 121, 83-90.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J. 2000.** Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 97, 2940-2945.
- Kuchitsu K, Kikuyama M, Shibuya N. 1994.** Rapid induction of transient membrane depolarization by N-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells. Plant Cell Physiol.35, s64.
- Lee SH, Lee MH, Chung WI, Liu JR. 1998.** WAPK, a Ser/Thr protein Kinase gene of *Nicotiana tabacum*, is uniquely regulated by wounding, abscisic acid and methyl jasmonate. Mol.Gen.Genet.259, 516-522.

- Legendre L, Reuter S, Heinstein PF, Low PS. 1993.** Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cell. Plant Physiol. 102, 203-240.
- Leon J, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ. 2001.** Wound signaling in plants. J. Exp. Bot. 52, 1-9.
- León J, Rojo E, Titarenko E, Sanchez-Serrano JJ. 1998.** Jasmonic acid dependent and -independent wound signal transduction pathway are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 258, 412-419.
- León J, Sanchez-Serrano JJ. 1998.** Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. Plant Physiol. Biochem. 37, 373-380.
- Lewis EN, Linkins AE, O`Sullivan S, Reid PD. 1974.** Two forms of cellulase in bean plants. In 8th Intern. Symp. Plant Growth Regulators. Hirokawa Publishing, Co. Tokio, pp. 708-718.
- Mathieu Y, Kurkjian A, Xia H, Guern J, Koller A, Spiro MD, O`Neill M, Albersheim P, Darvill A. 1991.** Membrane responses induced by oligogalacturonides in the presence of calcium ions. Phytochemistry. 51, 193-198.
- McGurl B, Pearce G, Orozco-Cardenas M, Ryan CA. 1992.** Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. Science 255, 1570-1573.
- Mittler R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7, 405-410.
- Mondy NI, Leja M. 1986.** Effect of mechanical injury on the ascorbic acid content of potatoes. Journal of Food Science. 51, 355-357.

- Narváes-Vasquez J, Florin-Christensen J, Ryan CA. 1999.** Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, sistemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell*. 11, 2249-2260.
- Neill S, Desikan R, Hancock J. 2002.** Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 5, 388-395.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT. 2002.** Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53, 1237-1247.
- Noctor G, Foyer CH. 1998.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249–
- Nolgalingam T. 1993.** Avocado. In: *Encyclopedia of food science, food science and nutrition*. Macrae R., Robinson RK, and Sandler MJ (Eds). Academic Press, London. Pp.293.
- Op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C. 2003.** Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 15, 2320-2332.
- Orozco-Cárdenas M, Ryan CA. 1999.** Hydrogen peroxide is generated systemically in plants leaves by wounding and systemic via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96, 6553-6557.
- Orozco-Cárdenas, ML, Narváez-Vázquez J, Ryan CA. 2001.** Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate, *the plants cell*. 13, 179-191.

- Pei Z.-M, Murata Y, Benning G. 2000.** Calcium Channels activate by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*. 406, 731-734.
- Pesis E, Fuchi Y, Zauberman G. 1978.** Cellulase activity and fruit softening in avocado. *Plant Physiol*. 61, 416-419.
- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH. 2003.** The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiol* 132:1631–1641
- Pignocchi C, Foyer CH. 2003.** Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr Opin Plant Biol* 6: 379–389.
- Popham PL, Novacky A. 1992.** Use of dimethyl sulfoxide to detect hydroxyl radicals during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Plant Physiol*. 96, 1157-1160.
- Prescott AG, John P. 1996.** DIOXYGENASES: molecular structure and role in plant metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47, 245-271.
- Raymond D, Phaff HJ. 1965.** Purification and certain properties of avocado polygalacturonase. *J. Food Sci.* 30, 266-273.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. 2000.** Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 709-720.
- Rojo E, Titarenko E, León J, Berger S, Vancanneyt G, Sánchez-Serrano JJ. 1998.** Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 13, 153-165.

- Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig DF, Hirt H, Jones JDG. 1999.** Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinase in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 273-289.
- Ryan CA, 1990.** Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425-449.
- Ryan CA, Pearce G. 1998.** Systemin: A polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 1-17.
- Sagi M, Fluhr R. 2001.** Superoxide production by plant homologues of the gp⁹¹ phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology.* 126, 1281-1290.
- Salunkhe DK, Desai BB. 1984.** Avocado. In.: postharvest biotechnology of fruits. Vol II. Salunkhe DK and the Desai BB (Eds). CRC Press inc. Pp. 27-38.
- Sanmartin M, Drogoudi PD, Lyons T, Pateraki I, Barnes J, Kanellis AK. 2003.** Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* 216: 918–928.
- Scraser-Field SAMG, Knight MR. 2003.** Calcium : just a chemical switch?. *Current Opinion in Plant Biology.* 6, 500-5506.
- Shaller A, Oecking C. 1999.** Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense response in tomato plants. *Plant Cell.* 11, 263-272.

- Spiro MD, Bowers JF, Cosgrove DJ. 2002.** A comparison of oligogalacturonide- and auxin-induced extracellular alcalinization and growth responses in root of intact Cucumber seedlings. *Plant Physiology*. 130, 895-903.
- Spiro MD, Ridley BL, Eberhard S, Kates KA, Mathieu Y, O'Neill MA, Mohnen D, Guern J, Darvill A, Albersheim P. 1998.** Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturininides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol*. 116, 1289-1298.
- Stratmann JW, Ryan CA. 1997.** Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and ilogosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 11085-11089.
- Sugita D, Raghavendra AS, Kwak JM, Vavasseur A. 2004.** Cytosolic alkalisation precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology*. 134, 1536-1535.
- Torres MA, Onouchi H, Hamda S, Machida C, Hammond-Kossack KE, Jnes JDG. 1998.** Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91-phox). *The Plant Journal*. 14, 365-370.
- Usami S, Banno H, Ito Y, Nishihama R, Machida Y. 1995.** Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 8660-8664.
- Vandenabeele S, Der Kelen KV, Dat J et al. 2003.** A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 100, 16113-16118.

- Vranova E, Atichartpongkul S, Villaroel R, Van Montgu M, Inze D, Van Camp W. 2002.** Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum*. Proceedings of the National Academy of Science USA 99, 10870-10875.
- Wang C, Zien CA, Afithile M, Welti R, Hildebrand DF, Wang X. 2000.** Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. Plant Cell. 12,2237-2246.
- Watanabe T, Sakai S. 1998.** Effects of active oxygen species and methyl jasmonate on expression of the gene for a wound-inducible l-aminocyclopropane-l-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*). Planta.206, 570-576.
- Wolucka BA, Goossens A, Inze D. 2005.** Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. Journal of Experimental Botany. 56, 2527-2538.
- Wycoff KL, Powell PA, Gonzales RA, Corbin DR, Lamb C, Dixon RA. 1995.** Stress activation of a bean hydroxyproline-rich glycoprotein promoter is superimposed on a pattern of tissue-specific developmental expression. Plant Physiology. 109, 41-52.
- Yahraus T, Chandra S, Legendre L, Low PS. 1995.** Evidence for a mechanically induced oxidative burst. Plant Physiol. 109, 1259-1266.
- Yap YK, Kodama Y, Waller F, Chung KM, Ueda H, Nakamura K, Oldsen M, Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H. 2005.** Activation of a novel transcription factor through phosphorylation by WIPK, a wound-induced mitogen-activated protein kinase in tobacco plants. Plant Physiology. 139, 127-137.

Zhang S, Liu Y, Klessig DF. 2000. Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J.* 23, 339-347.