



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

---

**EFFECTO DEL DAÑO POR HERIDA SOBRE ENZIMAS QUE  
METABOLIZAN ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN  
FRUTOS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill cv Hass)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:  
BIOL. YESENIA MARTÍNEZ DÍAZ**

**ASESOR DE TESIS:  
D.C. ERNESTO GARCÍA PINEDA**

**MORELIA, MICHUACÁN. MARZO DEL 2007**

## DEDICATORIA

A MIS PADRES  
LAZARO Y JUDITH

A MIS HERMANOS  
OMAR Y VICTOR

A MI TIO AMADEO

Y A TI AGUI

*A ustedes que siempre han estado conmigo en todo momento y han sido mi guía para conseguir las metas propuestas.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ernesto García Pineda, por ser mi guía durante el desarrollo de este trabajo y compartir conmigo sus conocimientos y experiencia. Por su disponibilidad en todo momento.

A mis sinodales: Dra. Lourdes Macías, Dr. Alfredo Saavedra, y al Dr. José López Bucio. Por sus valiosas sugerencias para mejorar la presentación de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de generación 2004-2006: Sonia, Paty, Lupita, Arnoldo, Cesar, León, Idolina, Rosenda, Luzma, y Arely. Por los buenos y malos momentos que pasamos, inolvidables por cierto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Elda, Angel, y Araceli. Por hacer más amenas las horas de trabajo.

A Maribel y Mayra por su amistad desinteresada.

A Teodoro por ser y estar.

A mil y un personas más, por que detrás de este trabajo hay mucha más gente de la que se puede agradecer en una pagina, a todos ellos y a ti gracias.

La fuente de conocimiento es inagotable  
Por muchos que sean los éxitos de la  
Humanidad en esa vía los hombres tendrán  
Siempre que buscar, descubrir y, conocer.

José Martí

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS, DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA U.M.S.N.H. BAJO LA ASESORIA DEL D.C ERNESTO GARCÍA PINEDA.

**CONTENIDO**

	PAG.
1. Antecedentes.....	1
1.1. Mecanismos de defensa en plantas .....	1
1.2. Mecanismos de defensa en respuesta al daño por herida.....	3
1.2.1. Receptores.....	4
1.2.2. Ion calcio.....	6
1.2.3. Fosforilación de proteínas.....	6
1.2.4. Ácido jasmónico.....	7
1.2.5. Etileno.....	8
1.2.6. Señales sistémicas y sus rutas de transducción.....	9
1.2.7. Sistemina, un péptido implicado en la señalización sistémica.....	9
1.2.8. Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	10
1.2.8.1. Radical anión superóxido ( $O_2^-$ ).....	10
1.2.8.2. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).....	11
1.2.8.3. Radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ).....	12
1.3. Las ERO inducen la muerte celular en plantas.....	13
1.4. Interacción entre ERO y otros componentes de señalización.....	15
1.5. Daños celulares ocasionados por las ERO.....	16
1.5.1. Peroxidación de lípidos.....	16

1.5.2. Oxidación de proteínas.....	17
1.5.3. Oxidación de ácidos nucleicos.....	17
1.6. Sistemas antioxidantes en plantas.....	18
1.7. Mecanismos enzimáticos.....	20
1.7.1. Catalasa.....	20
1.7.2. Peroxidasa.....	21
1.7.3. Superóxido dismutasa.....	23
1.8. Mecanismos no enzimáticos.....	24
2. Modelo de estudio.....	25
2.1. Descripción botánica.....	26
2.2. Detección de ERO en fruto de aguacate dañado por herida.....	28
2.2.1. Anión superóxido.....	28
2.2.2. Peróxido de hidrógeno.....	28
3. Justificación.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivos.....	32
6. Materiales y métodos.....	33
6.1 Material biológico.....	33
6.2 Reactivos.....	33
6.3 Procedimiento general.....	34
6.4 Extracción de enzimas.....	35
6.4.1. Catalasa.....	35

6.4.2. Peroxidasa.....	35
6.4.3. Superóxido dismutasa.....	36
6.5. Medición de la actividad enzimática por espectrofotometría.....	37
6.5.1. Catalasa.....	37
6.5.2. Peroxidasa.....	38
6.5.3. Superóxido dismutasa.....	38
6.6. Análisis estadístico.....	39
6.7. Actividad en gel de poliacrilamida no desnaturizante.....	40
6.7.1. Catalasa.....	40
6.7.2. Peroxidasa.....	41
6.7.3. Superóxido dismutasa.....	41
6.7.3.1. Identificación de isoenzimas de superóxido dismutasa.....	42
6.8. Enfoque isoelectrico.....	43
7. Resultados.....	44
7.1. Catalasa.....	44
7.2. Peroxidasa.....	47
7.3. Superóxido dismutasa.....	52
7.3.1. Identificación de isoenzimas de superóxido dismutasa.....	55
8. Discusión.....	57
8.1. Catalasa.....	58



8.2. Peroxidasa.....	60
8.3. Superóxido dismutasa.....	62
9. Modelo propuesto para la integración de resultados.....	65
10. Conclusión.....	68
11. Literatura citada.....	69

## **Apéndice**

Protocolos para la extracción de enzimas que metabolizan especies reactivas de oxígeno.

### **1. Catalasa**

1.1 Extracción.

1.2 Actividad por espectrofotometría.

1.3 Detección de la actividad en gel de poliacrilamida no desnaturizante.

1.3.1 Preparación del gel.

1.3.2 Preparación de la muestra y electroforesis.

1.3.3 Revelado del gel.

### **2. Peroxidasa.**

2.1 Extracción.

2.2 Actividad por espectrofotometría.

2.3 Detección de la actividad en gel de poliacrilamida no desnaturizante.

2.3.1 Preparación de la muestra y electroforesis.

2.3.2 Revelado del gel.

### **3. Superóxido dismutasa.**

3.1 Extracción.

3.2 Actividad por espectrofotometría.

3.3 Detección de la actividad en gel de poliacrilamida no desnaturizante.

3.3.1 Preparación de la muestra y electroforesis.

3.3.2 Revelado del gel.

### **4. Enfoque isoeléctrico.**

4.1 Preparación del gel.

4.2 Preparación de la muestra.

4.3 Preparación del buffer de carga.

4.4 Electroforesis.

4.5 Determinación del gradiente de pH.

**INDICE DE FIGURAS**

	PAG.
<b>Figura 1.</b> Mecanismos de defensa en plantas.....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema general de la respuesta a herida.....	5
<b>Figura 3.</b> Reacciones secuenciales para la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	14
<b>Figura 4.</b> Peroxidación de lípidos.....	17
<b>Figura 5.</b> Sistemas antioxidantes en plantas.....	19
<b>Figura 6.</b> Fruto de aguacate.....	27
<b>Figura 7.</b> Detección de ERO en fruto de aguacate.....	29
<b>Figura 8.</b> Esquema general del procedimiento realizado en este trabajo.....	34
<b>Figura 9.</b> Actividad de catalasa del mesocarpio de aguacate dañado por herida..	45
<b>Figura 10.</b> Actividad de catalasa en gel de poliacrilamida no desnaturizante...	46
<b>Figura 11.</b> Efecto del daño por herida sobre la actividad de peroxidasa.....	49
<b>Figura 12.</b> Actividad de peroxidasa en gel de poliacrilamida no desnaturizante.....	50
<b>Figura 13.</b> Enfoque isoeléctrico de peroxidasa.....	50
<b>Figura 14.</b> Efecto del daño por herida sobre la actividad de peroxidasa.....	51
<b>Figura 15.</b> Actividad de peroxidasa en gel de poliacrilamida no desnaturizante.....	51

**Figura 16.** Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en gel de poliacrilamida no desnaturalizante..... 54

**Figura 17.** Enfoque isoelectrico de SOD..... 54

**Figura 18.** Identificación de isoenzimas de SOD..... 56

**Figura 19.** Localización de SOD en células de plantas..... 64

**Figura 20.** Modelo hipotético de la modulación de la actividad de las enzimas antioxidantes en respuesta al daño por herida en tejido de fruto de aguacate.....67

## RESUMEN

En este trabajo se analizó la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa) en tejido de fruto de aguacate dañado por herida.

De acuerdo a nuestros experimentos se observó una disminución en la actividad de la catalasa a partir de los 15 minutos hasta las 72 h. La actividad de la peroxidasa incrementó a partir de las 8 h hasta las 72 h. En el mesocarpio de tejido de aguacate se encontraron 8 isoenzimas de la peroxidasa incrementándose la actividad de las peroxidasas básicas en respuesta a este estímulo. La actividad de la superóxido dismutasa disminuyó a partir de las 4 hasta las 12 h, y se detectaron 3 isoenzimas las cuales fueron identificadas como 2 de Cu-Zn SOD y 1 Mn-SOD. Estos resultados nos sugieren que las enzimas son afectadas diferencialmente en respuesta al daño por herida.

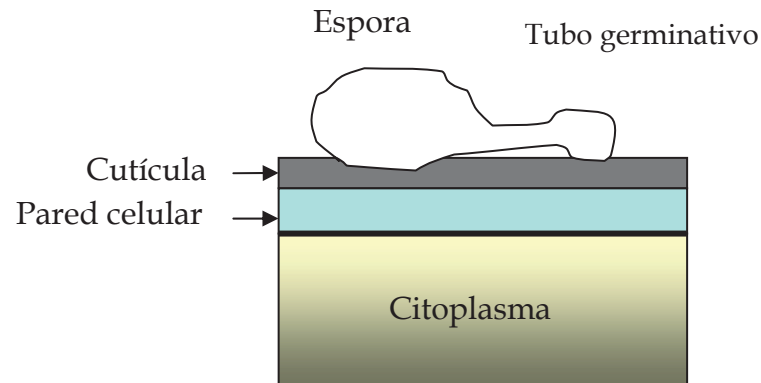
## 1. ANTECEDENTES.

### 1.1 MECANISMO DE DEFENSA EN PLANTAS.

Durante la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa efectivos contra el ataque de los microorganismos presentes en el medio ambiente a los que están constantemente expuestos. Dichos mecanismos les confieren resistencia a las enfermedades, y estos pueden ser pasivos o activos. Los mecanismos pasivos forman parte de las características de desarrollo de la planta, es decir son barreras anatómicas o químicas que impiden el establecimiento de un patógeno en el hospedero, tales como la cutícula o la pared celular (Figura 1A); mientras que los mecanismos activos requieren de la activación del metabolismo del hospedero y son inducidos después del contacto con un microorganismo invasor, por lo tanto, no son detectables en plantas sanas (Figura 1B) (Dickinson y Lucas, 1987).

Para que los mecanismos de defensa inducibles se activen de manera eficiente, es necesario que las células expuestas a un patógeno cuenten con un sistema de vigilancia capaz de reconocer una amenaza externa, una ruta de transducción de la señal y una respuesta usualmente regulada a nivel de transcripción genética por medio de la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta tales como los que participan en la síntesis de fitoalexinas, quitinasas e inhibidores de proteasas (Lamb y et al., 1989).

## A) Pasivos o constitutivos



## B) Inducibles

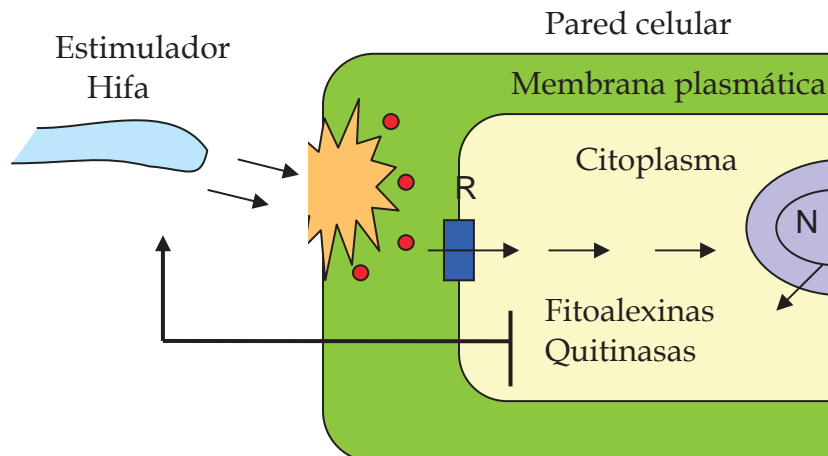


Figura 1. Mecanismos de defensa en plantas. A). Mecanismos de defensa constitutivos (constituidos por los componentes estructurales de la célula, tales como la cutícula y la pared celular). B). Mecanismos de defensa inducibles (constituidos por compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas y enzimas líticas). Los mecanismos de defensa inducibles se activan en respuesta a la producción de moléculas derivadas del patógeno o de la degradación de los componentes de la pared celular vegetal (estimuladores) como producto de la interacción entre ambos organismos. Estas moléculas son reconocidas por receptores (proteínas de resistencia) localizados en la membrana plasmática, los cuales transmiten la señal hacia el interior de la célula, activando la síntesis de enzimas involucradas en la producción de compuestos antimicrobianos. Tomado de De Wit (1992).

## 1.2 MECANISMOS DE DEFENSA EN RESPUESTA AL DAÑO POR HERIDA

Los primeros eventos detectados en respuesta al daño por herida, incluyen la activación de un péptido de 18 aminoácidos llamado sistemina, el cual tiene un receptor en la membrana plasmática. Una vez acoplados se encienden rutas de transducción de señales hacia el interior de la célula. Por un lado, se estimula la apertura de canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , cuando incrementa el calcio intracelular se activan las MAP cinasas (proteínas activadas por mitógenos) las cuales pueden tomar dos vías: una de ellas puede encender cascadas de señalización que lleguen al núcleo y la otra puede fosforilar la enzima NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana plasmática. Una vez fosforilada, utiliza como sustrato al oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) y lo convierte en anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). El  $\text{O}_2^-$  generado puede ser convertido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante la actividad de la enzima superóxido dismutasa, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado puede atravesar la membrana plasmática y en núcleo activar algunos genes de defensa o también puede reaccionar con metales tales como el  $\text{Fe}^{+2}$  para formar el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ). Por otra parte se activa la fosfolipasa A, la cual libera el ácido linolénico de la membrana plasmática hacia el citosol en donde es utilizado como sustrato por la enzima lipooxigenasa (LOX) que cataliza la oxigenación del ácido graso. Al final de esta ruta se obtiene el ácido jasmónico, el cual puede activar directamente genes de defensa tales como: proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas RP), la fenilalaninamonolioliasa (PAL) y



la chalcona sintasa (CHS) (Figura 2) (De Bruxelles y Roberts 2001). Estos procesos parecen estar conservados en todas las plantas analizadas y están asociados con la generación de señales intracelulares para activar las respuestas de defensa. Se han identificado algunos elicitores en respuesta a herida; los de mayor importancia incluyen glicanos de la pared celular tales como los oligogalacturonidos (OGAs), y en solanáceas la sistemina. Estos elicitores de respuesta a herida pueden ser señales primarias después del daño celular, o pueden funcionar para amplificar la respuesta en las hojas no dañadas (De Bruxelles y Roberts 2001).

### **1.2.1 RECEPTORES**

En las rutas de traducción de señales, el primer paso en la respuesta a una herida, puede ser la percepción de la señal por un receptor específico. A la fecha se han identificado y parcialmente caracterizado una proteína de unión a sistemina en células de tomate (Schaller y Oecking, 1999) y una fosfoproteína que une a la uridina y está asociada a la membrana (Reymond y Farmer 1998), pero su función en la señalización a herida permanece incierta. La proteína de unión a sistemina parece tener actividad de proteasa y puede estar involucrada en la degradación de la sistemina después de haber realizado su función. Sin embargo, no se ha identificado un receptor para ácido jasmónico, uno de los principales inductores de activación de genes de defensa en respuesta a herida.

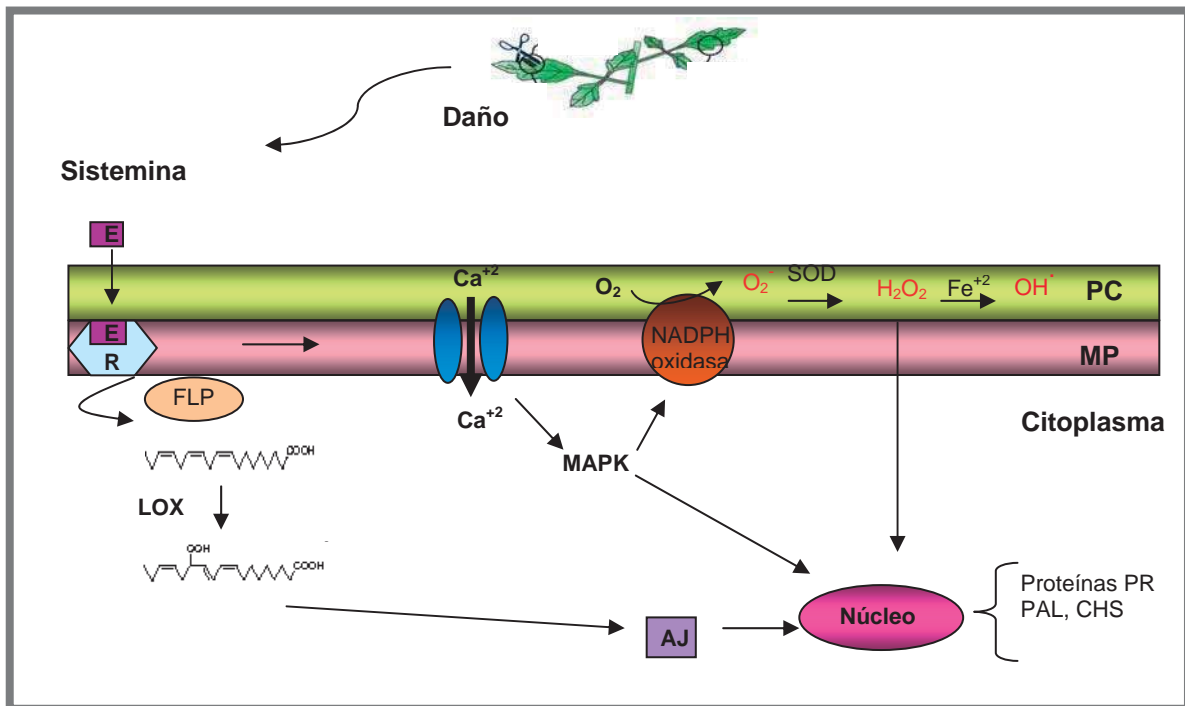


Figura 2. Esquema general de la respuesta a herida. La herida induce la activación de la expresión de genes de defensa tanto en zonas dañadas como en las no dañadas. Con flechas se indican las rutas de señalización que se activan hacia el interior de la célula hasta llegar al núcleo para activar algunos genes relacionados con la defensa. PC pared celular, MP membrana plasmática, E estimulador, R receptor, FLP fosfolipasa, AJ ácido jasmónico, LOX lipooxigenasa (Esquema modificado De Bruxelles y Roberts 2001).

### 1.2.2 ION CALCIO

El ion  $\text{Ca}^{+2}$  está involucrado en reacciones de señalización en respuesta a la herida como segundo mensajero en eucariotas. Varios estudios han mostrado un rápido incremento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplásmico después de la herida (Knight et al., 1993) o con la aplicación de estimuladores (Mathieu et al., 1991). Se ha demostrado que bloqueadores de canales de calcio, ionoforos de calcio, y agentes que movilizan  $\text{Ca}^{+2}$  de almacenes intracelulares, modulan la expresión de genes de defensa cuando son inducidos por un estimulador, lo que sugiere que tiene un papel en la señalización (Messiaen y Van Cutsem, 1994; León et al., 1998). Estas evidencias sugieren un papel para el  $\text{Ca}^{+2}$  en la señalización en respuesta al daño por herida.

### 1.2.3 FOSFORILACION DE PROTEÍNAS

Se han identificado varias proteínas cinasas que son inducidas por herida, en términos de incremento de actividad o en incremento de la expresión de genes. Las MAP cinasas son proteínas que regulan la señalización en respuesta a factores que controlan la división celular y en respuesta a estrés. La actividad de proteínas cinasas inducidas por herida se identificó por primera vez en el tabaco (Usami et al., 1995), a través de una clona de cDNA representante de un homólogo de MAP cinasa cuyo mRNA se acumula en respuesta a la herida y durante la infección por

patógenos (Seo et al., 1999). También se han identificado actividades similares de MAP cinasas que son inducidas rápidamente, pocos minutos después, de la herida en *Arabidopsis*, alfalfa y tomate (Mizoguchi et al., 1996; Bogre et al., 1997; Stratmann y Ryan, 1997).

#### 1.2.4 ÁCIDO JASMÓNICO

El ácido jasmónico (AJ) es un derivado ciclopentanona del ácido linolénico que presenta las características de una hormona en plantas (Sembdner y Partiré, 1993); sus niveles endógenos aumentan por una síntesis *de novo* cuando se produce un daño mecánico, lo cual provoca la activación transcripcional de diversos genes inducibles por herida (Creelman et al., 1992). Entre esos se encuentran genes que codifican para inhibidores de proteasas, y genes que codifican para enzimas de la vía fenilpropanoide (CHS, PAL) (Dittich et al., 1992; Creelman et al., 1992), estos últimos participan en la síntesis de fitoalexinas, los cuales son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se sintetizan y se acumulan en las plantas después de la exposición a microorganismos. Esto último establece una relación entre las repuestas de defensa por lesión y el ataque por patógenos. La aplicación de jasmonato exógeno a las plantas produce grandes cambios en la transducción, transcripción y en las poblaciones de mRNA (Sembdner y Partiré, 1993). En estudios realizados en hojas de cebada tratadas con AJ, se observó una reducción en la síntesis de las subunidades de rubisco así como de otras proteínas (Weidhase et al., 1987). También se ha demostrado que el AJ aplicado en hojas

disminuye la expresión de genes involucrados en la fotosíntesis y causa clorosis (Bunker et al., 1995), lo que sugiere que este compuesto juega un papel en la senescencia de las plantas (Ueda y kato, 1980).

El AJ también tiene diversos papeles en el desarrollo normal de las plantas, por ejemplo, en la tuberización de la papa (Pelacho y Mingo-Castel, 1991), induciendo en hojas la acumulación de proteínas de almacenamiento vegetativo que actúan como reservorios transitorios de nitrógeno en plantas (Mason y Mullet, 1990). La caracterización reciente de mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensibles a AJ o deficientes en la producción de AJ también sugiere que está implicado en la producción de polen (Feys et al., 1994). En la actualidad se conoce muy poco sobre la forma en que el JA es percibido por la célula.

### 1.2.5 ETILENO.

El etileno es una hormona que está involucrada en el desarrollo de la planta y es producida en respuesta a estrés (Kende, 1993). La producción de etileno inducido por herida es el resultado de la activación de las enzimas involucradas en su biosíntesis como la 1- aminociclopropano-1-carboxilasa sintasa (ACS) y la 1- aminociclopropano-1-carboxilasa oxidasa (ACO). Los genes que codifican para las isoformas básicas de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), son generalmente inducidos tanto por la aplicación de etileno y herida, lo cual sugiere que el etileno puede ser el mecanismo para su activación por herida (O'Donnell et al., 1996).

### **1.2.6 SEÑALES SISTEMICAS Y SU RUTA DE TRANSMISION.**

Las señales sistémicas requieren de conexiones vasculares y la amplitud de la expresión sistémica de genes está relacionada con conexiones vasculares entre el sitio herido y el sitio no dañado (Jones et al., 1993). Algunos reportes sugieren que esas señales sistémicas podrían viajar a través del floema (Rhodes et al., 1996). Los primeros estudios con la transmisión eléctrica inducida por herida sugieren que ésta puede ser la señal responsable de la expresión de genes. Además, la acumulación sistémica de inhibidores de proteasas correlaciona con la señal eléctrica (Wildon et al., 1992). Esas señales eléctricas consisten en ondas de despolarización de la membrana, las cuales se transmiten de célula a célula.

### **1.2.7 SISTEMINA, UN PEPTIDO IMPLICADO EN LA SEÑALIZACION SISTEMICA.**

La sistemina es un péptido de 18 aminoácidos que fue identificado como un factor importante en la inducción de proteinasas en hojas de tomate (Pearce et al., 1991). Desde entonces varios reportes sugieren que la sistemina es una señal sistémica móvil en heridas (Ryan y Pearce, 1998 y Ryan, 2000). La sistemina se expresa en plantas como un precursor de 200 aminoácidos conocido como prosistemina (McGurl et al., 1992). El gen de la prosistemina se expresa principalmente en las regiones vasculares de las partes aéreas de las plantas y es por si mismo inducible por herida (Jacinto et al., 1997). Su importancia y su función han sido estudiadas mediante el uso de plantas de tomate transgénicas. Plantas

transgénicas en las cuales la expresión del gen de prosistemina es suprimido vía la expresión antisentido de su mRNA las cuales exhiben una reducción sistémica significativa en la expresión del gen Pin que codifica para inhibidores de proteasas en respuesta a la herida (McGurl et al., 1992). Por otro lado, plantas transgénicas en donde se sobre expresa prosistemina bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S, se muestran altos niveles de la expresión del gen Pin a través de la planta (McGurl et al., 1994). Experimentos detallados con análogos de sistemina sintética que contenían sustituciones o deleciones de aminoácidos mostraron que se requiere el péptido completo para su actividad biológica y que algunos residuos del extremo C-terminal son importantes en la inducción de genes de defensa, y que la región N- terminal parece ser esencial para la interacción con su receptor (Meindl et al., 1998).

## **1.2.8 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).**

### **1.2.8.1 RADICAL ANION SUPERÓXIDO.**

La producción del anion superóxido ( $O_2^-$ ) en las plantas se realiza mediante una reacción que involucra a la enzima NADPH oxidasa, localizada en la membrana plasmática de las células. Por el sitio donde se genera, reacciona con facilidad con los lípidos que componen la membrana plasmática, generalmente rompiendo y generando daños irreversibles a esta estructura. Este radical puede actuar como oxidante o como agente reductor y por lo tanto puede ser capaz de

oxidar una gran variedad de moléculas orgánicas tales como: proteínas, carbohidratos y lípidos. El  $O_2^-$  se puede dismutar en  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Figura 3) (Scandalios, 2005).

#### 1.2.8.2 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es un oxidante relativamente estable, tiene una capacidad más baja que el  $O_2^-$  para reaccionar con moléculas biológicas y es capaz de cruzar las membranas celulares debido a la ausencia de carga eléctrica de su molécula (Scandalios, 2005). Se considera que la mayoría del peróxido de hidrógeno presente en una célula proviene de la dismutación del  $O_2^-$ , aunque también se puede generar por la adición directa de dos electrones al oxígeno molecular a través de algunas reacciones enzimáticas. Esta molécula se ha considerado como un metabolito celular tóxico. Sin embargo, ahora se sabe que está involucrada en la transducción de señales derivadas de estímulos tanto de origen ambiental como de origen biótico al interior de la célula.

Se ha reportado que el peróxido de hidrógeno modula la expresión de varios genes relacionados con la defensa de las plantas (Scandalios, 2005). Además, a través de reacciones de lignificación participa en el reforzamiento de la pared celular de células vegetales que han sido atacadas por patógenos o sufrido una herida. El peróxido de hidrógeno puede oxidar directamente metales de transición tales como el  $Fe^{2+}$  a través de la reacción de Fenton y producir el radical hidroxilo (Figura 3).



El peróxido de hidrógeno puede actuar como una señal local para la muerte celular y además como una señal difusible para la inducción de genes en células adyacentes (Álvarez et al., 1998). Similarmente, en plantas transgénicas de tabaco en donde se disminuyeron los niveles de antioxidantes, se observaron niveles altos constitutivos e inducibles de  $H_2O_2$  y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) junto con un incremento en la resistencia general a infecciones por patógenos (Chamnonpol et al., 1998; Mittler et al., 1999).

### **1.2.8.3 RADICAL HIDROXILO.**

El radical hidroxilo (OH) es un agente altamente oxidante (tiene alta afinidad por átomos de hidrógeno) y se genera por la adición de un electrón al peróxido de hidrógeno (Scandalios, 2005) (Figura 3). Es el derivado reactivo de oxígeno más tóxico que se produce. Tiene una vida media que no rebasa el margen de microsegundos debido a que reacciona con cualquier tipo de biomolécula cercana y por su corta existencia ha sido difícil de estudiarlo con detalle. Los ácidos grasos no saturados, de gran importancia biológica por ser los constituyentes principales de las membranas celulares, son particularmente susceptibles a la oxidación por parte del radical hidroxilo. Cuando reacciona con los lípidos de las membranas, genera degradación de los ácidos grasos, lo que repercute en la pérdida de la integridad de la membrana y, finalmente, muerte celular (Esterbauer et al., 1991).

Puesto que las especies reactivas de oxígeno reaccionan de la misma manera con cualquier tipo de biomolécula, sus efectos tóxicos sobre los microorganismos patógenos son muy importantes como mecanismos de defensa para la planta. Con el objeto de controlar la toxicidad hacia sus propios componentes, la planta ha desarrollado algunos mecanismos de destoxificación para eliminarlos cuando estos ya no sean requeridos (Foyer y Noctor, 2005).

### **1.3 LAS ERO INDUCEN LA MUERTE CELULAR EN PLANTAS.**

La muerte celular es un proceso esencial en el ciclo de vida de las plantas. Dos efectos principales han sido descritos en plantas: muerte celular programada (MCP) y necrosis. La MCP es genéticamente programada y comparte algunas características con la muerte celular apoptótica en células animales, tales como la condensación del citoplasma, la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA. La muerte celular se ha estudiado en plantas durante la respuesta hipersensible (RH), la cual es típica de una interacción incompatible planta-patógeno. Durante la RH, una explosión oxidativa coincide con la muerte celular en el sitio del ataque del patógeno. Esta muerte celular localizada limita la invasión del patógeno. La fuente de la explosión oxidativa se debe principalmente al complejo NADPH oxidasa y a las peroxidasas de la pared celular dependientes del pH (Lamb y Dixon, 1997; Bolwell y Wojtaszek 1997).

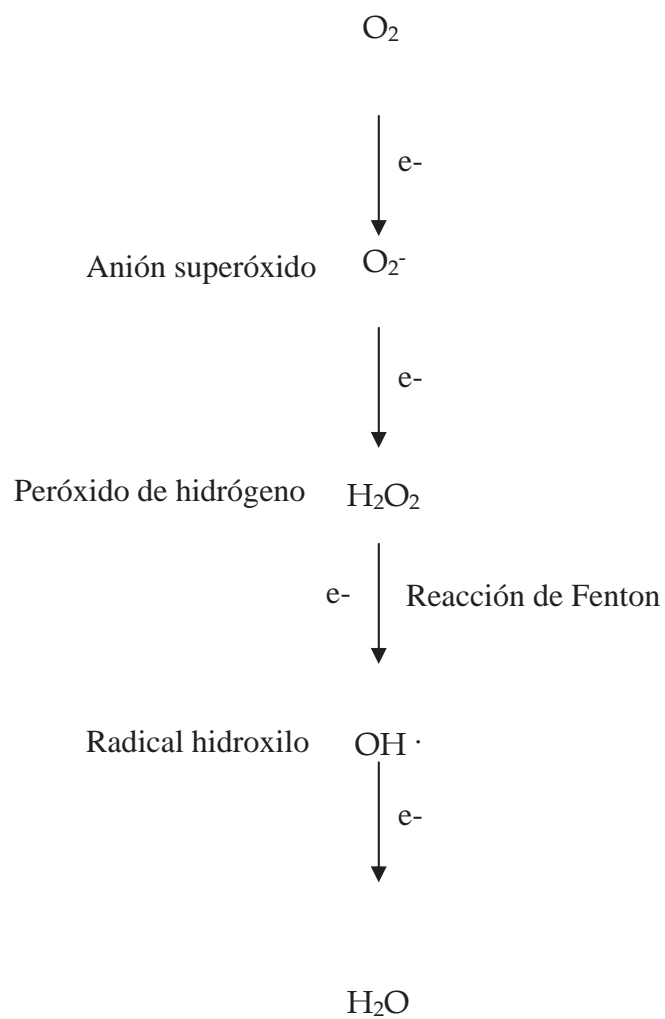


Figura 3. Reacciones secuenciales para la producción de ERO, a partir del oxígeno molecular (Scandalios, 2005).

#### 1.4 INTERACCION ENTRE ERO Y OTROS COMPONENTES DE SEÑALIZACION.

Es difícil imaginar que solamente el  $H_2O_2$  es el responsable de las diversas respuestas, mientras que una interacción con otras rutas de señalización es un escenario más realista. El etileno, el ácido salicílico (AS), el ácido jasmónico (AJ) y el óxido nítrico (ON) son otras moléculas que juegan un papel importante en la inducción de la respuesta de defensa en plantas en contra del estrés biótico y abiótico. El AS se asocia principalmente con el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (RSA), porque después de la infección de un patógeno, los niveles de AS se incrementan en hojas infectadas y no infectadas y las plantas pueden llegar a ser más resistentes a una subsecuente infección. El etileno es otra molécula señal bien establecida en cuanto a la respuesta al estrés en plantas. Recientemente, la activación específica de la biosíntesis y función del etileno se ha demostrado que se requiere para la acumulación de  $O_2^-$  y la muerte celular (Overmyer et al., 2000).

El óxido nítrico promueve la expansión de hojas, germinación de semillas, y de etiología pero además, inhibe la elongación de hipocotilos y de internodos, induce genes de defensa y producción de fitoalexinas y potencia la inducción de la muerte celular (Beligni y Lamattina, 2000).

El ácido jasmónico es una hormona involucrada en la respuesta al estrés por herida. En comparación con el etileno, el ácido salicílico tiene un efecto opuesto en

la muerte celular. El ácido jasmónico induce la síntesis de glutatión reducido (GSH), por lo tanto, limita la acumulación de las especies reactivas de oxígeno y la consecuente muerte celular (Xiang y Oliver, 1998).

## **1.5 DAÑOS CELULARES OCASIONADOS POR LAS ERO.**

### **1.5.1 PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS**

El radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) ataca a los ácidos grasos constituyentes de los triacilgliceroles o de los fosfoacilgliceroles. La interacción del radical libre va dirigida al carbono adyacente en donde se encuentra un doble enlace, ocasionando un rompimiento homolítico al sustraer el hidrógeno que forma agua al unirse al radical, mientras que el ácido graso forma un radical libre en el carbono afectado por el hidroxilo (Figura 4). Una vez que a un fosfolípido se le arrebató un electrón, éste busca estabilizar su estructura química y toma el electrón de una molécula vecina, generándose así una reacción en cadena (Buege y Aust, 1978).

Los productos de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, ésteres, y alcoholes. Este proceso repetitivo conduce a que la membrana pierda sus propiedades fisicoquímicas, lo que culmina en la muerte celular (Buege y Aust, 1978).

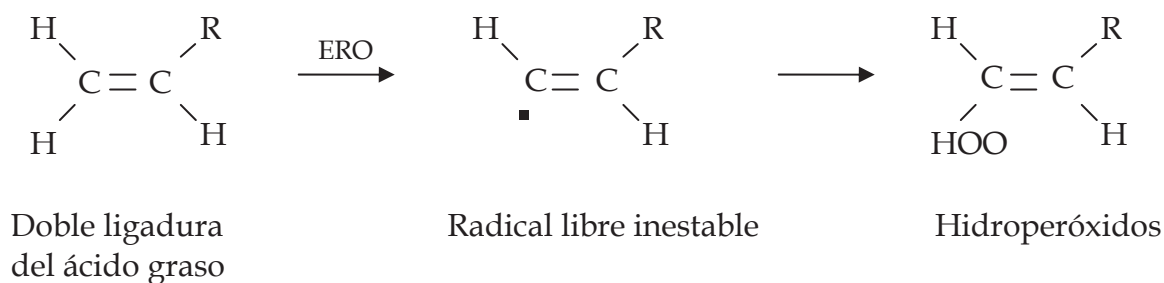


Figura 4. Peroxidación de lípidos ocasionado por las especies reactivas de oxígeno (Buege y Aust, 1978).

### 1.5.2 OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte de las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el radical hidroxilo, aunque algunas son más vulnerables que otras, como es el caso de las cadenas laterales de la tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina, metionina y la cisteína (Droge, 2002). En consecuencia, la exposición de proteínas a sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones en la estructura terciaria, que puede acompañarse de una fragmentación química, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de función biológica (Beckman y Ames, 1998).

### 1.5.3 OXIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS

La importancia biológica de los ácidos nucleicos nos obliga a considerar como un efecto de gran repercusión el que se presenten modificaciones o deleciones de las bases de la molécula de ADN causadas por la presencia de

radicales libres (Droge, 2002). A semejanza de las proteínas, parece existir una muy baja posibilidad del establecimiento de reacciones en cadena; sin embargo, el daño puede ser más significativo, aunque sea muy limitado en extensión y localización. La interacción de radicales libres con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases y ruptura de una o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, eludiendo al sistema de reparación al presentar una mutación antes de la replicación. Esto conduce a la producción de genes mutados y, por ende, de proteínas disfuncionales. Las modificaciones de las bases se deben, en gran parte a los metales de transición, fundamentalmente al ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que se encuentra unido al ADN y que, en presencia del peróxido de hidrógeno, genera hidroxilo, modifica las bases del mismo (Beckman y Ames, 1998).

## **1.6 SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN PLANTAS**

Debido a la naturaleza altamente tóxica de las ERO, sus niveles deben estar bajo un control estricto. De acuerdo con esta idea, las plantas poseen eficientes sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que evitan el daño oxidativo (Figura 5). Estos sistemas forman una unidad versátil de control de la acumulación de ERO en espacio y tiempo, como resultado de sus propiedades bioquímicas y de su inducción a nivel enzimático y genético (Alscher y Hess, 1993). Durante el estrés en plantas el incremento en la producción de ERO, puede ser resultado del incremento y/o de la expresión genética de las enzimas generadoras

(NADPH oxidasa, peroxidasa, oxalato oxidasa, etc.), desactivación y/o inhibición de la expresión de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) y decremento en componentes antioxidantes no enzimáticos (ascorbato, glutatión, etc). Por ejemplo, en el incremento del AS se ha implicado la desactivación de catalasa y ascorbato peroxidasa (Chamnongpol et al., 1998). De esta manera, dependiendo del modelo de estudio (planta, agente-estresante), la producción de ERO puede ser regulada por una o varias enzimas citosólicas y/o apoplásticas y amortiguada por uno o varios de los sistemas antioxidantes.

Enzimáticos	Superóxido dismutasa (SOD) Peroxidasa (POD) Catalasa (CAT) Glutatión reductasa (GR)
No enzimáticos	Ácido ascórbico Tocoferol Carotenoides Flavonoides

Figura 5. Sistemas antioxidantes en plantas (Alscher y Hess, 1993).



## 1.7 MECANISMOS ENZIMATICOS

### 1.7.1 CATALASA (CAT).

La catalasa (EC 1.11.1.6; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductasa; CAT) es una enzima tetramérica antioxidante que contiene el grupo hemo, y se encuentra en todos los organismos aeróbios. Las catalasas tienen una función clave en la protección de las células contra el estrés oxidativo porque realizan la siguiente reacción catalítica:

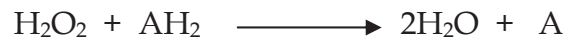


Se han reportado 74 secuencias de genes que codifican para catalasas, las cuales incluyen a 29 de bacterias, 8 fúngicas, 30 de plantas, y solamente 7 secuencias animales. En las plantas, la catalasa atrapa al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se forma durante el curso de la fotorespiración y de la oxidación de ácidos grasos. Se han encontrado múltiples isoformas de la catalasa en muchas especies de plantas, entre las que se incluyen el maíz, tabaco, calabaza, arroz, algodón y *Arabidopsis thaliana*.

La función protectora de la catalasa se ha estudiado bajo condiciones de estrés abiótico y en interacciones planta-patógeno. Los genes de la catalasa se expresan diferencialmente durante el desarrollo de la planta y también responden diferencialmente a la aplicación de los ácidos abscísico y salicílico (Rao et al., 1997).

### 1.7.2 PEROXIDASA (POD).

Las peroxididasas son enzimas que se encuentran en tejidos de animales, plantas y microorganismos, catalizan la oxidorreducción entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  y varios agentes reductores:



En plantas, la superfamilia de peroxididasas son un grupo de proteínas ubicuas, las cuales pueden ser clasificadas en base a sus dominios conservados como peroxididasas secretoras de clase III para distinguirlas de las ascorbato peroxididasas de clase I, que además se encuentran en plantas, y peroxididasas de clase II de hongos. Estas proteínas se clasifican en formas catiónicas y aniónicas en base a sus propiedades de enfoque isoelectrico, pero esto puede tener poca relevancia para su función. Se localizan en el compartimiento vacuolar y apoplástico, aunque han sido purificadas de membranas (Rodgers et al., 1993). Ejemplos de todos estos tipos pueden ser encontradas en *Arabidopsis* la cual tiene un número estimado de al menos 40 genes que codifican para estas enzimas (Ostergaard et al., 1998).

Las POD se han involucrado en la lignificación (Lewis, 1999), respuestas a heridas (Bernards et al., 1999) y ataque por patógenos, incluyendo el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular (Wojtaszek et al., 1997) y en aspectos de regulación del crecimiento de las plantas (Gazarian et al., 1988).

Aunque las peroxidasas son una familia de proteínas bien estudiadas, estas aparentemente pueden llegar a ser un subgrupo capaz de tener actividad oxidativa a pH fisiológico en adición a su actividad usual peroxidativa. Así, durante la explosión oxidativa en defensa de la planta, se ha descrito que las peroxidasas pueden oxidar un sustrato o un reductor para producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el apoplasto (Bolwell et al., 1995, Bolwell, 1996, y 1999).

La inducción de la actividad de POD en plantas ocurre en respuesta a numerosos estímulos bióticos y abióticos, incluyendo la exposición a patógenos, elicitores, agentes oxidantes químicos y estímulos mecánicos (Hammerschmidt et al., 1982). La generalidad de estas respuestas está probablemente relacionada con las funciones de POD durante el desarrollo normal de la planta y durante la inducción por elicitores bióticos y abióticos (Lagrimini y Rothstein, 1987). Por ejemplo, se cree que las POD juegan un papel en el catabolismo de auxinas, en la oxidación de fenoles para la formación de lignina, en el entrecruzamiento de glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas en la pared celular de las planta así como en la producción y descomposición del peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno (Fry, 1988, Legendre et al., 1993, Klotz y Lagrimini, 1996). Estas funciones pueden ser un factor importante en la respuesta de defensa integrada de las plantas para una variedad de estrés (Hammerschmidt et al. 1982). Los cambios bioquímicos inducidos por la perturbación mecánica en plantas son usualmente acompañados por la inhibición del crecimiento, el incremento del crecimiento radial y la reducción del área foliar, un fenómeno conocido como

“trigomorfogénesis “(Jaffe, 1973). Puesto que en células de frijol el estímulo mecánico induce inmediatamente la producción de especies reactivas de oxígeno tal como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Legendre et al., 1993, Yahraus et al., 1995), la actividad inducida de POD puede funcionar como antioxidante para librar a las células de estos compuestos tóxicos.

### 1.7.3 SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).

Las superóxido dismutasas son un grupo de metaloenzimas que catalizan la transformación de radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>.



Estas enzimas constituyen una defensa primaria de las células en contra del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, y por consiguiente reducen la proporción de especies reactivas de oxígeno en las células (Palma et al., 1986). El O<sub>2</sub><sup>-</sup> es producido donde la cadena de transporte de electrones está presente y por lo tanto, la activación del oxígeno puede ocurrir en diferentes compartimentos de la célula (Eltner, 1991), incluyendo la mitocondria, cloroplastos, microsomas, glioxisomas, peroxisomas, apoplasto y en el citosol. No es sorprendente por lo tanto que las SODs estén presentes en todos esos compartimentos de la célula. Se ha demostrado que la membrana es impermeable a moléculas con carga como el O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Takahashi y Asada, 1983), por lo

tanto, es crucial que las SODs estén presentes para remover el  $O_2^-$  en los compartimentos donde se forma (Takahashi y Asada, 1983).

Las SODs se clasifican en tres tipos distintos. De acuerdo a su cofactor metálico pueden ser de Mn, Fe o Cu-Zn. Las Fe-SOD se encuentran en cloroplastos, las SODs de Cu-Zn son las más abundantes en los organismos eucariontes y se localizan principalmente en el citosol, cloroplastos y apoplasto, y la de Mn-SOD se encuentra en las mitocondrias. En adición a su actividad normal en plantas, las SODs están también asociadas con diversos tipos de estrés. Se ha estudiado la regulación de SODs en plantas de *Nicotiana* bajo diversas condiciones de estrés ambiental y se ha reportado la presencia de ARNm que codifica para diferentes SODs (Palma et al., 1986). De acuerdo a Perl et al., (1993) la actividad de SOD en plantas debe reducir los niveles tóxicos de superóxido por transformación de este en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. El peróxido de hidrógeno resultante es atrapado por enzimas tales como la ascorbato peroxidasa, la glutatión reductasa o la catalasa que contribuyen a disminuir sus niveles.

## 1.8 MECANISMOS NO ENZIMÁTICOS.

El ácido ascórbico y el glutatión son excelentes antioxidantes que se distribuyen en grandes cantidades en toda la célula vegetal (Jiménez et al., 1998). Pueden interactuar directamente con el radical hidroxilo y el anión superóxido, respectivamente. El tocoferol y los carotenos se localizan en la región de la bicapa

de lípidos de las membranas y pueden reaccionar con el radical hidroxilo protegiéndolas de la peroxidación de lípidos, evitando un daño irreversible a su estructura (Packer et al., 2001). En adición, algunas investigaciones revelan que numerosos compuestos flavonoides pueden reaccionar con  $O_2^-$  y de la misma manera prevenir la degradación de lípidos (Arora et al., 2000).

## 2. MODELO DE ESTUDIO.

El aguacate es una fruta que pertenece a la familia de las lauráceas y a las especies *Persea gratissima* y *Persea americana* Mill. Las partes altas del Centro y Este central de México correspondiente a los estados de Nuevo León, Michoacán, Veracruz y Puebla así como Guatemala y las Antillas se han considerado como el centro de origen de esta planta (Barrientos, 1989).

Las variedades apropiadas para la producción a escala comercial se clasifican en tres grupos ecológicos o razas básicas: la raza mexicana, la guatemalteca y la antillana, a partir de las cuales se han realizado cruza inducidas e investigaciones de mejoramiento genético, principalmente en California E. U. A. donde se han obtenido una gran cantidad de variedades. De algunos híbridos importantes de las razas Mexicana-Guatemalteca se obtuvieron las variedades: Fuerte, Ettinger, Rincón, Robusta, Lula (de la Antillana-Guatemalteca), Gema y Choquette (Aguilar, 2003).

La variedad Hass, particularmente importante por su alta comercialización, se obtuvo en la Habra, Heights, California por Rudolph G. Hass entre una población de segregantes y se considera que es un producto de cruce entre la raza guatemalteca y la raza mexicana (Figura 6). Fue liberada comercialmente como variedad en 1936 (Barrientos, 1989). Esta variedad tiene forma redonda, es de cáscara rugosa y tiene más de 75% de pulpa, sin fibra, contenido de aceite de 23.7%, semilla pequeña y adherida a la cavidad, su fruta se puede mantener por algunos meses después de su madurez fisiológica (Olavarrieta, 1993).

## 2.1 DESCRIPCION BOTANICA

El aguacate es un fruto dicotiledóneo perteneciente al orden de las Ranales y a la familia de las Lauráceas. Fue clasificado por Gaetner como *Persea gratisima* y como *Persea americana* por Mill. El aguacate es un árbol que en su hábitat natural puede alcanzar de 8 a 15 m de altura; sus hojas son enteras pubescentes y rojizas cuando son jóvenes, volviéndose lisas, coriáceas y verde oscura al madurar. Las flores son hermafroditas, simétricas, agrupadas en panículas (racimos de racimos) axiales y terminales. Cada flor consta de un perigonio con dos verticilos trímeros y 12 estambres insertos debajo o alrededor del ovario. De estos estambres solo 9 son funcionales. El gineceo posee un solo pistilo, un ovario súpero (situado por encima del pedúnculo), es unilocular y con un solo óvulo. 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. La forma normal de reproducción del aguacate es por semillas (reproducción sexual), de las cuales se obtienen los patrones que luego se injertan en las variedades deseadas (Olavarrieta, 1993).

Se reconocen tres razas ecológicas (subespecies): mexicana, guatemalteca y antillana (Yahia y Báez, 1992). Las tres especies se encuentran clasificadas como subtropicales, semitropicales y tropicales, respectivamente. Las diferencias fisiológicas entre especies son de importancia comercial y se encuentran relacionadas con la temporada de maduración, tamaño del fruto, textura de la cáscara, sabor, contenido de aceite, tolerancia a las enfermedades, características de almacenamiento, adaptación al clima y tolerancia al frío por parte del árbol.



Figura 6. Fruto de aguacate (*Persea americana* Mill cv Hass)



## **2.2 DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) EN FRUTO DE AGUACATE DAÑADO POR HERIDA.**

### **2.2.1 ANIÓN SUPERÓXIDO ( $O_2^-$ ).**

En el laboratorio de bioquímica y biología molecular de plantas en un trabajo previo, se analizó la producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta al daño por herida en tejido de fruto de aguacate verde. Para la detección de anión superóxido se utilizó el reactivo NBT el cual se reduce en presencia del anión y forma un pigmento azul. Como se observa en la Figura 7A, 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 en respuesta al daño por herida, la primera a tiempos cortos (5 y 15 minutos) y la segunda a tiempos más largos (6 horas) (Castro-Mercado, 2006).

### **2.2.2 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO ( $H_2O_2$ ).**

Para el análisis de la producción de hidrógeno se utilizó el reactivo DAB (diaminobenzidina) 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 7B 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 (Fig. 6B)( Castro-Mercado, 2006).

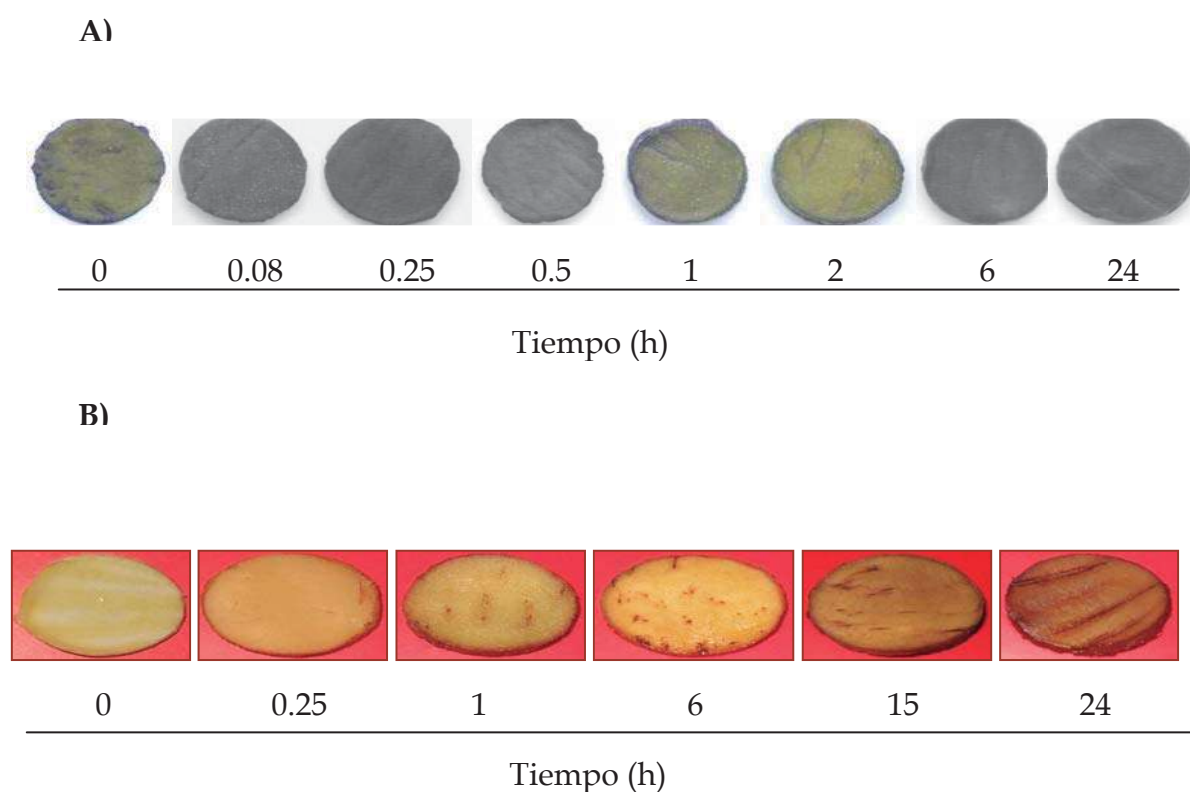


Figura 7. Detección de ERO en fruto de aguacate dañado por herida. A) Detección de  $O_2$ , se cortaron círculos de tejido de aguacate verde y fueron incubados a diferentes tiempos de 0- 24 h en una solución que contenía NBT (Nitro blue tetrazolium). El principio del método esta basado en la detección del  $O_2$  por la reducción del NBT al formarse un precipitado azul insoluble. B) Detección de  $H_2O_2$ . Se cortaron círculos de tejido de aguacate incubado a diferentes tiempos de 0-24 h en una solución que contenía DAB. El principio del método esta basado en la oxidación de DAB por el  $H_2O_2$  y como producto de la reacción se forma un precipitado café. Datos no publicados (Castro-Mercado, 2006).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en el fruto de aguacate se generan especies reactivas de oxígeno en respuesta al daño por herida, resulta interesante conocer la actividad de las enzimas antioxidantes.

#### **4. HIPÓTESIS**

El daño por herida en frutos de aguacate produce cambios en las actividades de las enzimas relacionadas con el metabolismo de especies reactivas de oxígeno.

## **5. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa en fruto de aguacate en respuesta al daño por herida.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1.- Analizar la actividad por espectrofotometría de las enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa en fruto de aguacate tratados por herida a diferentes tiempos.

2.- Analizar la actividad en gel no desnaturizante de las enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa en fruto de aguacate tratados por herida a diferentes tiempos.

3.- Analizar por enfoque isoeléctrico las enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa en frutos de aguacate tratados por herida a diferentes tiempos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Los frutos de aguacate verde (*Persea americana* Mill cv. Hass), fueron adquiridos de los mercados locales de Morelia, Michoacán.

### 6.2 REACTIVOS.

Fosfato de potasio, fosfato de sodio, citrato de sodio, cloruro de potasio, EDTA (ácido etilen diamino tetracético), riboflavina, polivinilpolipirrolidona (PVPP), NBT (de sus siglas en inglés nitro blue tetrazolium), guaiacol, diaminobenzidina, catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD), riboflavina, isopropanol, todos de la marca Sigma (St. Louis, MO, USA). Tris, glicina, glicerol, acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED, Ditiotreitól, glicerol, de la marca GibcoBRL (Grand Island, N.Y). Bradford (BIO RAD). Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% de la marca Caledon laboratories LDT (Georgetown, Ont., Canadá), persulfato de amonio, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), de la marca Promega (Grand Island, N.Y).

### 6.3 PROCEDIMIENTO GENERAL.

El tejido del mesocarpio de aguacate fue incubado a diferentes tiempos, posteriormente las muestras fueron molidas con N<sub>2</sub> líquido, después fueron centrifugadas a 4 °C y se obtuvo el sobrenadante, el cual fue utilizado para realizar el análisis por espectrofotometría, en gel nativo y por enfoque isoelectrico (Figura 8).

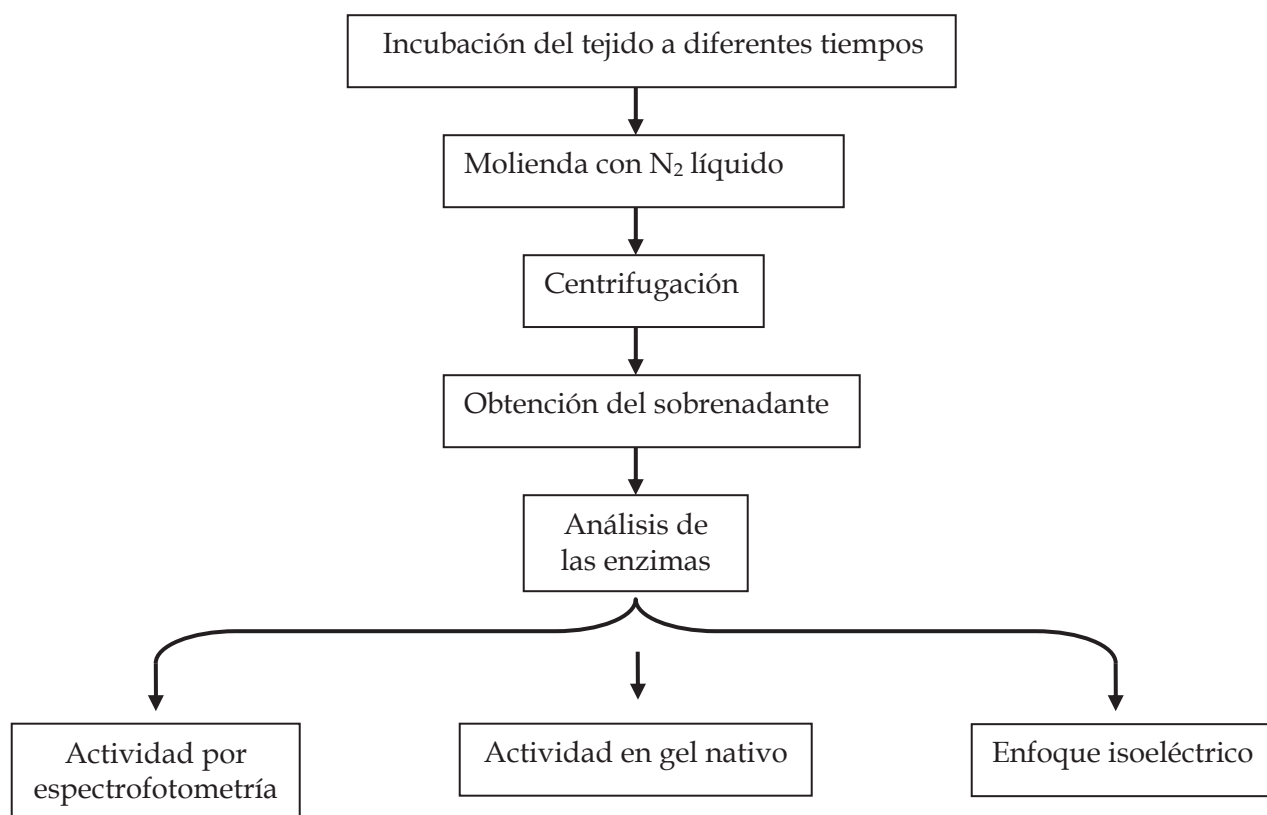


Figura 8. Esquema general del procedimiento realizado en este trabajo.

## 6.4 EXTRACCION DE ENZIMAS

### 6.4.1 CATALASA

Esta técnica se desarrolló de acuerdo al protocolo reportado por De Gara et al., (2000). Para la extracción de la enzima, 0.5 g de tejido de mesocarpio de aguacate fueron incubados a diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h) a temperatura ambiente, después las muestras se molieron en un mortero con nitrógeno líquido, y después se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de homogenización que contiene los siguientes reactivos:

Tris-HCl 50 mM, pH 7.8

Manitol 0.3 M

PMSF 1 mM

EDTA 1 mM

Posteriormente se homogenizaron con un vortex durante 20 segundos. Las muestras se centrifugaron a 10,000 g durante 30 minutos a 4 °C en una centrífuga Eppendorf modelo 5415D (NY, USA), y se recuperó el sobrenadante el cual fue utilizado para los diferentes ensayos enzimáticos.

### 6.4.2 PEROXIDASA

La extracción de la enzima se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Cipollini (1998). Se pesó 0.5 g de tejido los cuales fueron incubados a diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h), posteriormente las muestras fueron



trituradas en un mortero con nitrógeno líquido, el macerado se resuspendió en 1 ml de amortiguador de fosfato de sodio 100 mM, pH 7. Posteriormente, se homogenizaron con un vortex durante 20 segundos. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 g durante 20 minutos a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante el cual fue utilizado para los diferentes ensayos enzimáticos.

#### **6.4.3 SUPERÓXIDO DISMUTASA**

Esta enzima se extrajo de acuerdo al protocolo establecido por Gupta et al., (1993). El tejido de mesocarpio de aguacate (0.5 g) se incubó a diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h), a temperatura ambiente, posteriormente el tejido fue triturado en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, las muestras se resuspendieron en un 1 ml de amortiguador de homogenización que contiene los siguientes reactivos:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7

EDTA 0.1 mM

PVPP (p/v) al 1%

Posteriormente se homogenizó en un vortex durante 20 segundos. Para obtener la proteína soluble total, el extracto se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 g a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, el cual fue utilizado para los diferentes ensayos enzimáticos.

## 6.5 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR ESPECTROFOTOMETRÍA.

### 6.5.1 CATALASA

La medición de la actividad enzimática se realizó de acuerdo al protocolo reportado por De Gara et al., (2000) en un volumen final de 1 ml en un tubo Eppendorf, en una mezcla de reacción conteniendo lo siguiente:

10  $\mu$ l del extracto de la enzima.

630  $\mu$ l agua destilada desionizada estéril.

326  $\mu$ l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.

4  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.118 M.

La actividad se midió por una disminución en la absorvencia leída a 240 nm en un espectrofotómetro Beckman DU Serie 500 (CA, USA) durante 3 minutos a intervalos de 30 segundos. La actividad específica se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Unit/mg} = \frac{\Delta A_{240} / \text{min} \times 1000}{43.6 \times \text{mg de proteína} / \text{ml de la mezcla de reacción}}$$

El experimento se realizó por cuadruplicado. Como control se utilizó una catalasa comercial de hígado de bovino (cat.1.11.1.6). Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar.

### 6.5.2 PEROXIDASA

La actividad de peroxidasa fue analizada por la formación del tetraguaiacol (Cipollini, 1998). Cada mezcla de reacción (1 ml) consistió de 10  $\mu$ l del extracto de la enzima y 990  $\mu$ l de una solución de guaiacol que contiene lo siguiente:

Guaiacol al 0.25 %

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 6.0

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.125 %

La actividad se midió por un incremento en la absorvencia leída a 470 nm durante 3 minutos, en un intervalo de 30 segundos. La actividad específica se calculó con la siguiente fórmula:

$$v = \frac{\Delta A}{\epsilon l / \Delta t}$$

$$\epsilon = 26600 \text{ mol/cm}$$

$$l = 1 \text{ cm}$$

$$t = 3 \text{ minutos}$$

El experimento se realizó por cuadruplicado. Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar.

### 6.5.3 SUPERÓXIDO DISMUTASA

Para la medición de la actividad se mezclaron en un tubo Eppendorf los siguientes reactivos en volumen final de 1 ml (<http://www.Worthington-biochem.com>):

600  $\mu$ l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.067 M, pH 7.8

40  $\mu$ l EDTA 0.1 M

20  $\mu$ l NBT 1.5 mM

10  $\mu$ l Extracto de proteína

50  $\mu$ l Riboflavina 0.12 mM

Posteriormente, esta mezcla se expuso a una lámpara incandescente de 40 W durante 10 minutos, pasado este tiempo se midió la absorbencia a 560 nm. La actividad de la enzima fue determinada por la inhibición de la reducción del NBT. Una unidad se define como: la cantidad de enzima capaz de inhibir el 50 % de la reducción de NBT. El experimento se realizó por cuadruplicado. Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar.

## **6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los cálculos y el análisis estadístico se efectuaron con el paquete estadístico STATISTICA (Data analysis software system, statsoft Inc. Versión 6, 2001), empleando la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) para la comparación de medias.

## 6.7 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN GEL DE POLIACRILAMIDA NO DESNATURALIZANTE.

### 6.7.1 CATALASA

Una vez obtenidos los extractos, la concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976). Se aplicaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína en el gel y la electroforesis se realizó a voltaje constante (200 V) durante 8 h a 4 °C en una fuente de poder Modelo EC 105. Para detectar la actividad, el gel fue lavado rápidamente con agua destilada, desionizada y estéril, después se sumergió en un amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7, conteniendo peroxidasa (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), durante 45 minutos en agitación a temperatura ambiente, pasado este tiempo la solución fue reemplazada por el mismo amortiguador conteniendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 mM y se incubó durante 10 minutos, después se enjuagó rápidamente con agua destilada, y finalmente se sumergió en un amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  que contenía diaminobenzidina (5 mg), hasta observar las bandas acromáticas características de la actividad de la enzima. Esta técnica se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Bestwick (2001). Se tomaron fotos de los geles y estas se presentan como resultados experimentales.

### 6.7.2 PEROXIDASA

Una vez obtenidos los extractos, la concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976). Se aplicaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína en el gel y la electroforesis se realizó a voltaje constante (100 V) durante 8 horas a 4 °C en una fuente de poder Modelo EC 105. Para detectar la actividad, el gel fue sumergido en un amortiguador de citrato de sodio 50 mM, pH 5.5, durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Después, el líquido se reemplazó por el mismo amortiguador conteniendo diaminobenzidina 1 mM y 0.03 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hasta observar bandas de color café característica de la actividad de la enzima. Este procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Christense et al. (1998). Se tomaron fotos de los geles y éstas se presentan como resultados experimentales.

### 6.7.3 SUPERÓXIDO DISMUTASA

Una vez obtenidos los extractos, la concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976).

Se aplicaron 125  $\mu\text{g}$  de proteína en el gel y la electroforesis se realizó a voltaje constante (200 V) durante 8 horas a 4 °C en una fuente de poder Modelo EC 105. Para detectar la actividad el gel se sumergió en 50 ml de un amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  32 mM, pH 7.8, riboflavina 28  $\mu\text{M}$  y TEMED 28 mM durante 25 minutos en agitación, después, el líquido se reemplazó con 50 ml de una solución de

amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  36 mM, pH 7.8 conteniendo NBT 2 mM y se incubó durante 30 minutos, pasado este tiempo manteniéndose en el amortiguador, el gel fue iluminado con una lámpara de 40 W durante 15 minutos o hasta observar las bandas acromáticas características de la actividad de la enzima, después la solución se sustituyó nuevamente por un amortiguador de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  36 mM, pH 7.8, y se colocó nuevamente en la luz para continuar la reacción más lentamente. Este procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo reportado por González et al., (1998). El experimento se realizó por cuadruplicado. Se tomaron fotos de los geles y estas se presentan como resultados experimentales.

#### **6.7.3.1 IDENTIFICACION DE ISOENZIMAS DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA**

Para la identificación de las isoenzimas de la superóxido dismutasa, se utilizaron muestras de 0 h de las cuales se extrajo la enzima como se mencionó anteriormente. Los geles fueron tratados con KCN 50 mM y se incubaron a 4 °C, o con  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. El método se basó en la inhibición diferencial de la actividad de la superóxido dismutasa: el KCN inhibe la Cu-Zn SOD y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  inhibe la Cu-Zn SOD y la Fe-SOD (Bestwick, 2001). Utilizando esos mismos extractos se midió la actividad de la enzima por espectrofotometría en presencia de estos inhibidores y fue expresada en porcentaje. Se tomaron fotos de los geles y éstas se presentan como resultados experimentales.

## 6.8 ENFOQUE ISOELÉCTRICO

El enfoque isoeléctrico se realizó de la siguiente manera:

Los extractos de proteína se mezclaron en una proporción 1:1 con el buffer de carga. El buffer de carga contiene lo siguiente (5 ml):

3 ml de glicerol

200  $\mu$ l anfolina en un rango de pH de 3.5 a 9.5

1.8 ml agua destilada y desionizada estéril.

La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 g a temperatura ambiente. Para el desarrollo del enfoque isoeléctrico se adicionaron catolitos (NaOH 20 mM) en la cámara superior y anolitos ( $H_3PO_4$  10 mM) en la cámara inferior. Las condiciones de desarrollo del enfoque para la superóxido dismutasa fueron de 2.5 h a 200 V, y para la peroxidasa de 100 V, 200 V ambos durante 15 minutos y 450 V durante 60 minutos. Después de la electroforesis el gel fue revelado de manera específica para detectar la actividad de las enzimas anteriormente mencionadas. La determinación del gradiente de pH se realizó de acuerdo al "Instruction Manual BIO-RAD, Model III Mini IEF cell ( Catalog Numbers 170-2975 y 170-2976)", para lo cual se cortó una tira longitudinal del gel en rebanadas de 1 cm, las cuales fueron sumergidas por separado en 3 ml de KCl 10 mM y se incubaron durante 30 minutos, después se midió el pH a la solución de KCl. El experimento se realizó por cuadruplicado y los datos se reportaron con fotografías de los zimogramas.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 CATALASA

La actividad específica de la catalasa se midió a diferentes tiempos de estimulación por herida en fruto verde de aguacate. En un primer ensayo se observó una disminución de la actividad a partir de las 0.25 h, la disminución permaneció hasta las 24 h (Figura 9A). Se realizó un análisis de la actividad a tiempos largos para conocer el comportamiento de la actividad, la cual se mantuvo disminuida hasta las 72 h después del daño por herida (Figura 9B).

Con la finalidad de conocer el número de isoenzimas que estaban presentes en el tejido de mesocarpio de aguacate se realizó un análisis en gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas. Como resultado de este experimento se detectaron barridos en los diferentes tiempos analizados (Figura 10) y su intensidad coincidió con el análisis realizado por espectrofotometría (Figura 9B).

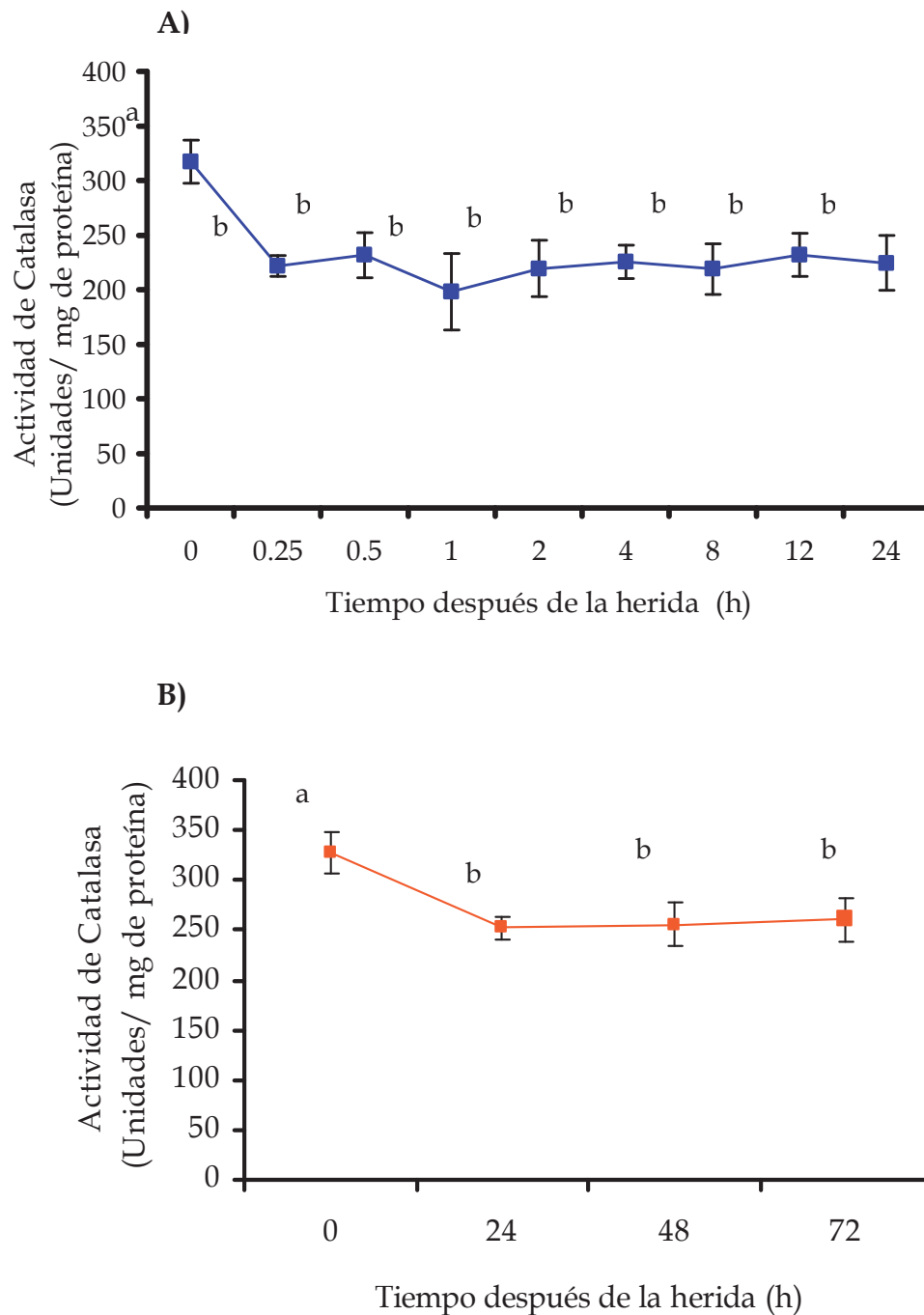


Figura 9. Actividad de catalasa del mesocarpio de aguacate dañado por herida. A). Tiempos cortos de 0-24 h. B). Tiempos largos de 0-72 h. La actividad de catalasa fue medida por el consumo de  $H_2O_2$ . Las letras iguales indican que no existe diferencia significativa y letras diferentes indican que si existe diferencia significativa. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.  $P < 0.05$ .

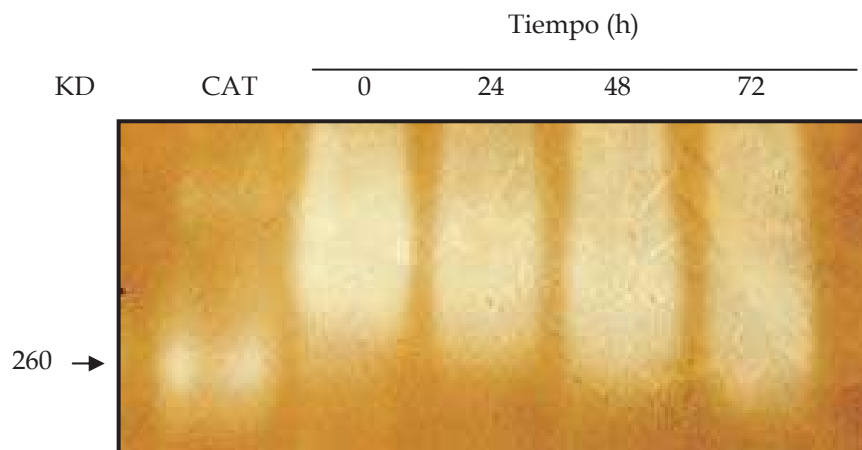


Figura 10. Actividad de catalasa en gel de poliacrilamida no desnaturizante. El tejido del mesocarpio del fruto de aguacate fue incubado a diferentes tiempos. Se aplicaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína en todos los tiempos analizados. Como control se utilizó catalasa comercial. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.

## 7.2 PEROXIDASA

Para determinar el comportamiento de la peroxidasas se midió la actividad enzimática por espectrofotometría a diferentes tiempos del daño por herida. Se observó un incremento en la actividad a partir de las 8 h hasta las 24 h (Figura 11). El análisis por espectrofotometría realizado en este experimento indica la acción combinada de las diferentes isoenzimas que pudieran estar presentes en el tejido del fruto, puesto que se ha reportado que en células de plantas existen múltiples isoenzimas de peroxidasas, por lo tanto, para conocer la composición de las diferentes isoenzimas en este fruto se realizó una separación en gel de poliacrilamida no desnaturizante y los resultados observados se describen en la Figura 12.

En esta Figura se observan 6 isoenzimas en mesocarpio de fruto de aguacate en los diferentes tiempos analizados de 0-24 h, y fueron designadas como POD 1, 2, 3, 4, 5, y 6 en orden de incremento en su movilidad. La intensidad de algunas bandas varía con respecto al tiempo de tratamiento. La intensidad de la banda de POD 6 disminuyó con respecto al tiempo de tratamiento. POD 3, 4 y 5 no mostraron cambios en su intensidad. La intensidad de POD 2 mostró un ligero incremento en relación al tiempo de tratamiento. En la banda correspondiente a POD 1 se observó un notable incremento en su intensidad partir de las 8 h hasta las 24 h (Figura 12). Este incremento en intensidad, que refleja un incremento en la actividad enzimática, y correlaciona con el incremento en la actividad observada

con el análisis espectrofotométrico. De acuerdo con los resultados observados con POD 1 es probable que esta isoenzima pudiera ser la responsable del incremento de actividad obtenido por espectrofotometría.

También se realizó un análisis por enfoque isoeléctrico para separar las isoenzimas de acuerdo a su punto isoeléctrico (Figura 13). En este análisis se detectaron 8 isoenzimas distribuidas en un rango de pH de 9.4 a 5.9, es decir, que al parecer existen 2 isoenzimas con el mismo peso molecular. Las isoenzimas que incrementaron su actividad fueron las peroxidasas básicas.

Para conocer el comportamiento de la actividad enzimática a tiempos largos, se realizaron ensayos enzimáticos hasta las 72 h de tratamiento, y se obtuvo un incremento constante de la actividad hasta el final del tiempo analizado (Figura 14), además, en el análisis en gel de poliacrilamida no desnaturizante se observó un patrón de bandeo similar a los obtenidos en tiempos cortos. Interesantemente la intensidad de la banda correspondiente a POD 1 continuó incrementándose hasta las 72 h (Figura 15), este resultado nos sugiere nuevamente que esta isoenzima podría ser la responsable del incremento de la actividad observada por espectrofotometría.

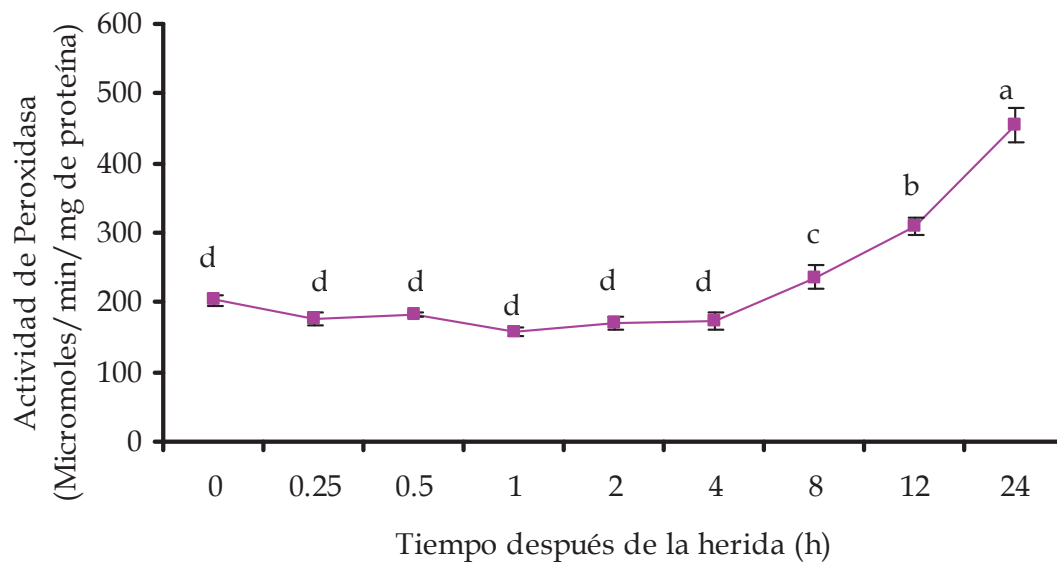


Figura 11. Efecto del daño por herida sobre la actividad de peroxidasa. El tejido fue incubado a diferentes tiempos. Las letras iguales indican que no existe diferencia significativa y letras diferentes indican que si existe diferencia significativa. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.  $P < 0.05$ .

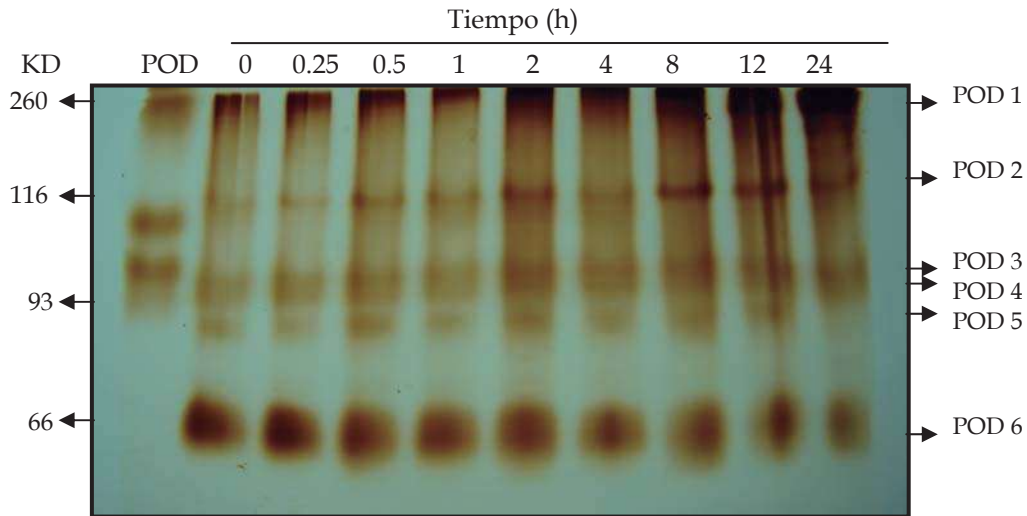


Figura 12. Gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 12 % teñido para detectar la actividad de peroxidasa. Se aplicaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína en todos los tiempos analizados. Las isoenzimas fueron numeradas en orden de incremento de su movilidad. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

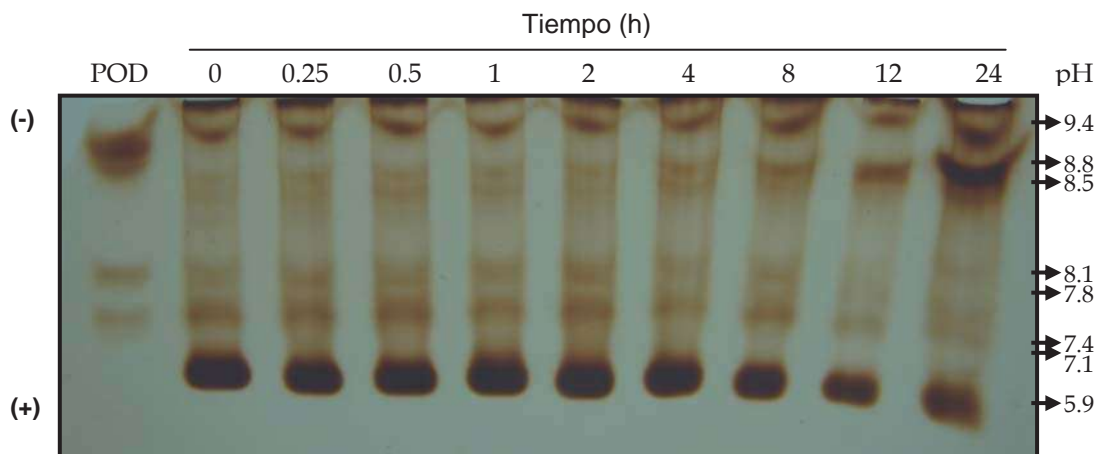


Figura 13. Enfoque isoeléctrico de peroxidasa en un rango de pH 3.5-9.5. El extracto de proteína (30  $\mu\text{g}$ ) fueron cargadas en todos los tiempos analizados. El gel fue teñido para detectar la actividad de la enzima. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

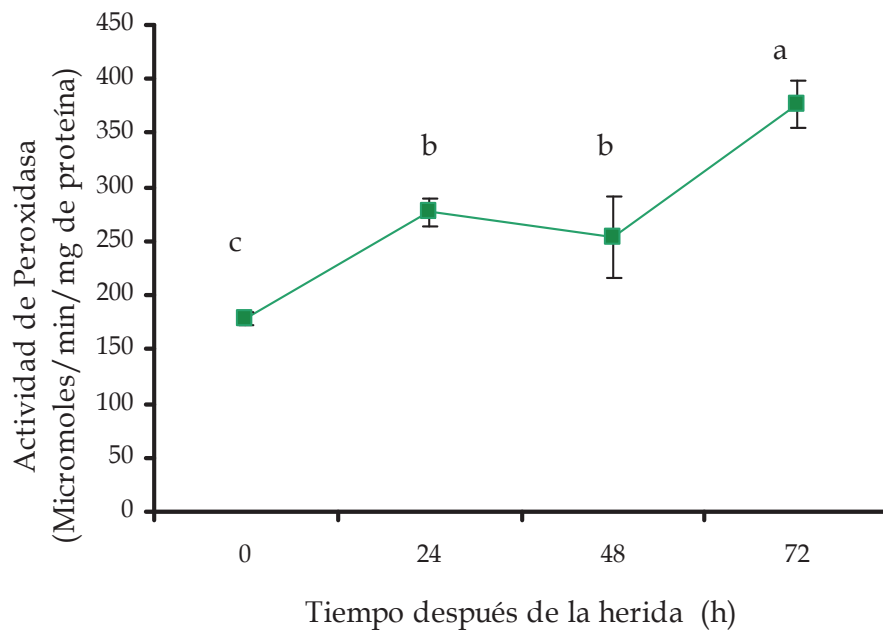


Figura 14. Efecto del daño por herida sobre la actividad de peroxidasa. El tejido fue incubado a diferentes tiempos. Las letras iguales indican que no existe diferencia significativa y letras diferentes indican que si existe diferencia significativa. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.  $P < 0.05$ .

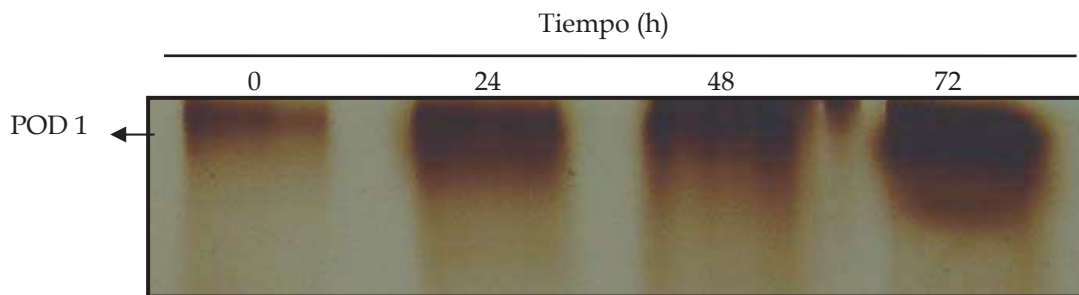


Figura 15. Gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 12% teñido para detectar la actividad de la peroxidasa, como se describió en materiales y métodos. Se aplicaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína en todos los tiempos analizados. Las isoenzimas fueron numeradas en orden de incremento de su movilidad. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.



### 7.3 SUPERÓXIDO DISMUTASA.

Se determinó la actividad de la superóxido dismutasa por espectrofotometría a diferentes tiempos (de 0-12 h) después del tratamiento con herida. En los resultados se observó una disminución de la actividad a partir de las 4 h hasta las 12 h (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad de superóxido dismutasa de mesocarpio de aguacate en respuesta al daño por herida.

Tiempo (h)	Actividad de Superóxido dismutasa		
	(%)	Unidades/ mg de prot.	
0	100	2817 ± 49.341	a
0.25	107	3017 ± 71.270	a
1	108	3057 ± 160.947	a
2	97	2747 ± 108.287	a
4	83	2512 ± 151.436	b
12	64	1061 ± 157.482	c

El tejido del mesocarpio de aguacate se incubó de 0-12 h a temperatura ambiente. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa y las letras diferentes que si existe diferencia significativa. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.  $P < 0.05$

El análisis en gel de poliacrilamida no desnaturizante mostró 3 isoenzimas designadas SOD 1, 2 y 3 en orden de incremento de su movilidad (Figura 16). Estas tres bandas se observaron a lo largo de todo el experimento y su intensidad fue diferente. La SOD 1 aparece como una banda tenue, la SOD 2 como una banda definida y la SOD 3 como una banda ancha, su tamaño en KD fue de 40, 32 y 28, respectivamente. Además, la intensidad de las bandas disminuyó de manera proporcional con respecto al tiempo de tratamiento, este efecto se observó más claramente en la SOD 1 y SOD 3. (Figura 16).

Se realizó un análisis por enfoque isoeléctrico para separar a las isoenzimas de acuerdo a su punto isoeléctrico. Se detectaron solamente 2 bandas que se nombraron como SOD 1 y SOD 2, las cuales migraron hasta un pH de 6.4 y 6.0, respectivamente, por lo tanto esto sugiere que posiblemente existen dos isoenzimas con un pI muy parecido (Figura 17).

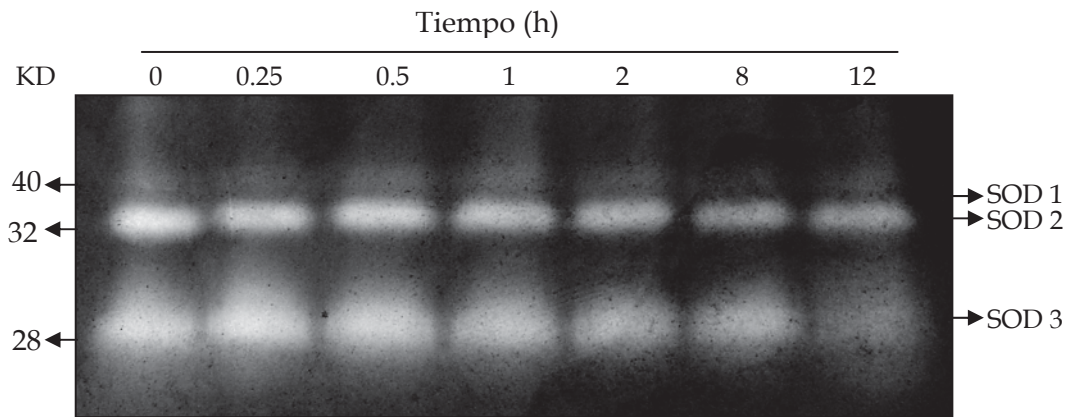


Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 12% teñido para detectar la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) de mesocarpio de fruto de aguacate dañado por herida. Se cargaron 125  $\mu$ g de proteína en todos los tiempos analizados. Las bandas acromáticas indican la actividad de la enzima y son numeradas en orden de su incremento de movilidad. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

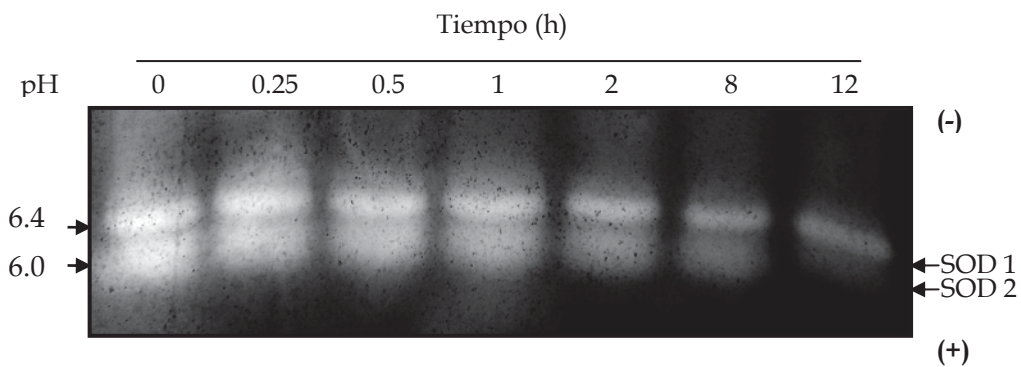


Figura 17. Enfoque isoelectrico de la superóxido dismutasa (SOD) en un rango de pH de 3.5 a 9.5. Se cargaron 60  $\mu$ g de extracto de proteína en todos los tiempos analizados. El gel fue teñido para detectar la actividad de la enzima. Los datos son representativos de tres experimentos independientes

### 7.3.1 IDENTIFICACIÓN DE ISOENZIMAS DE SUPERÓXIDO DISMUTASA.

La enzima SOD es una de los primeros mecanismos enzimáticos que utiliza la célula para destoxificar a las especies reactivas de oxígeno, por lo tanto, resultó interesante identificar a las 3 isoenzimas que se observaron con el análisis en gel no desnaturizante. Para su identificación se utilizaron extractos sin ningún tratamiento y diferentes inhibidores específicos de las diferentes isoenzimas: el KCN (50 mM) inhibe a la SOD de Cu-Zn, mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) inhibe parcialmente a las SOD de Cu-Zn SOD y Fe.

Las isoenzimas 1 y 3 fueron inhibidas con KCN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por lo tanto, fueron identificadas como SOD Cu-Zn, mientras que la isoenzima 2 fue identificada como Mn-SOD porque no mostró sensibilidad a estos inhibidores (Figura 18). Además, también se midió la actividad enzimática por espectrofotometría en presencia de estos inhibidores. En el control, la actividad de la enzima SOD fue del 100 %. Cuando la muestra fue tratada con KCN la actividad disminuyó a 54 %, mientras que en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la actividad fue del 69 %.

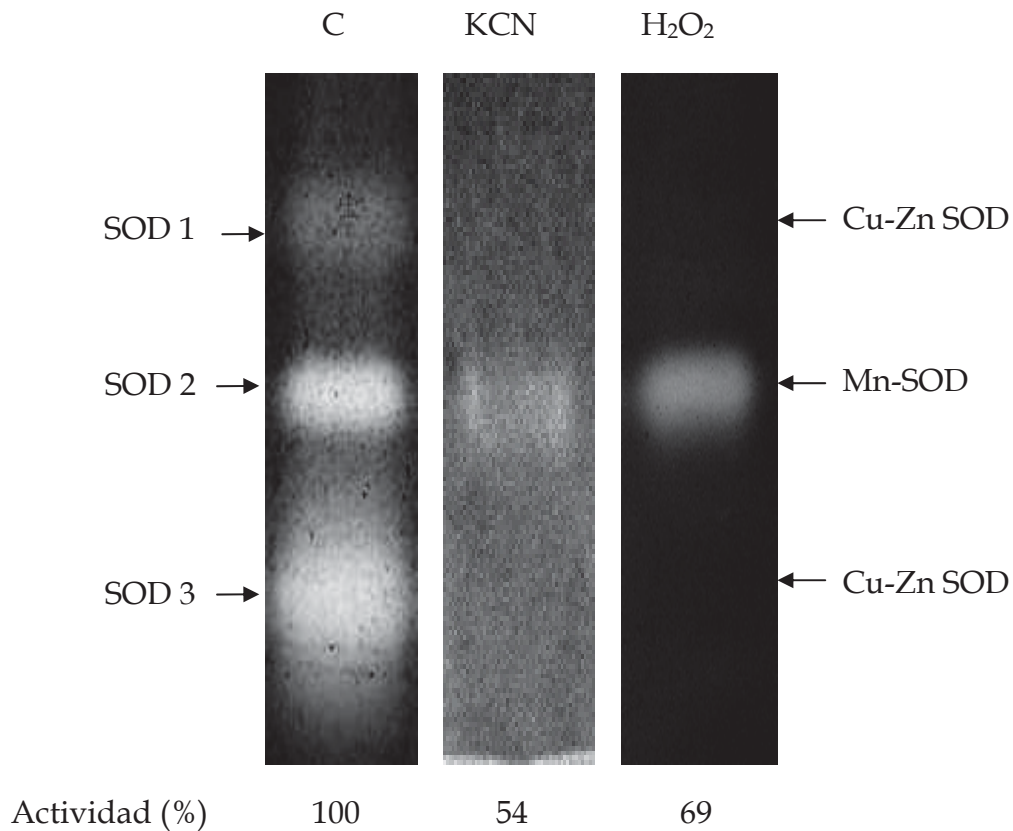


Figura 18. Identificación de isoenzimas de la superóxido dismutasa en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 12 %. Se cargó 125  $\mu$ g de extracto de proteína por línea y el gel fue teñido para detectar la actividad de la superóxido dismutasa. Las isoenzimas fueron diferenciadas en base a su sensibilidad a diferentes inhibidores. C, control; KCN (50 mM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM). En la parte inferior se muestran los datos en porcentaje de la actividad enzimática en presencia de los inhibidores. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

## 8. DISCUSIÓN.

Las plantas pueden sufrir daño mecánico por diversos estímulos físicos y conduce a una amplia variedad de respuestas celulares. Fué de nuestro interés estudiar las respuestas de las plantas ante el daño por herida porque nos permite conocer los mecanismos que han adquirido las plantas para enfrentarlo. En el laboratorio en un trabajo previo se detectó la generación de ERO ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH\cdot$ ) en respuesta a este daño (Castro-Mercado, 2006). La producción de ERO por un lado puede ser benéfico para la planta ya que le ayuda a defenderse del daño ocasionado, pero por otro lado, cuando se incrementan sus concentraciones puede existir toxicidad para la planta ya que los ERO utilizan como sustrato a biomoléculas tales como lípidos, proteínas y moléculas de ADN (Scandalios, 2005). El incremento de ERO puede ser controlado a través de cambios en la actividad de enzimas antioxidantes. Lo anterior, por lo tanto, justifica el estudio del comportamiento de la actividad de enzimas antioxidantes en fruto de aguacate dañado por herida. Además, el aguacate tiene gran importancia económica en el país, y existe muy poca información acerca de las rutas bioquímicas relacionada con la defensa.

## 8.1 CATALASA

En nuestro estudio en tejido de aguacate dañado por herida la actividad de catalasa disminuyó a partir de los 15 minutos hasta las 72 h después del tratamiento (Figura 9A y 9B). En plantas, las catalasas son enzimas tetraméricas que están involucradas en regular la acumulación de  $H_2O_2$  en la célula. Están presentes en todos los organismos aerobios y convierten el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ , así protegen a la célula de los efectos dañinos del  $H_2O_2$  (Sánchez-Casas y Klessing, 1994).

Se podría sugerir que debido a la disminución de su actividad se acumula  $H_2O_2$  en la célula. Esto es apoyado por experimentos previos realizados en el laboratorio por Castro-Mercado (2006) donde observó un incremento en la acumulación de  $H_2O_2$  con respecto al tiempo de estimulación en fruto de aguacate dañado por herida. La acumulación de  $H_2O_2$  por si mismo puede crear un ambiente antimicrobiano en el apoplasto (Peng y Kúc, 1992; Legendre et al., 1993). Además, el  $H_2O_2$  probablemente contribuye a mecanismos de señalización que conducen a la producción de fitoalexinas (Apóstol et al., 1989; Degousée et al., 1994). Medhy (1994) reportó que los tratamientos de células en suspensión con  $H_2O_2$  inducen la acumulación de mRNA que codifica para enzimas que participan en la ruta fenilpropanoide tales como: la fenilalanina amonoliasa, la chalcona isomerasa y la chalcona sintasa. Una disminución en la actividad también se

observó por Adam et al., (1995) en hojas de frijol inoculadas con *Pseudomonas syringae*. Estos investigadores observaron una disminución de la actividad a partir de las 2 h hasta las 8 h después de la infección con *Pseudomonas syringae*. Experimentos más recientes en hojas de tabaco infectadas con virus del mosaico del tabaco reportaron una disminución de la actividad de catalasa que coincide con la disminución en el nivel de su transcrito. Estos autores mencionaron que la represión del transcrito coincidió con el incremento en la acumulación del ácido salicílico (Malamy et al., 1990). Los niveles endógenos de ácido salicílico incrementan de 20 a 40 veces alrededor de la lesión en plantas de tabaco infectada con el virus del mosaico del tabaco (Malamy et al., 1990). El ácido salicílico sirve como donador de electrones para la catalasa (Durner y Klessing, 1996) para convertirlo en un intermediario oxidado inactivo (compuesto I) y un estado parcialmente reducido (compuesto II). El ácido salicílico dona un electrón al compuesto I de la catalasa, convirtiéndose el ácido salicílico en su forma oxidada. De esta forma el ácido salicílico inactiva a la catalasa por la quelación del Fe y por los cambios conformacionales ocasionados (Ruffer et al., 1995). Debido a que en plantas existen familias de catalasas fue de nuestro interés conocer las isoenzimas que estaban presentes en el tejido de mesocarpio de aguacate. El resultado de este análisis no fue exitoso, sin embargo, se detectaron barridos en todos los tiempos analizados (Figura 10). En relación a esto en otros modelos de estudio tales como en plántulas de frijol infectado con *Pseudomonas syringae* no lograron detectar las isoenzimas de catalasa (Adam et al., 1995). En cambio en tejido de hojas de



lechuga infectada con *Pseudomonas syringae* se detectaron dos isoenzimas de catalasa (Bestwick et al., 2001).

## 8.2 PEROXIDASA

Se observó un incremento en la actividad de peroxidasa a partir de las 8 h hasta las 72 h en respuesta al dañado por herida (Figura 11 y 14). Este comportamiento sugiere que la herida ocasionada en el tejido estimuló el incremento de la actividad de esta enzima y que este incremento le permitió a la célula metabolizar las especies reactivas de oxígeno que se acumulan en respuesta al daño por herida.

En plantas, las peroxidasas se agrupan en una familia de proteínas, por lo que en nuestra investigación fue de interés conocer cuántas isoenzimas estaban presentes en el mesocarpio de aguacate. Los resultados experimentales detectaron 6 isoenzimas y la intensidad de la banda de algunas de ellas varía con respecto al tiempo de estimulación (Figura 12). La banda de actividad de la POD 1 fue más intensa, este resultado demuestra que POD 1 es inducida en respuesta al daño por herida.

Se ha reportado que el incremento de la actividad de peroxidasa se debe a la síntesis de *novo* de la proteína más que por la activación de la enzima (Lagrimini y Rothstein, 1987). Además, son codificadas por una gran familia de genes. En *Arabidopsis* más de 100 secuencias expresadas codifican para diferentes isoenzimas

(Hiraga et al., 2001). Las peroxidasas están involucradas en múltiples procesos fisiológicos. Lagrimini y Rothstein (1987) reportaron que en tabaco existen diferencias en el patrón de isoenzimas en órganos específicos; también encontraron 13 isoenzimas en raíz, 5 en hojas y 8 en callo y éstas variaron con el tipo de estrés ocasionado. En arroz, los genes de *pox* responden diferencialmente a la infección por patógenos y al daño por herida, el patrón de expresión fue de 21 genes, los cuales fueron altamente divergentes con respecto a su distribución en órganos y la respuesta al estímulo ambiental (Hiraga et al., 2001).

En el análisis por enfoque isoeléctrico las peroxidasas básicas de pI de 8.8 y 8.5 mostró una expresión predominante (Figura 13). Estos resultados nos sugieren que las peroxidasas básicas son fuertemente inducidas en respuesta al daño por herida en fruto de aguacate. Se ha sugerido que las peroxidasa básicas están involucradas en la polimerización de compuestos fenólicos (Holm et al., 2003). El teñimiento histoquímico de la lignina mostró un incremento del área lignificada a través del tiempo. La actividad de peroxidasa y el peróxido de hidrógeno se localizaron en las mismas células que la lignificación. Estos resultados mostraron una co-localización de zonas lignificadas, actividad de peroxidasa y  $H_2O_2$ , lo que sugiere que el  $H_2O_2$  y las peroxidasas son requeridas para la polimerización (Holm et al., 2003). Además, éstas han sido propuestas como candidatas a catalizar el último paso en la polimerización de monolignoles como p-coumaroil alcohol, coniferil alcohol, 5-hidroxiconiferil alcohol y sinafil alcohol (Campbell y Sederoff 1996; Hatfield y Vermerris, 2001). La acumulación de esas macromoléculas

refuerzan la pared celular, por lo tanto, restringen la expansión celular, la difusión de nutrientes del hospedero, las toxinas microbianas, la invasión de patógenos oportunistas y le confiere reforzamiento al cuerpo de la planta (Hiraga et al., 2001).

### 8.3 SUPERÓXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa es una enzima que utiliza como sustrato el  $O_2^-$  y como producto se genera  $H_2O_2$ . En este estudio se investigó la actividad de esta enzima en respuesta al daño por herida. En el análisis de la actividad de la superóxido dismutasa se observó una disminución a partir de las 4 h hasta las 12 h (Tabla 1).

El patrón de isoenzimas reveló que existen 3 isoenzimas en el mesocarpio de tejido de aguacate dañado por herida (Figura 16). En este mismo análisis también se observó la disminución de la intensidad de las 3 bandas a partir de las 4 h después del tratamiento (Figura 16), observándose este efecto de manera más claro en la SOD 1 y la SOD 3. Se ha reportado que el  $H_2O_2$  inactiva a esta enzima (Casano et al., 1997), por lo tanto, es posible que la disminución de la actividad observada en este estudio se deba a la acumulación de  $H_2O_2$ , la cual se demostró por Castro-Mercado (2006), como respuesta al mismo tratamiento utilizado en este trabajo.

En células animales la Cu-Zn SOD es inactivada y degradada por la acción combinada de proteasas y las especies reactivas de oxígeno, las cuales hidrolizan

proteínas por daño oxidativo (Salo et al., 1990, Strack et al., 1996). Además, en plantas de trigo también se reportó que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  inhibe la Cu-Zn SOD (Casano et al., 1997). El posible mecanismo mediante el cual el  $\text{H}_2\text{O}_2$  inhibe a la Cu-Zn SOD se describe continuación: el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reducir el  $\text{Cu}^{+2}$  que está unido a la enzima a  $\text{Cu}^+$ , el cual puede formar  $\text{Cu}^{+2}$  y la formación del radical  $\text{OH}\cdot$ , al adicionarle  $\text{H}_2\text{O}_2$ . *in situ*, el  $\text{OH}\cdot$  puede inactivar completamente a la enzima por modificaciones oxidativas de residuos de histidina que se encuentran en el sitio activo (Hodgson y Fridovich 1975). Este mecanismo podría explicar la disminución de la actividad de las isoenzimas SOD 1 y 3 que se observa en la Figura 15. En el análisis por enfoque isoeléctrico se detectaron claramente 2 isoenzimas con pl de 6.4 y 6.0 (Figura 17). Este resultado nos indica que posiblemente existen 2 isoenzimas con un pl muy parecido. La identificación de las isoenzimas por su sensibilidad a KCN y a  $\text{H}_2\text{O}_2$  reveló que la SOD 1 y la 3 fueron identificadas como Cu-Zn SOD y SOD 2 como Mn-SOD (Figura 18).

De acuerdo a su presencia en distintos órganos, Pitcher et al., (1992) reportaron la presencia de 1 Mn-SOD y 2 Cu-Zn SOD en las segundas hojas trifoliadas de frijol, mientras que Buonario et al., (1987) reportó la presencia de dos Cu-Zn SOD y dos Mn-SOD en hojas primarias de frijol. Aunque nosotros no detectamos actividad de Fe-SOD, tal isoenzima ha sido reportada en *Phaseolus* (Kwiatowski y Kaniuga, 1984). Estos autores mencionaron que la diferencia de composición de las

isoenzimas observadas probablemente refleja la variación entre cultivares y/o el estado de desarrollo en el cual las hojas fueron examinadas.

Las isoenzimas de SOD se pueden distribuir en diferentes compartimentos de la célula, y pueden remover el  $O_2^-$  en su sitio de generación, y de esta manera minimizar el daño de los componentes celulares (Figura 19) (Alscher et al., 2002). De acuerdo con este esquema las isoenzimas que se encontraron en el mesocarpio de tejido de aguacate posiblemente se distribuyen de la siguiente manera: la Mn-SOD puede ser localizada en mitocondria y las 2 isoenzimas de Cu-Zn SOD pueden ser localizadas en el apoplasto, en el citosol o en los cloroplastos.

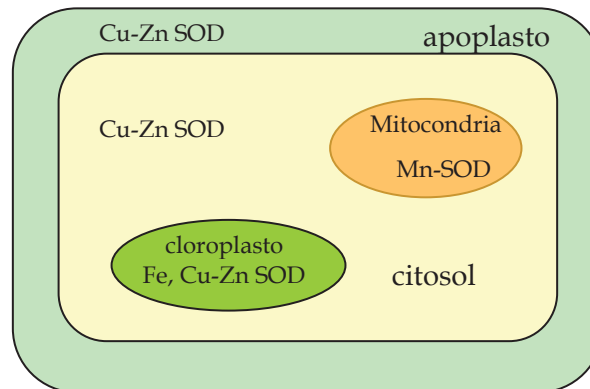


Figura 19. Localización de superóxido dismutasa en células de plantas. Tomado de Alscher et al., (2002).

## 9. MODELO PROPUESTO

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio se propone el siguiente modelo hipotético para integrar dichos resultados.

Cuando el fruto de aguacate es dañado por herida es posible que se active algún estimulador que tiene un receptor en la membrana plasmática y una vez acoplados se encienden rutas de señalización hacia el interior de la célula. Por un lado, se estimula la apertura de canales de calcio, cuando incrementan las concentraciones de calcio intracelular se activan las MAP cinasas las cuales por un lado pueden encender cascadas de señalización que llegan al núcleo para activar algunos genes de defensa, por otra parte pueden fosforilar a la NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana plasmática, una vez fosforilada oxida al  $O_2$  convirtiéndolo en  $O_2^-$ , este es a su vez convertido a peróxido de hidrógeno mediante la actividad de la superóxido dismutasa.

En nuestro estudio se analizó la actividad de la superóxido dismutasa la cual disminuye con respecto al tiempo de estimulación. Dicho efecto posiblemente se debió al incremento de peróxido de hidrógeno debido a que algunas isoenzimas son sensibles a dicha especie reactiva. Por otra parte, cuando se incrementan las concentraciones del peróxido de hidrógeno más la presencia de agentes reductores, se incrementa la actividad de las peroxidases y como producto se obtiene el agente reductor oxidado estimulando la polimerización de monolignoles para obtener

finalmente la lignina, que sirve para sellar la herida evitando la invasión de patógenos oportunistas.

Por otro lado, el daño ocasionado por herida también podría activar otra ruta de señalización que podría activar la fosfolipasa A que libera el ácido linolénico de la membrana plasmática hacia el citosol en donde es utilizado como sustrato por las lipooxigenasa, obteniéndose como producto el ácido graso oxigenado el cual puede ser utilizado como sustrato por otras enzimas hasta finalmente obtener el ácido jasmónico que puede directamente activar genes de defensa o puede activar la ruta fenilpropanoide en donde a partir de la fenilalanina mediante la actividad de fenilalaninamonioliasa se obtiene el ácido cinámico, precursor de donde se sintetiza el ácido salicílico, el cual puede unirse a la enzima catalasa bloqueando el sitio activo ocasionando la disminución de la actividad, por lo tanto, se incrementan las concentraciones del peróxido de hidrógeno, el cual sale de los peroxisomas para activar genes de defensa tales como inhibidores de proteasas proteínas relacionadas con la patogénesis o enzimas que participan en la ruta fenilpropanoide tales como PAL, y CHS (Figura 20).

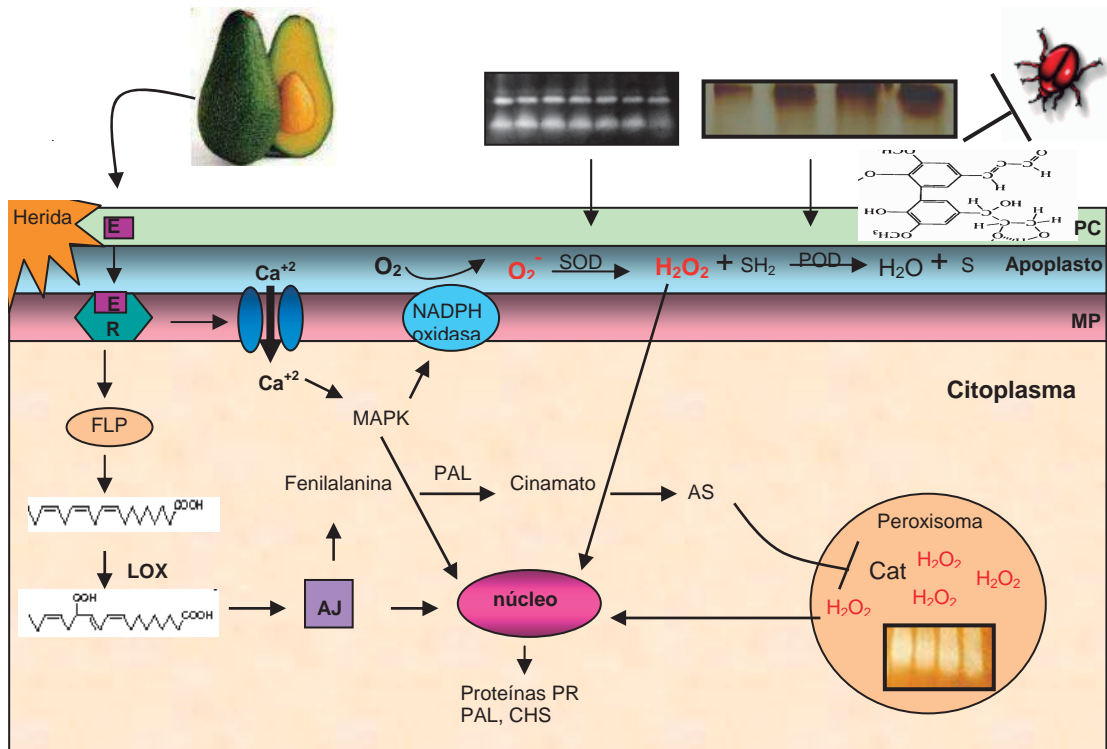


Figura 20. Modelo hipotético de la modulación de la actividad de las enzimas antioxidantes en respuesta al daño por herida en tejido de fruto de aguacate. Las flechas indican las posibles cascadas de señalización que se encienden en respuesta al daño ocasionado.



## 10. CONCLUSIÓN

La actividad de enzimas antioxidantes analizadas en este trabajo se modifican (CAT y SOD disminuyen y POD incrementa) en respuesta al daño por herida en frutos de aguacate.

---

## 11. LITERATURA CITADA

**Adam LA, Bestwick CS, Barna B y Mansfield JW. 1995.** Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Planta* 197: 240-249.

**Aguilar CC. 2003.** Sistema Nacional de Innovación: una aproximación teórica para la agricultura: El caso de cultivo de aguacate en Michoacán. TEMAS Universidad Tecnológica de la Mixteca. pp. 29-40.

**Alscher GR y Hess JL. 1993.** Antioxidants in higher plants. Boca Raton: CRC Press.

**Alscher GR, Erturk N y Heath SL. 2002.** Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Experim. Bot.* 53: 1331-1341.

**Álvarez ME, Penell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA y Lamb C. 1998.** Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784.

**Apóstol I, Heisntein PF y Low PS. 1989.** Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cell. Role in defense and signal transduction. *Plant. Physiol.* 90: 109-116.

**Arora A, Byrem TM, Nair MG y Strasburg GM. 2000.** Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. of Biochem. Biophys.* 373: 102-109.

**Barrientos F. 1989.** Origen y taxonomía de cultivares, requerimiento ecológico, y variabilidad genética en aspectos fitosanitarios del aguacate, UACH, México. pp. 669-682.

**Beckman KB y Ames BN. 1998.** The free radical theory of ageing matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581.

**Beligni MV y Lamattina L. 2000.** Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation and inhibits hypocotyls elongation three light-inducible responses in plants. *Planta* 10: 215-221.

**Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A y Flourde GL. 1999.** Biochemical characterisation of the suberisation -associated anionic peroxidase of potato. *Plant. Physiol.* 121: 135-146

**Bestwick SC, Adam LA, Puri N y Mansfield WJ. 2001.** Characterisation of and changes to pro- and anti-oxidant enzyme activities during the hypersensitive reaction in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant. Sci.* 161: 497- 506.

**Bogre L, Ligterink W, Meskiene I, Barker PJ, Heberle- Bors E, Huskisson NS y Hirt H. 1997.** Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant. Cell* 9: 75-83.

**Bolwell GP, Butt VS, Davies DR y Zimmerlin A. 1995.** The origin of the oxidative burst in plant. *Free Radic. Res.* 23: 517-532.

**Bolwell GP. 1996.** The origin of the oxidative burst in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 438-442

**Bolwell GP y Wojtaszek P. 1997.** Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 51: 347-366.

**Bolwell GP. 1999.** Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 287-294.

**Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248- 254.

**Buege JA y Aust SD. 1978.** Microsomal lipid peroxidation. *Method. Enzymol.* 52: 302-310.

**Bunker WT, Koetje SD, Stephenson LC, Creelman AR, Mollet JE y Grimes DH. 1995.** Sink limitation induces the expresión of multiple soybean vegetative lipoxigenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. *Plant. Cell* 7: 1319

**Buonario R, Della TG y Montalbini P. 1987.** Soluble superoxide dismutase (SOD) in susceptible and resistant host-parasite complexes of *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 31: 173-184.

**Campbell MM y Sederoff RR. 1996.** Variation in lignin content and composition; mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant. Physiol.* 110: 3-13.

**Casano ML, Gómez DL, Lascano RH, Gonzáles AC y Trippi SV. 1997.** Inactivation and degradation of Cu-Zn SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant. Cell Physiol.* 38: 433-440.

**Castro-Mercado E. 2006.** Producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta al daño por herida en frutos de aguacate (*Persea americana* Mill cv Hass. Tesis de Maestría.

**Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sardemann H. Van Montagu M, Inze D y Van Camp W. 1998.** Defence activation and enhance pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5818-5823.

**Christensen HJ, Bauw G, Welinder GK, Montagu VM y Boerjan W. 1998.** Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar Xylem. *Plant. Physiol.* 118: 125-135.

**Cipollini FD. 1998.** The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. *Am. J. Bot.* 85: 1586-1591.

**Creelman RA, Tierney ML y 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.

**De Bruxelles LG y Roberts RM. 2001.** Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 5: 487-521.

**De Gara L, Paciolla, De Tullio CM, Motto M y Arrigoni O. 2000.** Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive Maite hybrid: Evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Plant. Physiol.* 109: 7-13.

**Degoussée N, Triantaphylides C y Montillet JC. 1994.** Involvement of oxidative processes in the signalling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glicine max*). *Plant. Physiol.* 104: 945-952.

**De Wit PJGM. 1992.** Molecular characterization of gene for gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in the control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 391-418.

**Dickinson CH y Lucas AJ. 1987.** Patología vegetal y patógenos de plantas. Ed. Limusa. pp. 47-53.

**Dittich H, Kutcahn TM y Zenk MH. 1992.** Molecular cloning expression and induction of berberine bridge enzyme on enzyme essential to the formation of benzophenanthridene alkaloids in the response of plants to pathogenic attack. *FEBS Lett.* 309: 33-36.

**Droge W. 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.

**Durner J y Klessing DF. 1996.** Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chem.* 272: 28492-28501.

**Elstner EF. 1991.** Mechanisms oxygen activation in different compartment of plant cells. In Pell ej. Steffen KL, eds. *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism.* Rockville, MD: Ame. Soc. Plant. Physiol. 8: 13-25.

**Esterbauer H, Schaur RJ y Zollner H. 1991.** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11: 81-128.

**Feys BJB, Benedetti CE, Penfold CN y Turner JG. 1994.** Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate and resistant to a bacterial pathogen. *Plant. Cell* 6: 751-759.

**Foyer HC y Noctor G. 2005.** Oxidant and antioxidant signalling in plants: re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context- *Plant. Cell Environ.* 28: 1056-1071.

**Fry SC. 1988.** The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman Scientific Technical. Essex, UK.

**Gazarian IG, Lagrimini LM, Mellon FA, Naldrett MJ, Ashby GA y Thorneley RN. 1988.** Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl-acetic acid. *Biochem. J.* 333: 223-232.

**Gonzales A, Steffen LK y Lynch PJ. 1998.** Light and excess manganese. Implications for oxidative stress in common bean. *Plant. Physiol.* 118: 493-504

**Gupta SA, Webb PR, Holaday SA y Allen DR. 1993.** Overexpression of superoxide dismutase protected plants from oxidative stress. *Plant. Physiol.* 103: 1067-1073.

**Hammerschmidt R, Nuckles EM y Kuc J. 1982.** Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant. Pathol.* 20: 73-82.

**Hatfield R y Vermerris W. 2001.** Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant. Physiol.* 126: 1351-1357.

**Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y y Matsui H. 2001.** A large family of class III plant peroxidase. *Plant. Cell Physiol.* 42: 462-468.

**Hodgson EK y Fridovich I. 1975.** The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation de enzyme. *Biochemistry* 14: 5294-5299.

**Holm BK, Andreasen HP, Eckloff GMR, Kristensen y Rasmussen KS. 2003.** Three differentially expressed basic peroxidases from wound-lignifying *Asparagus officinalis*. *J. Experim. Bot.* 54: 2275-2284.

<http://www.Worthington-biochem.com>.

**Intruction Manual BIORAD.** Model III mini IEF cell (Catalog Numbers 170-2975 y 170-2976) pp. 5-11.

**Jacinto T, McGurl B, Franceschi V, Delano-Freier J y Ryan CA. 1997.** Tomato prosystemin promoter confers wound-inducible vascular bundle-specific expresión of the  $\beta$ -galacturonidase gene in transgenic tomato plants. *Planta* 203: 406-412.

**Jaffe MJ. 1973.** Trigomorphogenesis: the response of plant growth and development to mechanical stimulation. Whit special reference to *Bryonia dioica*. *Planta* 114: 143-157.

**Jones CG, Hopper RF, Coleman JS y Krischik VA. 1993.** Control of systemically induced herbivore resistance by plant vascular architecture. *Oecologia* 93: 452-456.

**Jiménez A, Hernández JA, Pastori G, Del Rio LA y Sevilla F. 1998.** Role of the ascorbate -glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant. Physiol.* 118: 1327-1335.

**Kende H. 1993.** Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 44: 283-307.

**Klotz KL y Lagimini LM. 1996.** Phytohormone control of the tobacco anionic peroxidase promoter. *Plant. Mol. Biol.* 31: 565-573.

**Knight MR, Read ND, Campbell AK y Trewavas AJ. 1993.** Imaging calcium dynamics in living plants using semisynthetic recombinant aequorins. *J. Cell Biol.* 121: 83-90.

**Kwiatowski J y Kaniuga Z. 1984.** Evidence of iron-containing superoxide dismutase in leaves of *Lycopersicon esculentum* and *Phaseolus vulgaris*. *Plant. Physiol.* 6: 197-202

**Lagrimini ML y Rothstein S. 1987.** Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant. Physiol.* 8: 438-442.

**Lamb C y Dixon RA. 1997.** The oxidative burst in plants disease resistance. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48: 251-275.

**Lamb CJ, Lawton MA, Dron M y Dixon RA. 1989.** Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack. *Cell* 56: 215-224.

**Legendre L, Rueter S, Heinstejn PF y Low PS. 1993.** Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells *Plant. Physiol.* 102: 233-240.

**Léon J, Rojo E, Titarenko E y Sánchez-Serrano JJ. 1998.** Jasmonic acid-dependent and independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 259: 516-522.

**Lewis NG. 1999.** A 20<sup>th</sup> century roller coaster ride: a short account of lignification. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2: 153-162.

**Malamy J, Carr JP, Klessing DF y Raskin I. 1990.** Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.

**Mason HS y Mullet JE. 1990.** Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding , and jasmonic acid. *Plant. Cell* 2: 569-579.

**McGurl B, Pearce G, Orozco-Cárdenas M y Ryan CA. 1992.** Structure, expresión and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Sci.* 255: 1570-1573.

**McGurl B, Orozco-Cárdenas M, Pearce G y Ryan CA. 1994.** Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 9799-9802.

**Medhy MC. 1994.** Active oxygen species in plant defence against pathogens. *Plant. Physiol.* 105: 467-472.

**Meindl T, Boller T y Felix G. 1998.** The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant. Cell* 10: 1561-1570.

**Messiaen J y Van Cutsem P. 1994.** Peptic signals transduction in carrot cell membrane cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant. Cell Physiol.* 35:677-689.

**Mittler R, Herr EH, Orvar BL, Vancamp W, Willekens H, Inze D y Ellis BE. 1999.** Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 14165-14170.

**Mizoguchi T, Irei K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K y Shinozaki K. 1996.** A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 765-769.

**O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wastermack C, Leyser HMO y Bowles DJ. 1996.** Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917.

**Olavarrieta C. 1993.** Entrevista al Director del Centro de Investigaciones Científicas y tecnológicas sobre el Aguacate en el estado de México, en conservas, año 3, núm.6, México, pp. 16-19

**Ostergaard L, Pedersen AG, Jespersen HM, Brunak S y Welinder KG. 1998.** Computational analyses and annotations of the *Arabidopsis* peroxidase gene family. *FEBS Lett.* 433: 98-102.



**Overmyer HK, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebarlest C y Sandermann H. 2000.** Ozone-sensitive *Arabidopsis rcdl* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathway in regulating superoxide - dependent cell death. *Plant. Cell* 12: 1849-1862.

**Palma JM, Sandalio LM y Del Rio LA. 1986.** Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplast: a reappraisal of a controversial cellular localization. *J. Plant. Physiol.* 125: 427-439.

**Packer L, Weber SU y Rimbach G. 2001.** Molecular aspects of  $\alpha$ -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J. Nutrit.* 131: 369S- 373S.

**Pearce G, Strydom D, Johnson S y Ryan CA. 1991.** A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.

**Pelacho AM, y Mingo-Castel AM 1991.** Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured in vitro. *Plant. Physiol.* 97: 1253-1255.

**Peng M y Kúc J. 1992.** Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopatol.* 82: 696-699.

**Perl A, Perl-Treves R, Galili S, Aviv D, Shalgi E, Malkin S y Galun E. 1993.** Enhanced oxidative stress defence in transgenic potato expressing tomato Cu-Zn superoxide dismutase. *Theoretical and Applied Genetic.* 85: 568-576.

**Pitcher CH, Brennan E y Zilinskas BA. 1992.** The antioxidant ethylene diurea does not act via superoxide dismutase induction in bean. *Plant. Physiol.* 99: 1388-92

**Rao VM, Paliyath G, Ormrod PD, Murr PD y Watkins BC. 1997.** Influence of salicylic acid on  $H_2O_2$  production oxidative stress and  $H_2O_2$ - metabolizing enzymes. *Plant. Physiol.* 115: 137-149.

**Reymond P y Farmer EE. 1998.** Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1: 404-411.

**Rhodes JD, Thain JF y Wildon DC. 1996.** The pathway for systemic electrical signal conduction in the wounded tomato plant. *Planta* 200: 50-57

**Rodgers MW, Zimmerlin A, Werck-Reichhart D y Bolwell GP. 1993.** Microsomal associated heme proteins from French bean: characterization of the cytochrome P450 cinnamate 4-hydroxylase and two peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 74-80.

**Ruffer M, Steipe B y Zenk MH. 1995.** Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Lett.* 377: 175-180.

**Ryan CA y Pearce G. 1998.** A polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 1-17

**Ryan CA. 2000.** The systemin signalling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1477: 112-121.

**Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C y Davies KJA. 1990.** Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J. Biol. Chem.* 265: 11919-11927.

**Sánchez-Casas P y Klessing FD. 1994.** A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant. Physiol.* 106: 1675-1679.

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

**Schaller A y Oecking C. 1999.** Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defence responses in tomato plants. *Plant. Cell* 11: 263-272.

**Sembdner G y Partiré B. 1993.** The biochemistry and physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 44: 469-489.

**Seo S, Sano H y Ohashi Y. 1999.** Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant. Cell* 11: 289-298.

**Strack PR, Waxman L y Fagan JM. 1996.** ATP-stimulated degradation of oxidatively modified superoxide dismutase by cathepsin D in cardiac tissue extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 348-353.

**Stratmann JW y Ryan CA. 1997.** Myellin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharides elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 11085-11089.

**Takahashi MA y Asada K. 1983.** Superoxide anion permeability of phospholipids membranes and chloroplast thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 558-566.

**Ueda J y Kato J. 1980.** Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant. Physiol.* 66: 246-249

**Usami S, Banno H, Ito Y, Nishihama R y Machida Y. 1995.** Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc. Nalt. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 8660-8664.

**Weidhase RA, Kramell HM, Lehmann J, Llebisch HW, Lerbs W y Parthier B. 1987.** Methyljasmonate- induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant. Sci.* 51: 177-186.

**Wildon DC, Thain JF, Minchin PEH, Gubb IR, Reilly AJ, Skipper YD, Doherty HM, O'Donnell PJ y Bowles DJ. 1992.** Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature.* 360: 62-65.

**Xiang C y Oliver DJ. 1998.** Glutathione metabolic genes co-ordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant. Cell* 10: 1539-1550.

**Yahia KEM y Báez SR. 1992.** Manejo poscosecha de frutas subtropicales. En: *Fisiología y tecnología poscosecha de productos hortícola.* Editorial limusa. pp. 197-205.

**Yahraus T, Chandra S, Legendre L y Low PS. 1995.** Evidence for a mechanically-induced oxidative burst. *Plant. Physiol.* 109: 1259-1266.

## PROTOSCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ENZIMAS QUE METABOLIZAN ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

### 1. CATALASA

#### 1.1 Extracción

1. Se pesó 0.5 g de tejido y se incubó a diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h) a temperatura ambiente.
2. La muestra fué triturada con N<sub>2</sub> líquido.
2. Se resuspendió el macerado en 1 ml de buffer (Tris-Hcl 50 mM pH 7.8, manitol 0.3 M, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM).
4. La muestra se homogenizó en un vortex durante 10 segundos.
5. Se centrifugó a 10,000 g durante 30 minutos a 4 °C.
6. Extracción del sobrenadante.

#### 1.2 Actividad por espectrofotometría.

1. Para medir la actividad se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo Eppendorf (1 ml):

630 µl de H<sub>2</sub>O  
326.4 µl de KPO<sub>4</sub> (50 mM pH 7.5)  
4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tomarlo directo del frasco)  
10 µl del extracto de la enzima

2. La mezcla se homogenizó en un vortex durante 2 segundos.
3. Leer absorbencia a 240 nm por 3 minutos a un intervalo de 30 segundos.

#### 1.3 Detección de la actividad en gel de poliacrilamida no desnaturizante

##### 1.3.1 Preparación del gel:

3.6 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
2.025 ml de acrilamida  
1.875 ml de Tris-HCl pH 8.8  
37.5 µl de persulfato de amonio al 10%  
3.75 µl de TEMED

### 1.3.2 Preparación de la muestra y electroforesis.

1. Cuantificar proteína por el método de Bradford.
2. Cargar en el gel la misma cantidad de proteína en los diferentes tiempos.
3. La electroforesis se realizó a 200 V 4 °C.

### 1.3.3 El revelado del gel

1. Lavar el gel rápidamente con agua destilada estéril.
2. Sumergirlo en 50 ml de amortiguador de  $\text{KPO}_4$  (50 mM pH 7), que contiene peroxidasa (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 45 minutos en agitación a temperatura ambiente.
3. Retirar el líquido.
4. Incubar en 50 ml de  $\text{KPO}_4$  (50 mM pH 7), conteniendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) durante 10 minutos.
5. Retirar el líquido.
6. Enjuagar rápidamente con agua destilada.
7. Incubar en 50 ml de  $\text{KPO}_4$  (50 mM pH 7), conteniendo DAB (5 mg/ml).
8. Dejar el gel en el buffer que contiene DAB hasta observar las bandas acromáticas característica de la actividad de la enzima.

## 2. PEROXIDASA

### 2.1 Extracción

1. Se pesó 0.5 g de tejido y se incubó a diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h) a temperatura ambiente.
2. Se trituró con  $\text{N}_2$  líquido a 4 °C.
3. El macerado se resuspendió en 1 ml de  $\text{NaPO}_4$  (100 mM pH 7).
4. La muestra se centrifugó a 10,000 g durante 30 minutos a 4 °C.

5. Obtención del sobrenadante.

## **2.2 Actividad por espectrofotometría.**

1. Para medir la actividad se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo Eppendorf (1 ml):

990  $\mu$ l de la mezcla de guaiacol  
10  $\mu$ l del extracto de la enzima

La mezcla de guaiacol contiene los siguientes reactivos:

0.25 % de guaiacol  
0.25 % de  $\text{NaPO}_4$  (10 mM pH 6.0)  
0.125 % de  $\text{H}_2\text{O}_2$

2. Leer absorbencia a 470 nm durante 3 minutos a intervalos de 30 segundos.

## **2.3 Detección de la actividad en gel de poliacrilamida no desnaturizante.**

### **2.3.1. Preparación de la muestra y electroforesis.**

1. Cuantificar proteína por el método de Bradford.
2. Cargar en el gel la misma cantidad de proteína en los diferentes tiempos.
3. La electroforesis se realizó a 100 V 4 °C.

### **2.3.2 Revelado del gel.**

1. Sumergir el gel en 50 ml de citrato de sodio (50 mM pH 5.5) durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente.
2. Retirar el líquido.
3. Incubar con 50 ml de citrato de sodio (50 mM pH 5.5) conteniendo DAB (1 mM) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.03 %), dejar el gel en esta solución hasta observar las bandas de color café característica de la actividad de la enzima.

### 3. SUPERÓXIDO DISMUTASA.

#### 3.1 Extracción.

1. Se pesó 0.5 g de tejido y se incubó a diferentes tiempos (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h) a temperatura ambiente.
2. Se trituroó con N<sub>2</sub> líquido a 4 °C.
3. Resuspender el macerado en 1 ml de buffer de KPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7 (0.1 mM de EDTA y 1 % de PVPP).
4. homogenizar la muestra con un vortex durante 10 segundos.
5. Centrifugar a 10, 000 g por 5 minutos a 4 °C.
6. Extraer el sobrenadante.

#### 3.2 Actividad por espectrofotometría.

1. Para medir la actividad se mezclaron los siguientes reactivos en un tubo Eppendorf (1 ml):

40 µl de EDTA (0.1 M)  
20 µl de NBT (1.5 mM)  
10 µl del extracto crudo de la enzima (sobrenadante)  
600 µl de buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.067 M, pH 7)  
50 µl de riboflavina (0.12 mM)

2. Agitar la mezcla rápidamente.
3. Iluminar los tubos eppendorf con una lámpara de 40 W durante 10 minutos.
4. Leer absorbencia a 560 nm.

#### 3.3 Detección de la actividad en gel de poliacrilamida no desnaturizante.

##### 3.3.1 Preparación de la muestra y electroforesis.

- 1.- Cuantificar proteína por el método de Bradford.
- 2.- Cargar en el gel la misma cantidad de proteína en los diferentes tiempos.
- 3.- correr las muestras a 200 V durante 6 h 4 °C.

### **3.3.2 Revelado del gel.**

1. El gel fué sumergido en 50 ml de buffer de  $KPO_4$  (32 mM, pH 7.8), que contiene riboflavina (28  $\mu$ l) y TEMED (28  $\mu$ l), durante 25 minutos en agitación.
2. Retirar el líquido.
3. Incubar en 50 ml de buffer  $KPO_4$  (36 mM, pH 7.8) que contiene NBT (2 mM), durante 30 minutos.
4. Iluminar el gel con una lámpara de 40 W hasta observar las bandas acromáticas característica de la actividad de la enzima.

## **4. Enfoque isoelectrico.**

### **4.1 Preparación del gel.**

5.5 ml de agua  
2 ml de acrilamida  
2 ml de glicerol al 25 %  
0.5 ml de anfolina (pH de 3.5-10)  
50  $\mu$ l de persulfato de amonio  
20  $\mu$ l TEMED

### **4.2 Preparación de la muestra.**

La muestra de proteína se mezcló con un volumen igual de buffer 2X, y se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 g a temperatura ambiente.

### **4.3 Preparación del buffer de carga 2X (5 ml).**

3 ml de glicerol  
200  $\mu$ l de anfolina  
1.8 ml de  $H_2O$

### **4.4 Electroforesis.**

- 1.- Adicionar catolitos en la cámara superior (20 mM de hidróxido de sodio).
- 2.- Adicionar anolitos en la cámara inferior (10 mM de ácido fosfórico).
- 3.-Correr a 200 V durante 2.5 h.



#### **4.5 Determinación del gradiente de pH.**

- 1.- Cortar una tira longitudinal del gel y se cortó en trozos de 1 cm.
2. Sumergir cada trozo en 3 ml de KCL (10 mM) durante 30 minutos.
- 3.- Medir el pH a la solución de KCL.