



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“INDUCCIÓN CON ÁCIDO SALICÍLICO DE RESPUESTAS DE DEFENSA EN
RAÍCES DE AGUACATE EN CONTRA DE *Phytophthora cinnamomi* Rands”**

TESIS

Que como requisito para obtener
el título profesional de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

GERARDO RANGEL SÁNCHEZ

Director de tesis:

D.C. Ernesto García Pineda

Morelia Michoacán, febrero de 2012

Y sabemos que los que aman a Dios todas las cosas les ayudan a bien...

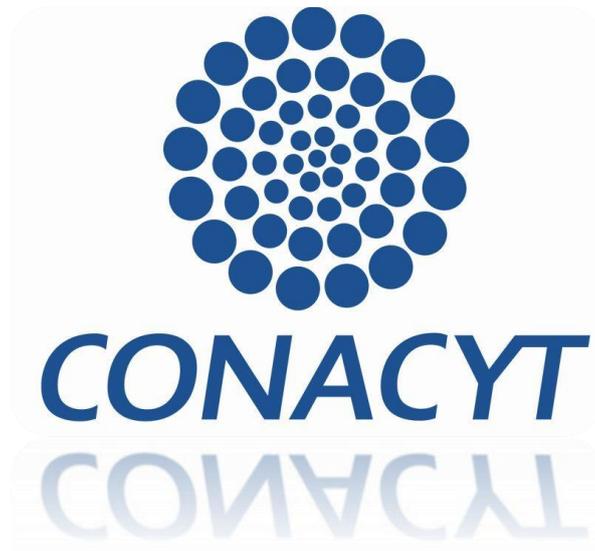
Romanos 8:28

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD
MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL
D.C. ERNESTO GARCÍA PINEDA.



TESIS APOYADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

CONACYT



DEDICATORIA

A mi **Mamá Ma. Inocencia**, por el amor incondicional que me has brindado, y por ser un ejemplo de una vida de integridad.

A mi **Papá Gerardo**, por el apoyo y consejos que me has compartido, por estar conmigo cuando lo he necesitado.

A mis **Hermanos: Armando, Nancy y Angy**, por compartir tantos momentos tan hermosos y por su enorme amor.

A mi **Sobrina Hannah Vanessa**, por la alegría que nos brindas con tu sonrisa e inocencia.

A la **Familia Arias Estrada**, por todo su apoyo y cariño, por formar parte de este sueño. Que Dios los bendiga siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mi **Dios y Padre Eterno**, porque has tenido misericordia de mí y me has llamado a la salvación eterna, muchas gracias por ser cada día el motivo de mi existir, nunca podre pagar lo que has hecho por mí.

Al **D.C. Ernesto García Pineda**, y a su esposa la **M.C. Elda Castro Mercado** por abrirme las puertas de su laboratorio y por haberme instruido durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas: **Karen, Julie, Claudia, Diana, Enrique, Erika, Javier y Randy**, por todos los momentos agradables que pasamos juntos durante nuestra formación.

A **Claudia Adriana Arias Estrada**, por apoyarme en todo tiempo y por tu amistad incondicional durante todos estos años.

A **Areli Gutiérrez Segundo**, por todo el cariño y apoyo que me has brindado, que Dios te bendiga eternamente.

A mi hermano en Cristo **Ángel Flores Sánchez**, por haberme compartido e instruido en las cosas de Dios nuestro señor, has sido una gran bendición para mi vida.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: **Diana, Jonathan, Araceli, Manuel, Jerónimo** por el tiempo compartido durante mi estancia en el laboratorio.

A mis **Amigos de Casa de Oración Morelia**, por recibirme tan cálidamente dentro de esa gran familia espiritual.

Y muy especialmente: A mi **Pastor Rito Llamas** y a su **Linda Familia**, por todas sus enseñanzas y por haberme recibido en su iglesia. Que Dios siga derramando su gracia y bendición sobre ustedes.

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, por la estancia brindada durante mi formación profesional.

Al **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas**, por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este proyecto.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada para la elaboración de este proyecto.

A los profesores e investigadores integrantes de la comisión de sinodales: **D.C. Elda Beltrán Peña, D.C. José López Bucio, D.C. Homero Reyes de la Cruz, D.C. Rafael Salgado Garciglia y D.C. Ernesto García Pineda**, por las aportaciones realizadas para enriquecer el contenido de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. EL cultivo de aguacate.....	3
2.2. Las enfermedades en el cultivo de aguacate.....	5
2.3. El patógeno <i>Phytophthora cinnamomi</i> y la pudrición de la raíz del aguacate.....	6
2.4. Mecanismos de defensa en plantas.....	11
2.5. Inductores de respuestas de defensa en plantas.....	13
2.6. El ácido salicílico como inductor de respuestas de defensa en plantas.....	15
2.7. Compuestos con propiedades antimicrobianas en la planta de aguacate.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS.....	20
5.1. Objetivo general.....	20
5.2. Objetivos específicos.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1. Material biológico.....	21
6.2. Reactivos.....	21
6.3. Análisis de los niveles de AS en el tejido de raíz de aguacate.....	22
6.4. Extracción de metabolitos de la raíz de aguacate.....	23
6.5. Bioensayos <i>in vitro</i>	24
6.6. Detección de compuestos bioactivos.....	25
6.7. Aislamiento del (los) compuesto (s) bioactivo (s).....	26
6.8. Identificación del (los) compuesto (s) bioactivo (s).....	27
6.8.1. Análisis por espectrofotometría.....	26
6.8.2. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	27
6.8.3. Análisis por espectrometría de resonancia magnética nuclear de hidrógeno.....	27

6.9. Evaluación del efecto antimicrobiano del compuesto identificado.....	28
6.10. Análisis estadístico.....	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
7.1. Análisis de los niveles de AS en el tejido de raíz de aguacate.....	30
7.2. La raíz de aguacate estimulada con AS produce compuesto (s) que afectan el crecimiento de <i>P. cinnamomi in vitro</i>	33
7.3. El extracto de raíz de aguacate afecta el crecimiento de bacterias.....	37
7.4. El extracto de raíz de aguacate contiene compuestos con propiedades antifúngicas.....	38
7.5. Identificación de los compuestos bioactivos del extracto de raíz de aguacate.....	39
7.6. El compuesto fenol 2,4-bis (1,1-dimetiletil) presenta actividad antifúngica y antioomiceto.....	44
8. CONCLUSIÓN.....	49
.	
9. LITERATURA CITADA.....	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de ácido salicílico.....	2
Figura 2. El cultivo de aguacate en México.....	4
Figura 3. La marchitez del aguacate.....	7
Figura 4. Ciclo de vida de <i>P. cinnamomi</i>	12
Figura 5. Rutas biosintéticas del ácido salicílico (AS).....	18
Figura 6. Análisis de AS.....	31
Figura 7. Análisis de los niveles de AS por HPLC.....	32
Figura 8. Efecto del extracto de raíz de aguacate sobre <i>P. cinnamomi</i>	35
Figura 9. Detección de zonas de inhibición por bioensayos TLC de extracto de raíz de aguacate.....	41
Figura 10. Detección de compuestos bioactivos de extracto de raíz de aguacate con luz ultravioleta.....	43
Figura 11. Identificación de los compuestos aislados del extracto de raíz de aguacate tratado con AS.....	45
Figura 12. Cinética de germinación de esporas de <i>Aspergillus</i> spp.....	44
Figura 13. Efecto del fenol 2,4-bis (1,1-dimetiletil) sobre la longitud del tubo germinativo de <i>Aspergillus</i> spp.....	46
Figura 14. Efecto del compuesto purificado sobre el crecimiento de <i>P. cinnamomi</i>	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos bioactivos en la planta de aguacate.....	18
Tabla 2. Efecto inhibitorio del extracto crudo de raíces de aguacate sobre el crecimiento micelial de <i>P. cinnamomi</i>	34
Tabla 3. Efecto del extracto de raíz de aguacate sobre el crecimiento de bacterias <i>P. syringae</i> y <i>A. brasilense</i>	37
Tabla 4. Características de las fracciones obtenidas de extracto crudo de raíz de aguacate.....	39

1. Introducción.

El aguacate es uno de los cultivos más importantes en México, de tal manera que en nuestro país ha llegado a ser considerado como el principal productor de este cultivo a nivel mundial (SIAP, 2010). Además, en México la producción de aguacate, genera más de 100 mil empleos directos e indirectos y permite una entrada importante de divisas al país por la exportación de su fruto, el cual es producido en 29 entidades federativas, siendo los estados más importantes; Michoacán, Estado de México, Nayarit, Morelos, Puebla y Jalisco. Además, existen más de 400 empacadoras y comercializadoras de aguacate en toda la república, de las cuáles más del 35% exportan sus productos a diferentes partes del mundo. A su vez, el aguacate ha sido incorporado en forma cotidiana a la dieta de muchos países, y se cultiva en países como Estados Unidos, Israel, España y Chile, debido a esto el mercado internacional de aguacate se presenta con alto grado de competencia en precios y calidad (Sánchez, 2007). Por otro lado, el cultivo de aguacate en Michoacán representa la actividad agrícola más importante tanto en el aspecto económico como en el social, ya que en esta entidad, se cultiva la mayor extensión de aguacate del país y del mundo equivalente a 107,057.57 hectáreas. Esta producción, se traduce en una derrama económica del orden de los 750 millones de pesos, con una producción de 950,942.32 toneladas anualmente, lo cual equivale al 86% de la producción nacional y el 30% de la producción mundial (SIAP 2010). El hecho de tener la mayor superficie plantada de aguacate a nivel nacional y mundial, ha propiciado que plagas y enfermedades se encuentren íntimamente asociadas al desarrollo

del cultivo, ya que se han reportado alrededor de 28 enfermedades que atacan a las plantaciones de aguacate. Sin embargo, “*la marchitez del aguacate ó tristeza del aguacate*”, causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, es considerada como una de las enfermedades mas importantes y devastadoras en este cultivo (Mora *et al.*, 2007; Zentmyer, 1980). Este padecimiento, se ha reportado en toda la franja aguacatera del estado de Michoacán, sin embargo, también ha sido detectada en otros estados como Puebla, Chiapas, Veracruz Morelos, Querétaro y Guanajuato (Lara-Chávez y Guillen-Andrade, 2009). Adicionalmente, como parte de las estrategias integrales para erradicar esta enfermedad, se han desarrollado metodologías enfocadas a la búsqueda de compuestos naturales propios del aguacate que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi* (Sánchez-Pérez, 2010). Aunado a esto, se ha descrito que existen diversas moléculas que son capaces de inducir una producción y/o acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, entre las cuales se encuentra el ácido salicílico (AS) (Fig. 1).

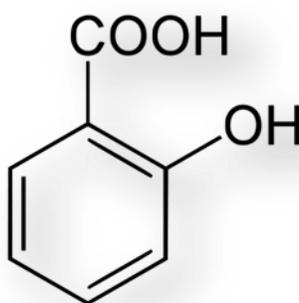


Figura 1. Molécula de ácido salicílico.

Este compuesto de naturaleza fenólica, en diversos reportes se ha visto que es capaz de inducir una acumulación de metabolitos con propiedades antimicrobianas (Zhang, 2005), así como una acumulación de compuestos

fenólicos totales (Mandal, 2010) como parte de las estrategias de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos. Sin embargo, no existe información, sobre si el ácido salicílico es capaz de inducir la acumulación de compuestos antimicrobianos en aguacate, los cuales pudieran ser efectivos para combatir la enfermedad marchitez del aguacate provocado por *P. cinnamomi*.

2. Antecedentes.

2.1 El cultivo de aguacate.

El aguacate *Persea americana* ó *Persea gratissima*, es un árbol originario de México, perteneciente a la familia de las lauráceas (Fig. 2). Su fruto comestible, se conoce como aguacate, palta, cura, avocado o abacate, según cada región en donde se ha desarrollado su producción. El árbol de aguacate es un árbol frondoso y de hoja perenne, su floración es generosa. Sus flores son perfectas en racimos, sin embargo, éstas abren en distintos momentos, primero como femeninas, después cierran y vuelven a abrir como masculinas; cada árbol puede llegar a producir hasta un millón de flores y sólo el 0.1 % se transforman en fruto.

A su vez, el fruto de aguacate (que es una baya de una semilla oval), puede ser de superficie lisa o rugosa, su peso puede llegar a variar desde 120 gramos hasta 2.5 kg, es de color verdoso y su piel puede ser fina o gruesa, es muy rico en proteínas y en grasas, con un contenido en aceite del 10 al 20%.

Este fruto es sensible al frío y a la humedad, por lo que su establecimiento por lo regular es en regiones libres de heladas y de vientos calurosos y secos. La temperatura y la lluvia son los dos factores de mayor incidencia en el desarrollo de

este cultivo. En cuanto a la precipitación, se considera que 1,200 mm anuales bien distribuidos son suficientes. Las sequías prolongadas provocan la caída de las hojas, estimulando un bajo rendimiento, mientras que la precipitación excesiva durante la floración y fructificación, reduce la producción y provoca la caída del fruto. El viento produce daño, rotura de ramas y caída del fruto; cuando el viento es muy seco durante la floración, se reduce el número de flores polinizadas y por consiguiente de frutos, lo que provoca que el rendimiento disminuya.

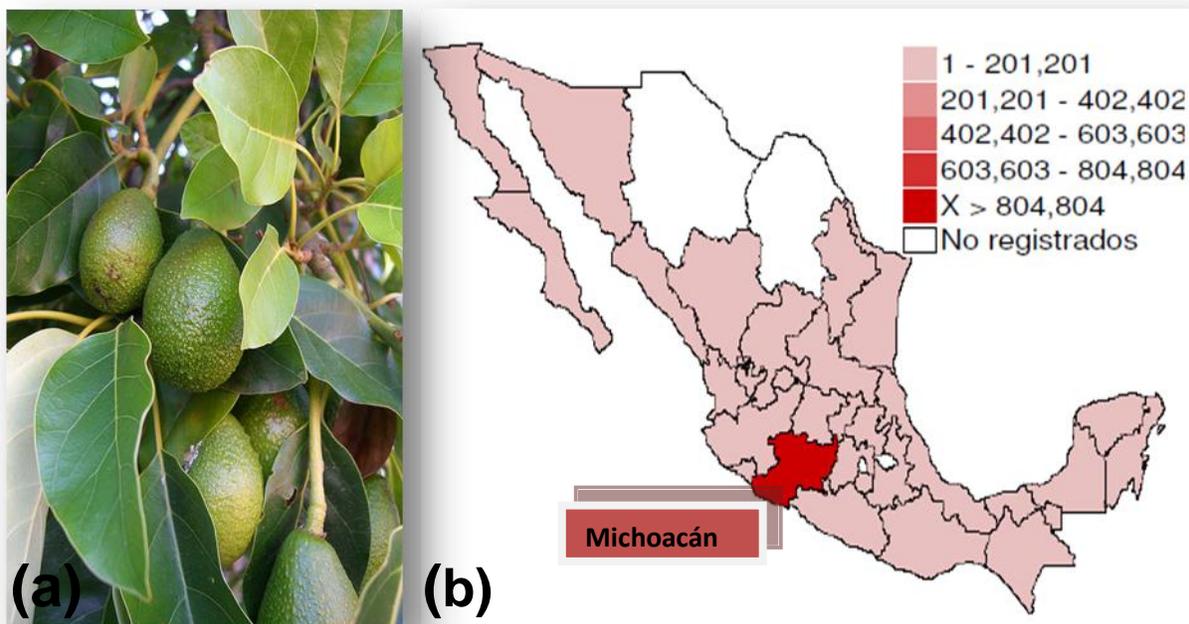


Figura 2. El cultivo de aguacate en México. (a) El árbol de aguacate. (b) Clasificación de la producción nacional de aguacate (en miles de toneladas) por entidad federativa. Tomado de SIAP, 2010.

Entre los usos principales que se le da a este producto frutal, están aquellos que se refieren a la alimentación debido a que contiene proteínas, vitaminas y

minerales, sin embargo de su contenido de lípidos pueden extraerse aceites utilizables en la industria cosmética y farmacéutica (SIAP, 2010).

2.2 Las enfermedades en el cultivo de aguacate.

Las enfermedades en los cultivos de aguacate, son uno de los factores que incrementan los costos de producción y limitan la exportación al demeritar la calidad de la fruta. El aguacate presenta enfermedades severas que en casos extremos provocan la muerte del árbol y en general, una disminución en la producción que varía del 10 al 40%, y una reducción en la calidad entre un 15 y 30% (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001).

Las enfermedades de mayor importancia económica que se presentan en las plantaciones de aguacate para el caso de Michoacán son: a) la antracnosis del fruto, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.; b) la roña, causada por *Sphaceloma persea* Jenkins; c) el anillamiento del pedúnculo, causado por el complejo bacteriano-fúngico de los géneros *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Clavibacter (Corynebacterium)* sp., *Alternaria* sp., *Diplodia* sp., *Dothiorella* sp. y *Pestalotia* sp.; 4) la marchitez del aguacate o pudrición de la raíz, causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands.; 5) el cáncer de tronco y ramas, causado por *Fusarium epishaeria* Snyder y Hansen, *Phytophthora boehmeriae* Sawada y *Nectria galligena* Cayley; y 6) las enfermedades de poscosecha, causadas por *Diplodia natalensis* Pole evans., *Rhizopus nigricans* Ehr., *Alternaria* sp., *Verticillium* sp., *Fusarium roseum*, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. y *Sphaceloma persea* Jenkins.

Sin embargo, la marchitez del aguacate resalta de forma importante, ya que ha sido considerada como la más devastadora para este cultivo, no sólo para el estado de Michoacán, sino a nivel mundial ya que afecta aproximadamente entre el 60 a 75% de la producción mundial, lo cual se traduce en pérdidas que superan los 40 millones de dólares por año, en los países considerados como los principales productores de aguacate (Sánchez-Pérez *et al.*, 2001, Marais, 2004).

2.3 El patógeno *Phytophthora cinnamomi* y la pudrición de la raíz del aguacate.

La pudrición de la raíz es la enfermedad más devastadora de los árboles de aguacate a nivel mundial. Su agente causal es el oomiceto *P. cinnamomi* Rands, el cual fue aislado por primera vez de árboles de canela en la isla asiática de Sumatra en 1922, y a partir de ahí, se ha detectado en más de 70 países, que abarcan las principales zonas productoras de aguacate del mundo, como Sudáfrica, Israel, Nueva Zelanda, Estados Unidos (California), Australia, Centro América, el Caribe, y por supuesto, México, siendo un factor limitante en la producción, además del alto costo que implica su prevención y control (Marais, 2004). La denominación pudrición de la raíz se debe a los daños que ocasiona al sistema radical, mientras que la marchitez, se debe a la sintomatología que presenta la planta en su parte aérea. La enfermedad puede presentarse en cualquier estado de desarrollo de la planta. Se caracteriza en un inicio por un amarillamiento de las hojas ya presentes en el árbol; las hojas nuevas brotan más pequeñas que las normales, presentan una forma acucharada, de color verde pálido en lugar de verde oscuro y con puntas necróticas. Al evolucionar la

enfermedad, éstas tienden a caer, dejando a las ramas casi desnudas. Frecuentemente ya no se producen brotes nuevos, y las ramas van muriendo desde la parte superior de la copa y de los extremos de las ramas hacia abajo, fenómeno conocido como “muerte descendente o regresiva” (Jorge y Medina, 2000). El síntoma mas característico que se presenta en el sistema radical es la pudrición de las raíces absorbentes (alimentadoras, delgadas, de 1 a 3 mm de diámetro), las cuales se tornan oscuras y quebradizas; las raíces principales (gruesas) solo ocasionalmente son colonizadas, sin embargo en un estado avanzado de la enfermedad se afecta la mayor parte del sistema radicular y la planta finalmente tiende a morir (Fig. 3) (Maraís, 2004, Pérez-Jiménez, 2008).

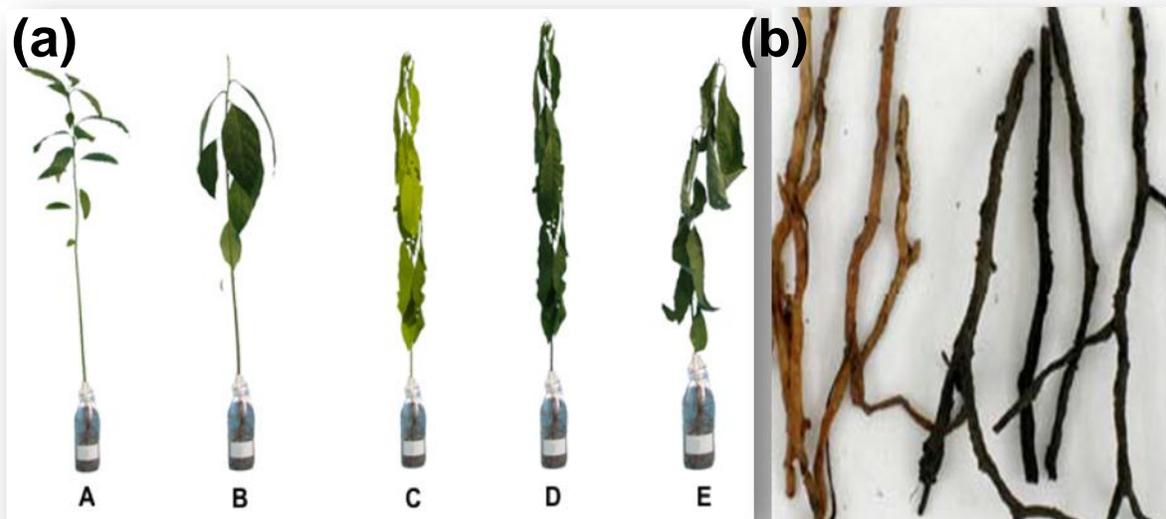


Figura 3. La marchitez del aguacate. (a) Plántulas de aguacate con los síntomas descritos en la escala modificada de Coffey (1991): planta sana [A], flacidez [B], amarillamiento [C], marchitamiento y muerte de puntas [D] y muerte de la plántula [E]. (b) Raíces alimentadoras de plántulas de aguacate. Raíces sanas con una coloración clara y raíces de color negro infectadas con *P. cinnamomi*.

Por otro lado, se ha descrito que el genero *Phytophthora* (palabra de origen griego que significa “*destructor de plantas*”), agrupa algunos de los fitopatógenos más devastadores de las plantas dicotiledóneas. Por ejemplo, *P. cinnamomi* tiene un rango muy amplio, Zentmyer (1985) reportó originalmente casi 1,000 hospederos, pero actualmente se le conocen más de 3,500 especies hospederas (unas 2,000 de ellas tan sólo en Australia), que abarcan plantas leñosas, árboles o arbustos, tanto cultivadas, ornamentales y silvestres (Hardham, 2005; Hardham y Blackman, 2010).

Anteriormente, *Phytophthora* se consideraba un hongo, debido a su hábito de crecimiento filamentoso en estado vegetativo y la formación de esporas para su reproducción asexual y sexual. Sin embargo, existen remarcables diferencias morfológicas y fisiológicas entre los hongos y los oomicetos.

Estos últimos son diploides, sus hifas no tienen septos y la mayoría de los oomicetos son (parcialmente) auxótrofos para esteroides ya que sus membranas contienen lípidos con estructuras inusuales y ácidos grasos de cadena larga, que presumiblemente reemplazan a los esteroides en las membranas del micelio. Los oomicetos por su parte, sintetizan lisina por la ruta del ácido α,ϵ -diaminopimélico, mientras que los hongos sintetizan ese aminoácido por la llamada ruta α -aminoadípica.

Las paredes celulares de la mayoría de los oomicetos consisten principalmente de 1,3- β -glucanos, algunos 1,6- β -glucanos y 1,4- β -glucanos (celulosa), la quitina que es un constituyente mayor de las paredes celulares de

los hongos, ha sido detectada en pequeñas cantidades en solamente unos pocos oomicetos (Latijnhouwers *et al.*, 2003).

Adicionalmente, análisis bioquímicos conjuntamente con análisis filogenéticos de las secuencias génicas de ARN ribosomal (rRNA) (Kumar y Rzhetsky, 1996; Paquin *et al.*, 1997), de aminoácidos de proteínas de las mitocondrias (Lang *et al.*, 1999) y de genes cromosómicos que codifican proteínas (Baldauf *et al.*, 2000), sugieren que los oomicetos tienen poca relación taxonómica con los hongos filamentosos y que están estrechamente relacionados con las algas café (cromofitas) y con otros taxones que poseen pelos flagelares tubulares (mastigonemas), en un ensamble taxonómico conocido como Estramenópilos (Barr, 1992).

La clasificación taxonómica de *P. cinnamomi* es la siguiente:

Reino: *Chromista*.

Phylum: *Oomicota*.

Orden: *Peronosporales*.

Familia: *Peronosporaceae*.

Género: *Phytophthora*.

(Hardham, 2005; Pérez-Jiménez 2008).

En el ciclo de la enfermedad de *P. cinnamomi* (Fig. 4), las principales estructuras de infección de *P. cinnamomi* son las zoosporas que son liberadas de los esporangios. Las zoosporas son células sencillas con dimensiones de unos 9 a 15 micrómetros (μm), carentes de pared celular, biflageladas, móviles, que nadan hacia las raíces jóvenes de los potenciales hospederos en una respuesta

quimiotáctica a los exudados de las raíces (generalmente aminoácidos y azúcares). Al alcanzar la raíz del hospedero, se adhieren a las raicillas, forman una pared celular, se enquistan y germinan sobre ellas.

El proceso de enquistamiento implica la pérdida de movilidad a través de la eliminación de los dos flagelos, y la secreción de material incluyendo un adhesivo el cual pega las zoosporas a la superficie de la raíz y después de unos 5 minutos, la formación de una pared celular celulósica. La germinación de los quistes ocurre unos 20 a 30 minutos después del enquistamiento. Los tubos germinativos pueden crecer por aproximadamente 1 h en ausencia de nutrientes exógenos. En la cercanía de una raíz, crecen quimiotrópicamente hacia ella, penetrando la superficie entre las células epidérmicas. La penetración ocurre alrededor de 24 h después de la infección (Zentmyer, 1961). Unas 6 h después de la penetración, el tejido de la raíz alimentadora muere (Coffey, 1984), y el oomiceto crece dentro de ese tejido necrótico por algunos días. Cuando las reservas alimenticias del tejido de la raíz se agotan, el patógeno es estimulado a esporular. Se forman dos tipos de esporas: esporangios y clamidosporas.

Dos a tres días después del inicio de la infección, el patógeno puede esporular otra vez, formando esporangios sobre la superficie de la raíz y liberando más zoosporas en la rizosfera. De esta manera el inóculo se amplifica rápidamente. Los esporangios son estructuras con un diámetro de 20-50 μm , pueden sobrevivir por días y aún semanas bajo condiciones de suelo húmedo.

También pueden liberar zoosporas móviles, las que nadan a una velocidad de entre 100 y 200 $\mu\text{m/s}$ y su movilidad puede alcanzar varios centímetros antes de enquistarse (Hardham, 1998), pero debido a su movimiento aleatorio y los obstáculos que representan las partículas del suelo, rara vez avanzan más de 1 cm, aunque obviamente esto puede significar un desarrollo considerable de la enfermedad dentro del sistema de raíces alimentadoras de un árbol de aguacate infectado (Coffey, 1984). Bajo condiciones de suelo húmedo y cálido, se presenta una rápida proliferación de zoosporas dentro del sistema radical del árbol (Pérez-Jiménez, 2008).

2.4 Mecanismos de defensa en plantas.

Las plantas, en la naturaleza generalmente son resistentes a la mayoría del ataque de los organismos patógenos. La habilidad de un patógeno para causar enfermedad en una planta hospedera es usualmente la excepción y no la regla (Staskawicz, 2001). Esto se debe a que las plantas tratan de defenderse a sí mismas, a través de una combinación de mecanismos preformados, estructurales ó pasivos e inducidos o activos. Entre las defensas preformadas, es decir, las barreras estructurales propias de la anatomía de la planta, tales como cutículas cerosas, la pared celular y los compuestos antimicrobianos preformados localizados estratégicamente conocidos como fitoanticipinas, proveen una protección físico-mecánica contra un amplio rango de patógenos.

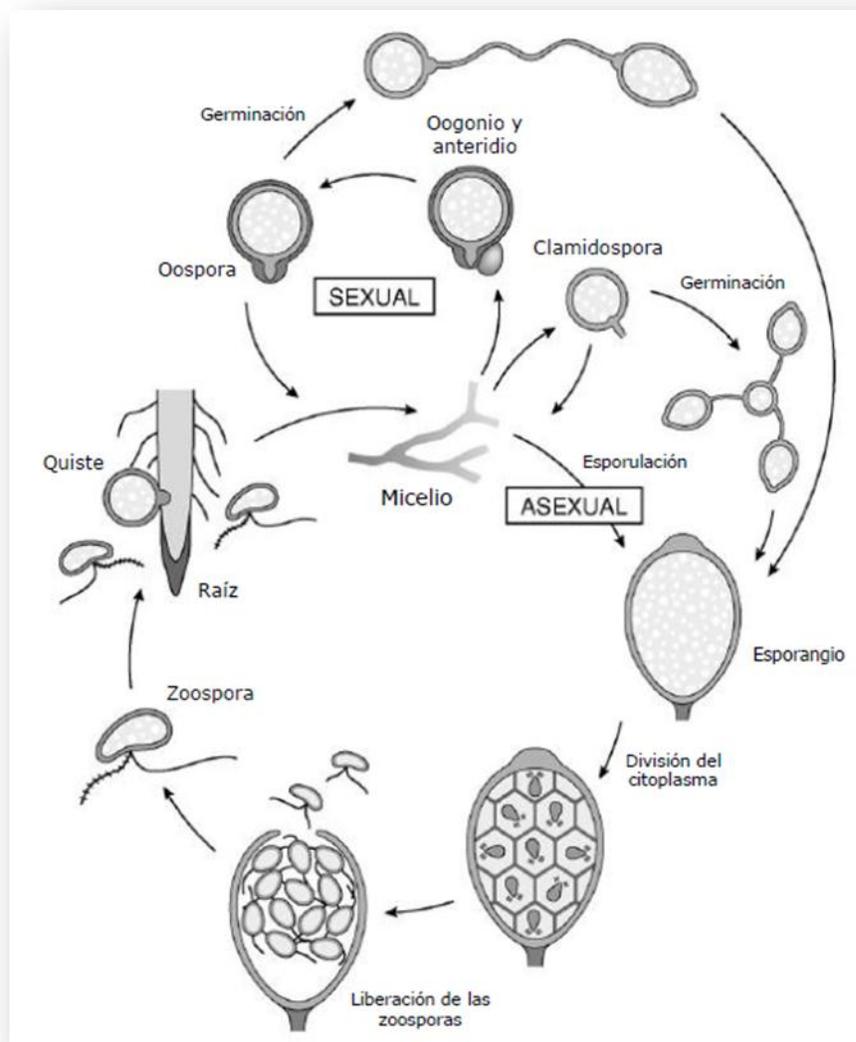


Figura 4. Ciclo de vida de *P. cinnamomi*. Estructuras reproductivas del patógeno relacionadas a su estado vegetativo, representando además las fases sexual y asexual de su ciclo de vida. Tomado de Department of the Environment and Heritage, 2006.

Por otro lado, las defensas activas ó inducibles, entran en acción después de que el hospedero tiene contacto con el microorganismo invasor. Estas implican la síntesis y acumulación de compuesto tales como especies reactivas de oxígeno, la expresión de genes que sintetizan proteínas relacionadas a la defensa (tales como glucanasas, quitinasas, inhibidores de proteasa etc.), la producción de compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular conocidos como fitoalexinas,

así como compuestos que pueden ser directamente tóxicos para el patógeno (compuestos fenólicos, lactonas no saturadas, derivados sulfurados, saponinas), (Staal y Dixelius, 2007, Bari y Jones, 2009).

Se sabe que, además de la acumulación de fitoalexinas, las respuestas de defensa incluyen, entre otras reacciones, la síntesis de enzimas y compuestos fenólicos que refuerzan la pared celular, así como la producción de un conjunto de proteínas con propiedades antimicrobianas denominadas PRs (del inglés "*Pathogenesis-Related*"). Además, es importante mencionar que Las defensas pasivas se encuentran en la planta independientemente de si ésta es desafiada o no por un patógeno (Tierens *et al.*, 2001), mientras que las defensas activas requieren de la inducción por el ataque de un patógeno, o la acción de un 'inductor' (elicitor, en inglés, que en este contexto se define como: un estímulo físico, químico o biológico, que desencadena respuestas de defensa en las plantas) (Bari y Jones 2009).

2.5 Inductores de respuestas de defensa en plantas.

Las moléculas ó compuestos conocidos como inductores, son moléculas químicas ó biofactores capaces de inducir cambios fisiológicos en un determinado organismo vivo. Un amplio espectro de compuestos los cuales incluyen iones metálicos, compuestos orgánicos de virus, bacterias, componentes de la pared celular de hongos, así compuestos sintéticos ó análogos con actividad de inductor, tales como el AS, pueden ser liberados en el sitio de infección del ataque de un

patógeno, y producir una serie de reacciones, que incluyen la acumulación de ciertos metabolitos secundarios. (Zhao, 2005).

En este sentido, se ha reportado que el ácido salicílico, se acumula rápidamente en el sitio de infección durante la invasión de organismos patógenos, así como también durante la respuesta hipersensible. Y también se dispersa hacia otras partes de la planta para inducir un amplio rango de respuestas de defensa.

Por ejemplo, se ha descrito que el AS es capaz de inducir la expresión de genes relacionados a la biosíntesis y producción de algunos metabolitos secundarios en plantas (Taguchi *et al.*, 2001). Compuestos como los indol-alcaloides pueden ser inducidos por ácido acetil salicílico (un análogo del ácido salicílico) en cultivos en suspensión de *C. roseus* (Zhao *et al.*, 2000).

Compuestos como la policarpina en hojas de *P. jaborandi* (Avancini *et al.*, 2003), alcaloides en pelos radiculares de cultivos de *Brugmansis candida* (Lee *et al.*, 2001), así como indol-glucosinolatos en plantas de Canola y Arabidopsis, pueden ser inducidos por AS y MeJA (metil jasmonato) (Bennett y Wallsgrove, 1994; Kiddle *et al.*, 1994; Brader *et al.*, 2001; Mikkelsen *et al.*, 2003). Además, en cultivos de *Rubia cardifolia*, el AS y MeJA fuertemente inducen la producción de una fitoalexina llamada antraquinona (Bulgakov *et al.*, 2002), mientras que en pelos radiculares de cultivos de *Brugmansia candida* que produce los tropano-alcaloides hioscimina y escopolamina, el ácido salicílico significativamente estimula la liberación de ambos alcaloides (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000).

En estudios mas recientes, se probó que el AS fue el más efectivo al inducir una mayor acumulación de fenoles totales en raíces de berenjena (*Solanum melongena* L.), en comparación con otros elicitores como el MeJA y el quitosán (Mandal, 2010), mientras que en plantas de cacahuate pretratadas con AS e infectadas con el patógeno *A. alternata* se observó un incremento en el contenido de fenoles totales a los 5 días posteriores a la inoculación (Chitra *et al.*, 2008).

2.6 El ácido salicílico como inductor de respuestas de defensa en plantas.

El ácido salicílico es un compuesto fenólico natural que esta presente en un gran número de plantas y se conoce que está implicado en gran cantidad de procesos fisiológicos y bioquímicos; sin embargo, la función fisiológica mejor caracterizada del ácido salicílico (AS) es la de la activación de programas de defensa inducibles, confiriendo a la planta resistencia frente a patógenos (Álvarez, 2000).

En efecto, un incremento en los niveles endógenos de AS y de sus conjugados en plantas infectadas, coincide con la activación de genes que codifican para proteínas PR y con el establecimiento de la resistencia en la planta (Shah, 2003). Numerosos estudios han demostrado la implicación del AS en el desarrollo de la resistencia local y sistémica.

En este sentido ha sido clave la utilización de plantas transgénicas que no pueden acumular ácido salicílico ya que, estas plantas son incapaces de activar la resistencia sistémica adquirida en la planta y, además, son más susceptibles al desarrollo de enfermedades que sus parentales (Mur *et al.*, 1997).

Por otra parte, la aplicación exógena de AS activa la expresión de genes PR y hace a la planta más resistente a cualquier ataque patogénico (Shah, 2003). Respecto a la biosíntesis del AS, anteriormente estaba ampliamente descrito que el AS era sintetizado en la planta a partir de la fenilalanina, a través de la ruta de los fenilpropanoides.

Sin embargo, actualmente se admite que la ruta biosintética del isocorismato es la principal fuente de AS durante la infección patogénica y el establecimiento de la SAR. Las enzimas isocorismato sintasa (ICS) e isocorismato piruvato liasa (IPL) catalizan la biosíntesis en dos pasos del AS a partir de isocorismato (Fig. 5). Dicha biosíntesis tiene lugar en el cloroplasto (Vlot *et al.*, 2009).

El transporte de AS al citoplasma podría llevarlo a cabo la proteína de membrana EDS5/SID1 que muestra identidad con proteínas de extrusión de drogas y toxinas (MATE) (Nawrath *et al.*, 2002). La mayoría del AS producido en las plantas es convertido a *o*-- β -glucosido (SAG) por la enzima AS glucosil transferasa. El SAG es activamente transportado desde el citosol hacia las vacuolas, donde posiblemente funciona como una forma de almacenamiento inactiva donde puede ser hidrolizado hacia AS libre (Vlot *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2009).

2.7 Compuestos con propiedades antimicrobianas en la planta de aguacate.

De forma general, los compuestos antimicrobianos de origen vegetal constituyen un diverso arreglo de diferentes clases de compuestos, incluyendo

saponinas, fenoles, ácidos hidroxámicos cíclicos, glicósidos cianogénicos, isoflavonoides, sesquiterpenos, derivados de indol que contienen azufre, resorcinoles, dienos entre otros (Papadopoulou *et al.*, 1999).

Estos productos naturales vegetales, son biológicamente activos contra microorganismos fitopatógenos (principalmente con actividad antifúngica), aunque aún no han sido tan ampliamente estudiados en su modo de acción. A pesar de lo anterior, se ha propuesto que el modo de acción de algunos compuestos con actividad antifúngica tanto de origen natural como sintéticos radica en afectar la síntesis de ácidos nucleicos, así como la mitosis y la división celular, interferir con la síntesis de aminoácidos y proteínas, además de que pueden producir alteraciones en la síntesis de lípidos de la membrana, mientras que otros inhiben la síntesis de glucanos en la pared celular. (McGrath, 2004; Robertson, 2005; FRAC, 2005).

Por otro lado, en la planta de aguacate se han encontrado distintos metabolitos bioactivos, con actividad antifúngica, bactericida, así como también con actividad antioomiceto, tal y como se muestra en el cuadro 1.

Tabla 1. Compuestos bioactivos en la planta de aguacate.

Compuesto	Efecto	Fuente de obtención del compuesto	Referencia
1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo heneicosa-12,15-dieno	Antifúngico	Cáscara de frutos inmaduros	Domergue <i>et al.</i> , 2000
1,2,4-trihidroxi-n-heptadeca-16-eno	Bactericida	Extracto de semillas	Neeman <i>et al.</i> , 1970
Boronol	Antioomiceto	Extractos de hojas, frutos y raíces	Zaki <i>et al.</i> , 1980
Estigmastan-3,5-dieno	Antioomiceto	Extractos de raíces	Sánchez-Pérez <i>et al.</i> , 2010

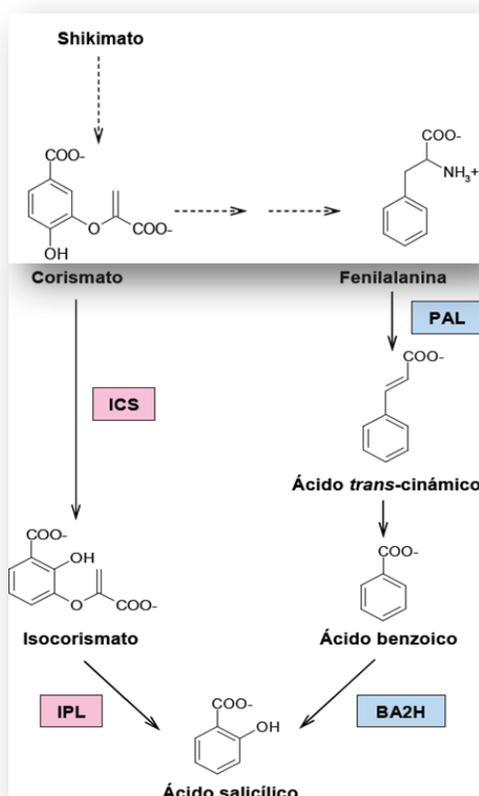


Figura 5. Rutas biosintéticas del ácido salicílico (AS). ICS, isocorismato sintasa; IPL, isocorismato piruvato liasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; BA2H, ácido benzoico-2-hidroxilasa. Modificado de Shah (2003).

3. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la importancia del cultivo de aguacate para el desarrollo económico y cultural, no sólo dentro de el estado de Michoacán, sino en general para nuestro país; y de acuerdo a los antecedentes mostrados, resulta interesante estudiar que clase de compuestos antimicrobianos pudieran ser inducidos por el ácido salicílico contra la infección por *Phytophthora cinnamomi*.

4. HIPÓTESIS.

El ácido salicílico induce la acumulación de algunos metabolitos con propiedades antimicrobianas en las raíces de aguacate criollo contra la infección por *Phytophthora cinnamomi*.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Analizar la acumulación de metabolitos con propiedades antimicrobianas inducidas por el ácido salicílico en raíces de aguacate criollo contra la infección por *Phytophthora cinnamomi*.

5.2 Objetivos específicos.

1. Analizar por HPLC (High-performance liquid chromatography) los niveles de AS en el tejido de raíz preincubado con AS.
2. Obtener extractos metanólicos de tejido de raíz preincubado con AS.
3. Evaluar el efecto in vitro de extractos metanólicos sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*.
4. Purificar y caracterizar químicamente el (los) compuesto (s) del extracto metanólico de raíz de aguacate estimulada con AS.
5. Evaluar el efecto del (los) compuesto (s) caracterizados sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Material biológico.

Plantas de aguacate (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) de 3 a 4 meses de edad, obtenidas de un vivero comercial de la ciudad de Uruapan, Michoacán. Las cepas del oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands., y la bacteria *Pseudomonas syringae* fueron donadas respectivamente por el D.C. Rafael Salgado Garciglia y el D.C. Jesús Campos García, respectivamente; ambos investigadores del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la UMSNH. La cepa de *Aspergillus* spp., fue donada por la D.C. Silvia Fernández Pavia investigadora de Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la UMSNH. La cepa de la rizobacteria *Azospirillum brasilense* fue donada por la Dra. Gladys Alexandre, investigadora de la Universidad de Tennessee, USA.

6.2 Reactivos

Agar dextrosa y papa de la marca BDBioxon (Edo. de México, México). Ácido salicílico de la marca Sigma (St. Louis, MI, USA). Acetato de etilo y metanol de la marca J. T. Baker (Xalostoc, Edo. de México, México). Ácido clorhídrico e isopropanol de la marca Merck (Darmstadt, Hesse, Alemania). Nitrógeno líquido de la marca INFRA (Tlalnepantla, Edo. de México, México). Ridomil Gold 4E (Metalaxyl-M) de la marca Syngenta (Distrito Federal, México).

6.3 Análisis de los niveles de AS en el tejido de raíz de aguacate.

Los análisis por HPLC para determinar los niveles de AS se hicieron siguiendo el protocolo descrito por Velázquez-Robledo *et al.*, (2011), con algunas modificaciones. Se molió 1 g de tejido fresco con nitrógeno líquido hasta pulverizar el tejido. El tejido pulverizado se colocó en un tubo Falcon de 50 ml. Se le añadieron 5 ml de una mezcla que contenía isopropanol:H₂O:HCl (2:1:0.002/v:v:v). La mezcla se homogeneizó durante 30 segundos en un vórtex (Fisher Vortex Genie 2 modelo G-560) (Bohemia, NY, E.U.A.). Posteriormente la mezcla se centrifugó a 7500 rpm/15 minutos, se le añadieron 2 ml de diclorometano y se agitó nuevamente durante 5 minutos. A partir de aquí se generaron dos fases en la mezcla, las cuales se utilizaron para cuantificar el AS total. La cuantificación de AS se realizó mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Hitachi High-Performance Liquid Chromatograph, LaChrom Elite, Shanghai, China), para lo cual se utilizó una columna C18 de fase reversa que se mantuvo a 40°C. La velocidad de flujo de la fase móvil, compuesta por ácido acético, metanol y agua, se mantuvo constante a 1 ml por minuto. El cálculo de la concentración de AS se realizó en base a una curva patrón preparada con AS comercial (0-100 µg). Los tratamientos utilizados fueron:

- a) Raíces no tratadas (control).
- b) Raíces tratadas con una solución de AS 5 mM/4 horas.
- c) Raíces incubadas con una suspensión de micelio de *P. cinnamomi* (con una D.O. de 1.5 a 2.0 a una λ de 600 nm) durante 24 horas.
- d) Raíces incubadas con AS y posteriormente inoculadas con *P. cinnamomi*.

La concentración de AS se graficó con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por duplicado.

6.4 Extracción de metabolitos de la raíz de aguacate.

La obtención de metabolitos se realizó por medio de la técnica descrita por Rodríguez *et al.*, (2004), con algunas modificaciones. Se obtuvo un extracto metanólico, para ello primeramente se colectaron y se pesaron de 20 a 30 g de tejido fresco de raíz y se incubaron inmediatamente en 500 ml de una solución 5 mM de AS (extracto de raíz incubada con AS o Ext. AS) o H₂O (extracto de raíz o Ext. H₂O) como control, durante 4 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las raíces se secaron, se enjuagaron 2 veces suavemente con agua destilada estéril (para retirar los residuos de la solución) y posteriormente se secaron con toallas de papel. En seguida, el tejido se molió en nitrógeno líquido en un mortero frío hasta pulverizar por completo el tejido. El tejido pulverizado se colocó en un vaso de precipitados (cubierto con papel aluminio) que contenía metanol (se usaron 400 ml de metanol por cada de 10 g de tejido fresco) y se dejó bajo vigorosa agitación constante sobre una plancha a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente la solución se filtro por fuerza gravimétrica usando papel filtro estéril. A continuación el sobrenadante fue evaporado a sequedad bajo vacío en un rotavapor a 40°C. El residuo obtenido se resuspendió en 2 ml de metanol y se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.5 Bioensayos *in vitro*.

Para los bioensayos se siguió el protocolo descrito por García-Pineda *et al.*, (2010). Se utilizaron cajas Petri con medio PDA-v8, espatuladas con 10 y 50 µg/ml de extracto metanólico. Como controles se usaron 50 µl de agua destilada y 50 µl de metanol, respectivamente, y como control negativo se usó el fungicida metalaxyl a una concentración de 0.5 g/L. Para analizar el crecimiento del oomiceto, se procedió a colocar un propágulo de micelio de 0.5 mm de diámetro, de placas con 7 días de crecimiento, en el centro de cada caja (de 4.5 cm de diámetro) y se incubaron a 25°C en obscuridad. Se midió cada 24 horas el radio de crecimiento (distancia entre el centro del propágulo y el margen de crecimiento del micelio), hasta que en las cajas control el micelio cubrió toda la caja (aproximadamente 4 días) (Schouten *et al.*, 2002; Sánchez-Pérez *et al.*, 2010). Transcurrido este tiempo, se tomaron fotografías de las placas con una cámara digital Canon Power Shot modelo A630 de 8.0 Megapíxeles (China), las cuales se presentaron como resultados. Los datos de la cinética de crecimiento se graficaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado. Adicionalmente se realizaron bioensayos usando dos cepas de bacterias diferentes: *Pseudomonas syringae* y *Azospirillum brasilense* (cepa SP245). Tubos de ensayo fueron preparados con 4 ml de medio LB mínimo y suplementados con 10 o 50 µl/ml de extracto metanólico. Se inocularon con 100 µl de cultivos de bacterias en crecimiento exponencial. Los tubos inoculados se incubaron durante 8 horas para el caso de *P. syringae* y 24 horas para el caso de *A. brasilense*. Finalmente, se midió la absorbencia de los cultivos a 600 nm en un

espectrofotómetro marca Beckman DU 530 (Fullerton, CA, E.U.A.). Los resultados de absorbencia se reportaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

6.6 Detección de compuestos bioactivos.

La detección de compuestos bioactivos se realizó por medio del protocolo descrito por Bornello y Pearce (1993), con algunas modificaciones. Primeramente se realizó una cromatografía en capa fina (TLC; del inglés "*Thin-layer chromatography*") con 20 y 40 mg totales de los extractos metanolicos, utilizando una placa analítica de sílica gel sobre aluminio de 20x20 cm, con un espesor de 2.0 mm (Sílica gel 60; Sigma, St. Louis, MI, USA), usando una la mezcla de solventes cloroformo-metanol 4:1 (v/v) como sistema de desarrollo. Una vez aplicado el extracto en la placa cromatográfica, la cromatografía se desarrolló durante 2 horas en una cámara para cromatografía de vidrio a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las placas se secaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y se asperjaron con una solución de esporas de *Aspergillus* spp. (1×10^6 esporas/ml). Posteriormente, las placas se colocaron sobre una cama de algodón (humedecida con agua destilada estéril) y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 días (tiempo necesario suficiente para visualizar la germinación de las esporas). La presencia de compuestos bioactivos sobre la placa se identificó mediante la localización de zonas de inhibición de la germinación de las esporas.

6.7 Aislamiento de los compuestos bioactivos.

El aislamiento del (los) compuesto (s) bioactivo se realizó siguiendo las técnicas descrita por Bornello y Pearce (1993) y Sánchez-Pérez *et al.*, (2010), con algunas modificaciones. Primeramente, la zona de inhibición detectada en los bioensayos en placa (TLC), fue parcialmente purificada por medio de cromatografía en capa fina de la siguiente manera: Se aplicaron 350 mg del extracto metanólico en una placa preparativa, se desarrolló durante 2 horas usando una mezcla de solventes de cloroformo-metanol 4:1 (v/v). Las placas se pusieron a secar a temperatura ambiente durante 20 minutos, se observaron con una lámpara de luz ultravioleta (Cole-Parmer, IL, USA) a una λ de 254/265 nm para localizar a los compuestos bioactivos por su fluorescencia en luz ultravioleta. A continuación se calculó el R_f de la fracción (banda) identificada, se raspó para obtenerla, y se eluyó dos veces en 15 ml de metanol. El sobrenadante fue evaporado a sequedad bajo vacío en un rotavapor a 40°C. El residuo obtenido se resuspendió en 1 ml de metanol y se almacenó a 4°C hasta su uso.

6.8 Identificación de los compuestos bioactivos.

6.8.1 Análisis por espectrofotometría.

Para obtener un dato preliminar sobre la naturaleza química de (los) compuesto (s) en el extracto, por sus propiedades de absorción espectrofotométrica, se realizó un análisis de barrido de absorbencia (de las fracciones obtenidas por TLC) en la región ultravioleta, en un espectrofotómetro marca Beckman DU 530 (Fullerton, CA, E.U.A.), y se registraron los datos de la λ max (nm).

6.8.2 Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-masas). Los espectros de masa del (los) compuesto (s) identificado (s) fueron obtenidos en un espectro de masas (Hewlett Packard modelo 5989B), utilizando un detector de iones (multiplicador de electrones) a 100°C, energía de ionización de 70 eV. Las condiciones para obtener los cromatogramas fueron las siguientes: una temperatura inicial de horno cromatográfico de 50°C durante cinco minutos, después cada minuto subió 20°C hasta llegar a 200°C, en esta temperatura permaneció cinco minutos, posteriormente se incrementó hasta llegar a 250°C y ahí permaneció durante 10 minutos, el tiempo total de corrida fue de 17 minutos. La temperatura del inyector y de la interfase fue de 240 °C y 260 °C, respectivamente. Se utilizó Helio como fase móvil (gases de arrastre) y una columna no polar Hp-5 MS (5-fenil) metilpolisilano, con 30 m de longitud diámetro interno de 0.25 mm y la capa de la fase estacionaria de 0.25 µm (Hewlett Packard modelo 5890 Serie II plus). La base de datos para la comparación de las señales espectrales fue NIST/EPA/NIH 2000 (“Chem Station”, Hewlett Packard).

6.8.3 Análisis por espectrometría de resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

El espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H (RMN- ^1H) se obtuvo en un equipo varían Mercury Plus 400, a 400 MHz en 256 repeticiones, el ventanal espectral fue de 6000 Hz y el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado.

6.9 Evaluación del efecto antimicrobiano del compuesto identificado.

Se colocó una suspensión de esporas de *Aspergillus* spp. (1×10^6 esporas/ml) en 100 μ l de caldo dextrosa papa (CDP) dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml (esto se realizó por triplicado). Se agregó una concentración de 10 y 100 μ g/ml del compuesto purificado. Como control positivo se utilizó el mismo tratamiento pero sin la presencia del compuesto y como control negativo se utilizaron 50 μ l de metalaxyl a una concentración de 0.5 g/L. La suspensión de esporas se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz. La germinación fue evaluada tomando una muestra de 15 μ l de cada uno de los tratamientos. La muestra se colocó sobre un porta objetos y se observó en un microscopio estereoscópico (Leica M80, acoplado a una cámara con Leica Application Suite V3 (Wetzlar, Alemania), y se tomaron fotografías para registrar los resultados. Se consideró que las esporas habían germinado cuando el tubo germinativo alcanzó al menos la mitad de la longitud de la espora. La longitud del tubo germinativo se midió a partir de las fotografías obtenidas, con ayuda del programa Leica. Application Suite V3 (Wetzlar, Alemania), los datos fueron reportados con media aritmética y desviación estándar. Por último, se realizaron bioensayos in vitro, con *P. cinnamomi* para evaluar el efecto del compuesto sobre el crecimiento radial, como se especifica en el apartado 6.5 de esta sección, usando las concentraciones de 10 y 100 μ g/ml.

6.10 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias (Tukey) con el programa Statistic 6.0. Se utilizaron distintas letras para indicar las medias con diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Análisis de los niveles de AS en el tejido de raíz de aguacate.

La identificación del AS se llevó a cabo mediante una comparación con el tiempo de retención de un estándar de AS comercial, a una λ de 325 nm. El tiempo de retención con las condiciones experimentales utilizadas, tanto para el estándar comercial, como para las diferentes tratamientos analizados fue de 5.3 minutos (Fig. 6). Se detectaron niveles basales de alrededor de los 15 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco. Sin embargo, cuando el tejido fue tratado con AS (5mM) durante 4 horas, se detectaron 225 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco, lo cual representa un aumento de 15 veces con respecto al tratamiento control. Por otro lado, cuando el tejido fue incubado con micelio de *P. cinnamomi*, los niveles de AS disminuyeron, alcanzando niveles alrededor de los 4 $\mu\text{g/g}$ por gramo de tejido fresco, lo cual representa una disminución del 26.6% con respecto al nivel basal (Fig.7). El AS es una molécula que participa de forma muy importante en la resistencia a enfermedades en plantas. En este sentido, se sabe que una acumulación rápida de AS, desencadena diferentes reacciones de defensa que contribuyen a detener el ataque por parte de un agente patógeno. Por esta razón, el AS está presente constitutivamente en una gran cantidad de plantas (Vlot *et al.*, 2009, Vasyukova y Ozeretskoy, 2007). Se ha descrito que los niveles constitutivos de AS pueden ser variables dentro de las diferentes especies vegetales. Por ejemplo; los niveles en tabaco, pepino y Arabidopsis, se consideran bajos por lo que la aplicación exógena de AS, favorece considerablemente la activación de ciertos

mecanismos de defensa ante el ataque por patógenos (Vasyukoba y Ozeretskoykaya, 2007).

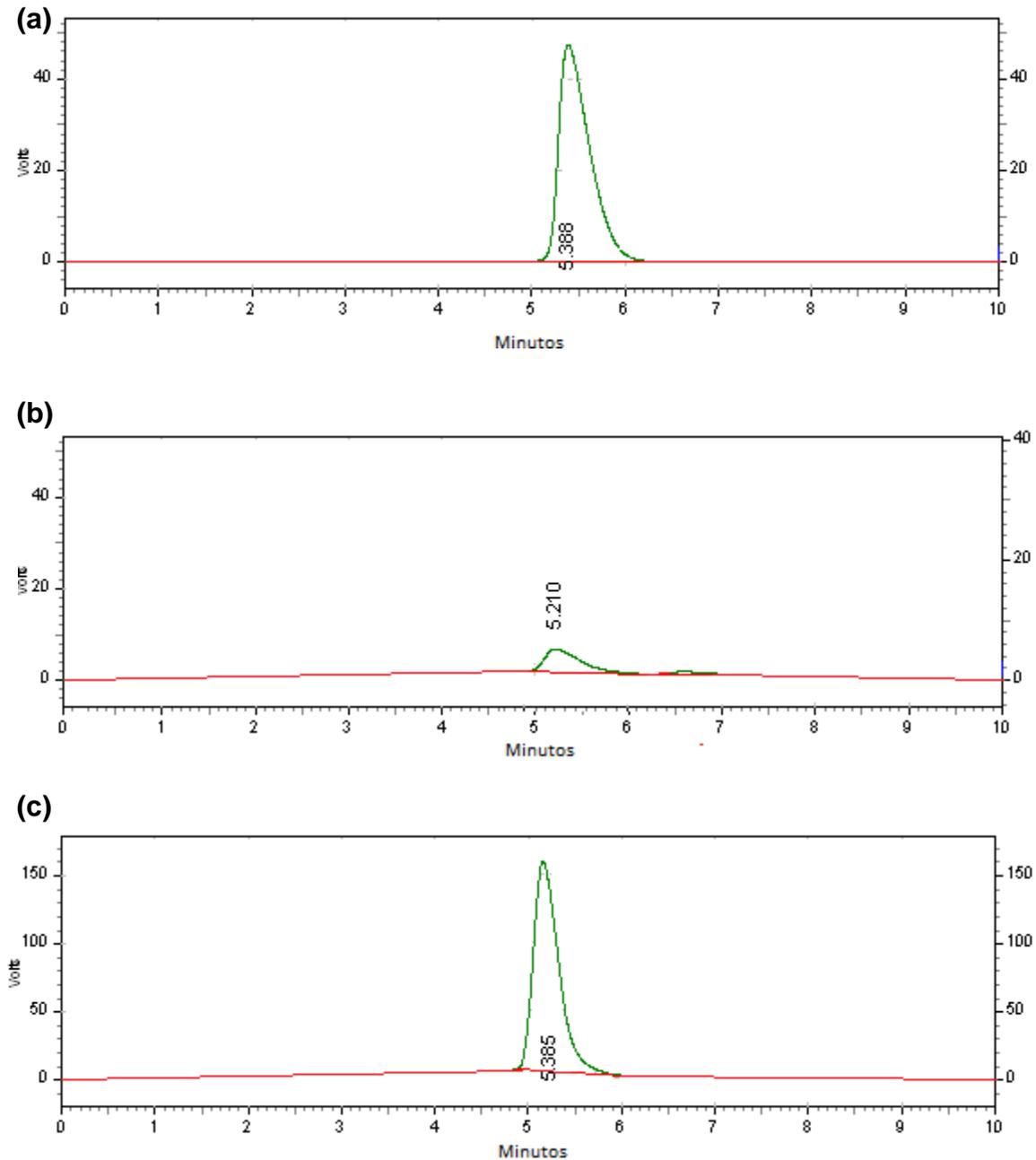


Figura. 6. Análisis de AS. Cromatogramas (HPLC) que muestran la acumulación de ácido salicílico (AS) detectado a 325 nm, en el tejido de raíz de aguacate. (a) AS comercial. (b) Planta control. (c) Tratamiento con AS 5 mM.

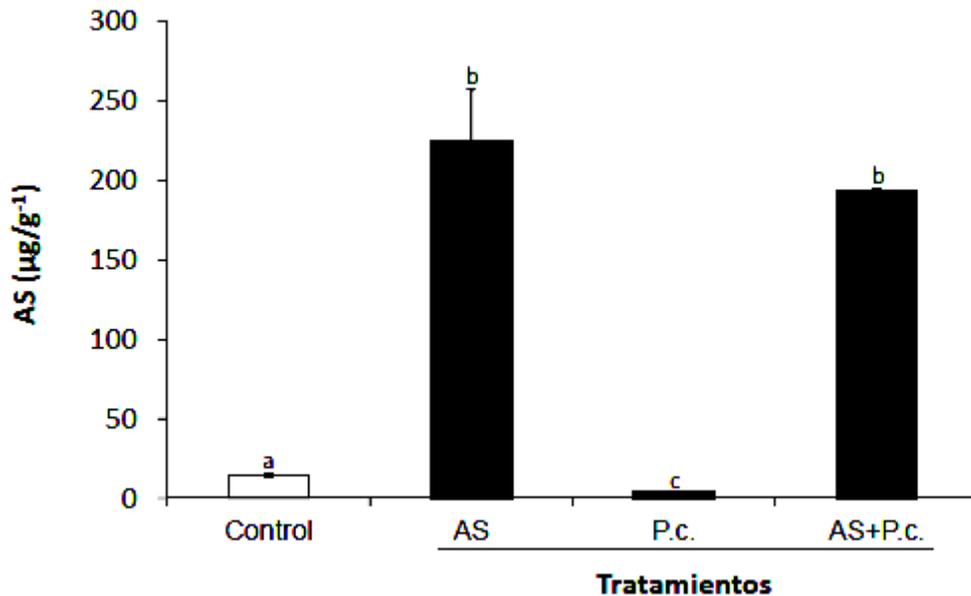


Figura 7. Análisis de los niveles de AS por HPLC. (AS) Tejido incubado con ácido salicílico. (P.c.) Tejido inoculado con *P. cinnamomi*. (AS+P.c.) Tejido tratado con AS e incubado con *P. cinnamomi*. Los datos representan la media \pm DE de dos experimentos independientes con n=4. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

En relación a esto, se ha descrito que el tratamiento con AS puede inducir la acumulación de diversos metabolitos con propiedades antimicrobianas, así como también la acumulación de fenoles totales en plantas de cacahuate, berenjena y canola, como parte de una estrategia que favorece la resistencia de las plantas ante el ataque por patógenos (Zhao *et al.*, 2005, Chitra *et al.*, 2008, Mandal 2010). Con nuestros experimentos demostramos que parte del AS adicionado exógenamente penetra hacia el interior del tejido de la raíz. Una vez dentro del tejido el AS podría inducir la acumulación de metabolitos con actividad en contra de *P. cinnamomi*, esta hipótesis es apoyada por reportes que indican que las plantas producen metabolitos secundarios en respuesta a patógenos cuya inducción depende del AS, como es el caso de la camalexina en plantas de

Arabidopsis thaliana (Nawrath y Métraux; 1999, Dixon, 2001). Por otro lado, se ha reportado que la acumulación de AS dentro de la planta se expresa de forma diferencial, ya que de acuerdo a lo reportado por Molders *et al.*, (1996) la concentración de salicilato (un derivado de AS) es de 5 a 10 veces más alta en la raíz de plantas de tomate en comparación con las hojas, lo cual parece indicar que los niveles de AS pueden diferir entre órganos dentro de la misma planta.

7.2 La raíz de aguacate estimulada con AS produce compuesto (s) que afectan el crecimiento de *P. cinnamomi* *in vitro*.

Para determinar si la raíz de aguacate estimulada con AS, acumula compuestos bioactivos contra *P. cinnamomi* realizamos bioensayos *in vitro* con los extractos metanólicos. El extracto metanólico crudo del tejido de raíz fue capaz de inhibir el crecimiento micelial de *P. cinnamomi* en un rango del 7% al 24 % (Tabla 2). De forma interesante se observó un máximo de inhibición en el extracto de raíz estimulado con AS a una concentración de 10 µg/ml. Esto pudiera indicar, que el extracto estimulado con AS contiene algún compuesto ó compuestos con la capacidad de inhibir el crecimiento de *P. cinnamomi*. Sin embargo, se pudo observar que el extracto control también presento actividad inhibitoria. En estudios previos, se ha descrito que el metanol es el mejor solvente cuando se trata de obtener sustancias con propiedades antimicrobianas de plantas medicinales, comparado con otros solventes tales como el agua, cloroformo y hexano (Smid y

Geris, 1999, Bobbarala *et al.*, 2009). Sin embargo, de acuerdo a lo reportado por Doohan *et al.*, (2000), es posible detectar la presencia de compuestos antifúngicos en extractos solubles de gramíneas como el trigo.

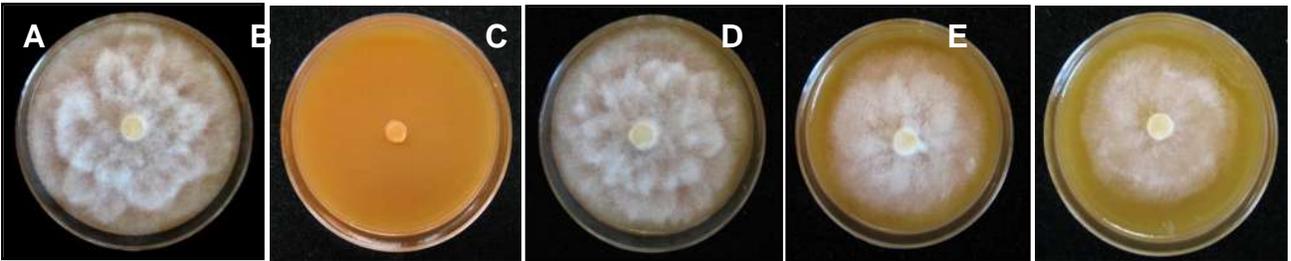
Tabla 2. Efecto inhibitorio del extracto crudo de raíces de aguacate sobre el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*.

Tratamiento	Crecimiento Radial (cm)	% Inhibición respecto al control [*]
Control	2.45±0.07	0
Metanol	2.43±0.09	0
Ext. H ₂ O 10µg/ml	2.26±0.10	7.75
Ext. H ₂ O 50µg/ml	2.17±0.15	11.42
Ext. AS 10µg/ml	1.85±0.05	24.49
Ext. AS 50µg/ml	1.94±0.26	20.81

*El Crecimiento radial y el % de inhibición respecto al control fue registrado al día 4 del experimento.

Además, existen reportes previos que indican que un extracto obtenido con metanol: cloroformo a partir de raíces de árboles de aguacate con potencial resistencia a *P. cinnamomi*, el cual contenía como componente mayoritario un compuesto denominado estigmastan-3,5-dieno fue capaz de inhibir eficientemente el crecimiento *in vitro* de este patógeno (Sánchez-Pérez *et al.*, 2009). Adicionalmente, las fotografías de las placas evaluadas de los distintos tratamientos revelaron un crecimiento micelial anormal apreciable a simple vista, con respecto a las placas control (las cuales presentan el típico crecimiento micelial de este organismo en forma de roseta) (Fig. 8a).

(a)



(b)

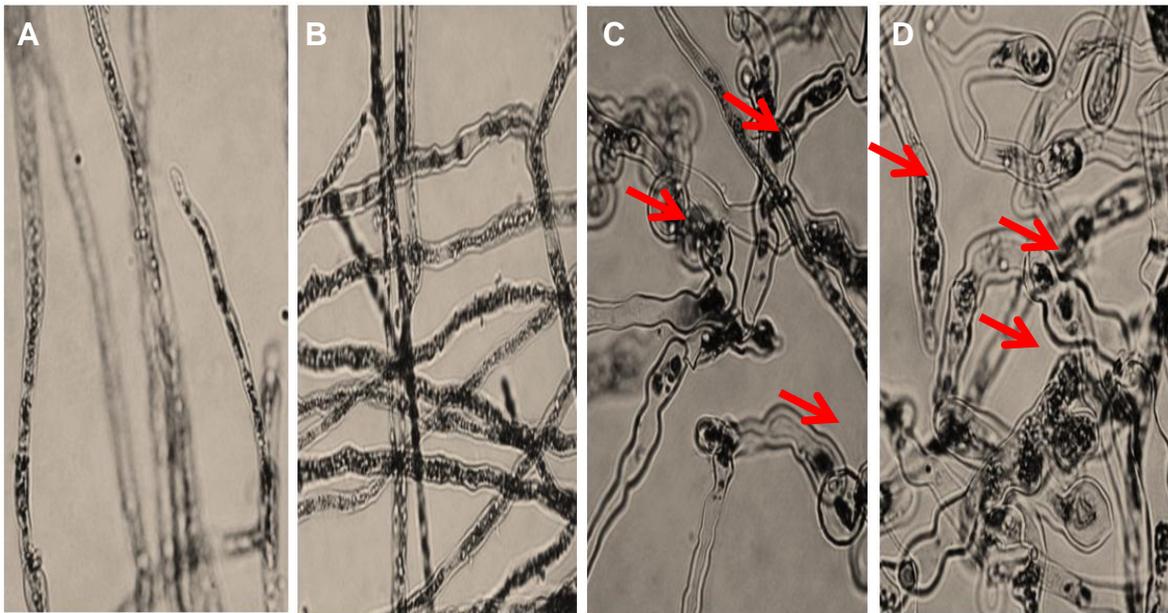


Figura 8. Efecto del extracto de raíz de aguacate sobre *P. cinnamomi*. (a) Crecimiento micelial. El efecto sobre el crecimiento micelial en las placas se evaluó durante 4 días a partir de la inoculación del propágulo. El tratamiento control se consideró como el 0% de inhibición, mientras que el tratamiento con metalaxyl fue considerado como el 100% de inhibición. Control [A], Metalaxyl [B], Metanol [C], Ext. H₂O 10 µg/ml [D], Ext. AS 10 µg/ml [E]. (b) Morfología de las hifas. Fotografías representativas tomadas a 40x de amplificación. Las flechas denotan coagulación y abultamiento de los organelos del citoplasma, así como también vesiculación de las hifas (Soylu *et al.*, 2006). Control [A], Metanol [B], Ext. H₂O 10 µg/ml [C], Ext. AS 10 µg/ml [D].

A partir de este resultado, se decidió tomar una muestra del micelio de las placas con el tratamiento del extracto, para observarlas al microscopio y hacer una comparación con el micelio control. Las fotografías revelaron una malformación de

las hifas que estuvieron en contacto con el extracto (Fig. 8b). Los efectos observados son muy semejantes a los reportado por Soylu *et al.*, (2006), en donde evaluaron el efecto de aceites esenciales de orégano y tomillo, observando que estos provocan un abultamiento citoplasmático, así como también una alteración en la forma y tamaño de los organelos de *Phytophthora infestans*. Con respecto a esto, los autores señalan que los aceites esenciales contienen algún compuesto que provoca una pérdida en la integridad de la membrana plasmática, debido quizá a una alteración de las enzimas que regulan la síntesis de la pared celular. Consecuentemente, también la permeabilidad de la membrana pudiera ser afectada, lo cual explicaría los cambios en la morfología y tamaño tanto del citoplasma como de los organelos internos. Por otra parte, se ha reportado que la presencia de metabolitos secundarios de plantas de naturaleza fenólica (fenoles sencillos y polifenoles), con propiedades antimicrobianas, actúan inhibiendo la enzima β -glucano sintasa (inhibidores de la síntesis de glucanos) probablemente a través de la reacción con grupos sulfhidrilo, o a través de interacciones inespecíficas con las proteínas (Mason y Wasserman, 1987). Por lo anterior, podemos inferir que el extracto de raíz de aguacate pudiera contener compuestos de naturaleza fenólica, los cuales podrían ser los responsables del efecto observado sobre *P. cinnamomi*.

Tabla 3. Efecto del extracto de raíz de aguacate sobre el crecimiento de bacterias *P. syringae* y *A. brasilense*.

Tratamiento	Abs 600 nm	
	<i>Pseudomonas syringae</i> *	<i>Azospirillum brasilense</i> *
Control	0.862±0.004 ^a	0.904±0.056 ^a
Metanol	0.829±0.001 ^b	0.983±0.0004 ^{ab}
Ext. AS 10µg/ml	0.770±0.003 ^c	1.132±0.013 ^c
Ext. AS 50µg/ml	0.876±0.008 ^a	0.995±0.022 ^b

*Valores tomados durante la fase exponencial. Las bacterias fueron crecidas en caldo LB mínimo a 37 °C durante 8 horas para el caso de *P. syringae* y 24 horas para *A. brasilense*. Se midió la absorbencia a 600 nm. Los datos representan la media ± DE de dos experimentos independientes con n=4. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

7.3 El extracto de raíz de aguacate afecta el crecimiento de bacterias.

Para determinar si el efecto del extracto es específico para *P. cinnamomi* decidimos evaluar como pudiera afectar el crecimiento de algunas bacterias. Se utilizó una cepa de una bacteria considerada como patógeno, como es el caso de *Pseudomonas syringae* y *Azospirillum brasilense*, la cual es una bacteria considerada como promotora del crecimiento vegetal. El extracto de raíz tratado con AS mostró un efecto inhibitorio sobre *P. syringae* a una concentración de 10 µg/ml, ya que el crecimiento se redujo un 10.67% con respecto al control (Tabla 3). Se ha reportado que existe una gran cantidad de metabolitos de plantas que presentan actividad antibacteriana. Por ejemplo, extractos metanólicos de plantas

medicinales como *Bridilia montana* y *Melia azedarach* presentaron un potente efecto inhibitorio contra *P. syringae* pv. *syringae* a una concentración de 25 µg/ml (Bobbarala *et al*; 2009). Tomando en cuenta este parámetro, podemos sugerir que nuestro extracto, contiene algún ó algunos metabolitos con un alto potencial para inhibir el crecimiento de *P. syringae*, puesto que las concentraciones utilizadas fueron menores a las reportadas por Bobbarala y colaboradores (2009). Para el caso de *A. brasilense*, se observó una estimulación en su crecimiento con la misma concentración, con respecto al control. Esto representó un aumento del 20.14% respecto al crecimiento del control (Tabla 3). Se ha reportado que los extractos de plantas contienen metabolitos que favorecen el crecimiento dentro del grupo de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, lo que podría sugerirnos que los componentes del extracto de la raíz de aguacate estimulada con AS tiene un efecto benéfico sobre este tipo de organismos bacterianos.

7.4 El extracto de raíz de aguacate contiene compuestos con propiedades antifúngicas.

Para poder detectar compuestos presentes en el extracto de la raíz de aguacate con actividad antimicrobiana, se realizó un bioensayo por cromatografía en capa fina (TLC). El resultado reveló una zona con actividad antifúngica ($R_f= 0.8$), la cual fue dependiente de la concentración tanto para el tratamiento con AS como para el extracto tratado con H₂O (control), sin embargo se observó que el efecto fue más marcado en el tratamiento con AS (Fig. 9). Una vez que se detectó una zona de inhibición en las placas cromatográficas se realizó una nueva corrida

cromatografica bajo las mismas condiciones y se procedió hacer una búsqueda preliminar del (los) compuesto (s) bioactivo (s) con luz ultravioleta. Se detectó una zona fluorescente que coincidió con la zona de inhibición de los bioensayos por TLC ($R_f = 0.8$) (Fig. 10).

7.5 Identificación de los compuestos bioactivos del extracto de raíz de aguacate.

Con el propósito de obtener datos preliminares sobre la naturaleza química del (los) compuesto (s) bioactivos del extracto de raíz de aguacate, la zona fluorescente se recuperó y se le realizó un análisis por espectrofotometría para registrar su λ_{max} (nm). Para la fracción del extracto de raíz tratada con AS la λ_{max} fue de 290 nm, mientras que para el extracto tratado con H₂O fue de 281 nm (Tabla 4).

Tabla 4. Características de las fracciones obtenidas de extracto crudo de raíz de aguacate. Las fracciones analizadas, fueron separadas por, medio de una cromatografía preparativa (TLC), y reveladas por luz ultravioleta.

Fracción	Movilidad relativa (R_f)	λ_{max} (nm)	Valor de absorbencia
Extracto de raíz tratada con H ₂ O	0.8	290	1.000
Extracto de raíz tratada con AS	0.8	281	0.245

Estos datos preliminares indican que el (los) compuesto (s) de la zona fluorescente pudiera tratarse de un compuesto de tipo fenólico, ya que este tipo de

compuestos absorben en el espectro de luz ultravioleta (Lattanzio *et al*; 2006). En cultivos celulares de *Salvia miltiorrhiza*, el ácido salicílico induce la acumulación de compuestos fenólicos en una forma dependiente de la dosis así como del tiempo de incubación.

En este estudio, el efecto de AS como un inductor de la acumulación de compuestos fenólicos estuvo correlacionado con el incremento en la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL del inglés "*Phenyl alanine amonio liase*"), una enzima clave que participa en la producción de metabolitos secundarios (Dong *et al.*, 2010). Más recientemente Ghasemzadeh y Jaafar (2012), reportaron que la aplicación de AS estimula síntesis de ácidos fenólicos en hojas de ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). Puesto que los datos espectrofotométricos indicaban que el compuesto de la fracción obtenida pudiera ser de naturaleza fenólica, procedimos a realizar una purificación por TLC en una placa preparativa de la fracción que se había obtenido anteriormente, con el propósito de obtener la fracción bioactiva en forma purificada.

La cromatografía se desarrolló utilizando agua como solvente de esta manera pudimos separar y purificar la fracción de interés. Posteriormente, con el propósito de identificar los metabolitos activos, la fracción obtenida fue sometida a un análisis por GC-masas. Se detectó un metabolito mayoritario a un tiempo de retención de 12.18 minutos, con un total de 94% y una calidad de 93 el cual representó el aproximadamente el 94% del extracto (Fig. 11a).

componente de un aceite esencial de hojas de *Sesamum radiatum* con un 2.04% del contenido total (Ogunlesi *et al.*, 2010).

También ha sido detectado en el alga parda de la especie *Colpomenia sinuosa* con un 2.96% del contenido total (Demirel *et al.*, 2009). Interesantemente, en un estudio bioquímico hecho por Ajayi *et al.*, (2011), en extractos etanólicos de raíces de la planta medicinal *Plumbago zeylanica* Linn., (por GC-masas), lograron identificar al compuesto fenol 2-4-bis (1,1-dimetiletil), como el componente mayoritario del extracto, alcanzando el 54.63% del contenido total con una calidad de 96. De acuerdo a los autores, este compuesto fenólico podría estar contribuyendo de forma importante con las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y sobre todo antimicrobianas que se le han atribuido a esta planta.

Dado que, en todos los casos, el fenol 2-4-bis (1,1- dimetiletil) fue el único compuesto fenólico detectado en estos análisis, además de que las plantas mencionadas anteriormente poseen propiedades antimicrobianas; es factible pensar que este compuesto pudiera estar presente de manera constitutiva en el tejido radicular de la planta de aguacate, actuando como un compuesto que podría ser utilizable por la planta para contrarrestar el ataque de patógenos, o también que pudiera ser inducido ante la presencia de un microorganismo patogénico, así como también por efecto de algún compuesto inductor como el AS.

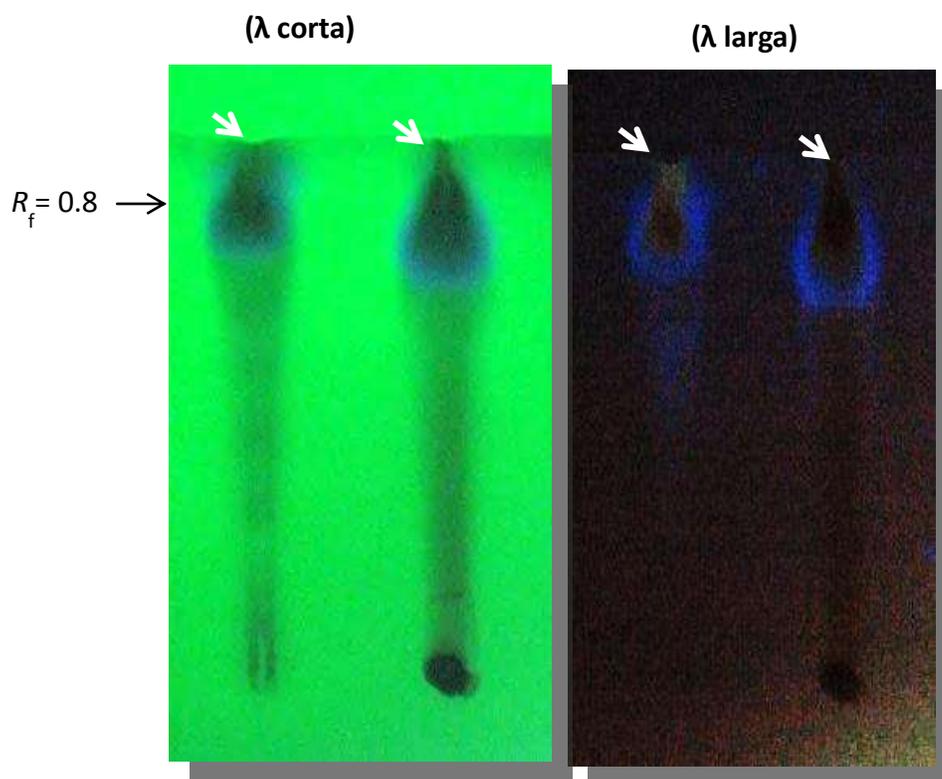


Figura 10. Detección de compuestos bioactivos de extracto de raíz de aguacate con luz ultravioleta. Se realizó una cromatografía en capa fina (TLC), utilizando 1 mg de extracto de cada uno de los tratamientos. Las fracciones detectadas fueron irradiadas con luz uv λ corta (254 nm) y λ larga (366 nm). Las flechas indican la zona fluorescente.

La estructura del 2-4-bis (1,1-dimetiletil), fue confirmada por un análisis de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN- ^1H). El espectro de RMM- ^1H , se interpretó con la ayuda de la D.C. Judit A. Aviña Verduzco, investigadora del departamento de química de IIQB. Se observó una señal a 400 MHz, una señal simple a 5.6 ppm que integra para el hidrógeno del grupo OH. También se detectaron señales que denotan la presencia de un anillo aromático trisustituido en las posiciones 1, 2, y 4 del anillo carbonado. En 7.2 ppm una señal doble de hidrógeno correspondiente al H-6; mientras que en 7.3 ppm se aprecia una señal

simple que integra para el hidrógeno H-3, así como también una señal doble para de 7.4 ppm que integra para el H-1 y corresponde al H-6 (Fig. 11b).

Con la dilucidación de la estructura molecular podemos concluir que el compuesto mayoritario contenido en el extracto de aguacate, efectivamente se trata de un compuesto fenólico con tres sustituciones en su anillo carbonado tal y como se puede apreciar en la estructura molecular del fenol 2,4-bis (1,1-dimetiletil).

7.6 El compuesto fenol 2,4-bis (1,1-dimetiletil) presenta actividad antifúngica y antioomiceto.

Una vez que el compuesto fue purificado e identificado, se procedió a evaluar su efecto sobre la germinación de las esporas del hongo *Aspergillus* spp. Primeramente se estableció la cinética de germinación de las esporas durante 48 horas. La germinación de las esporas fue observada a partir de las 24 horas de incubación, a las 48 horas se observó una abundancia notoria de micelio (Fig. 12).

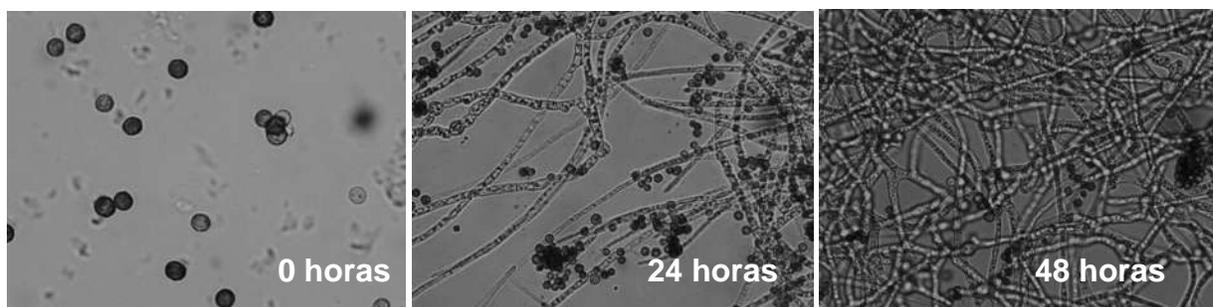
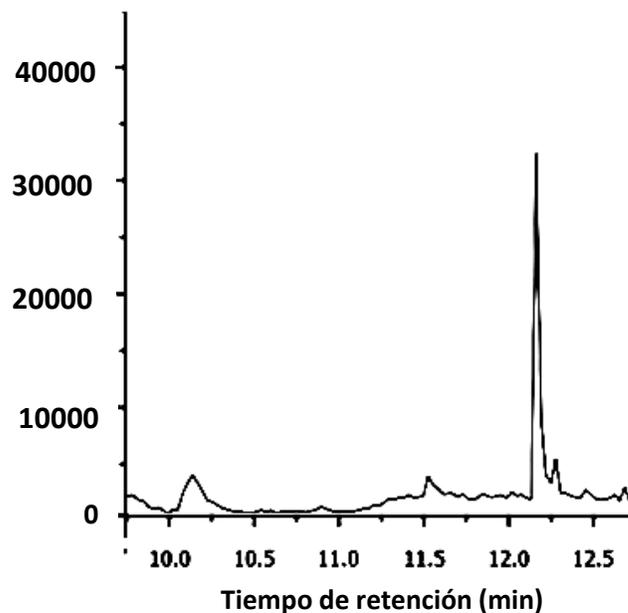


Figura 12. Cinética de germinación de esporas de *Aspergillus* spp. Las fotografías fueron tomadas a 40x de amplificación a diferentes tiempo posteriores a la germinación.

(a)



(b)

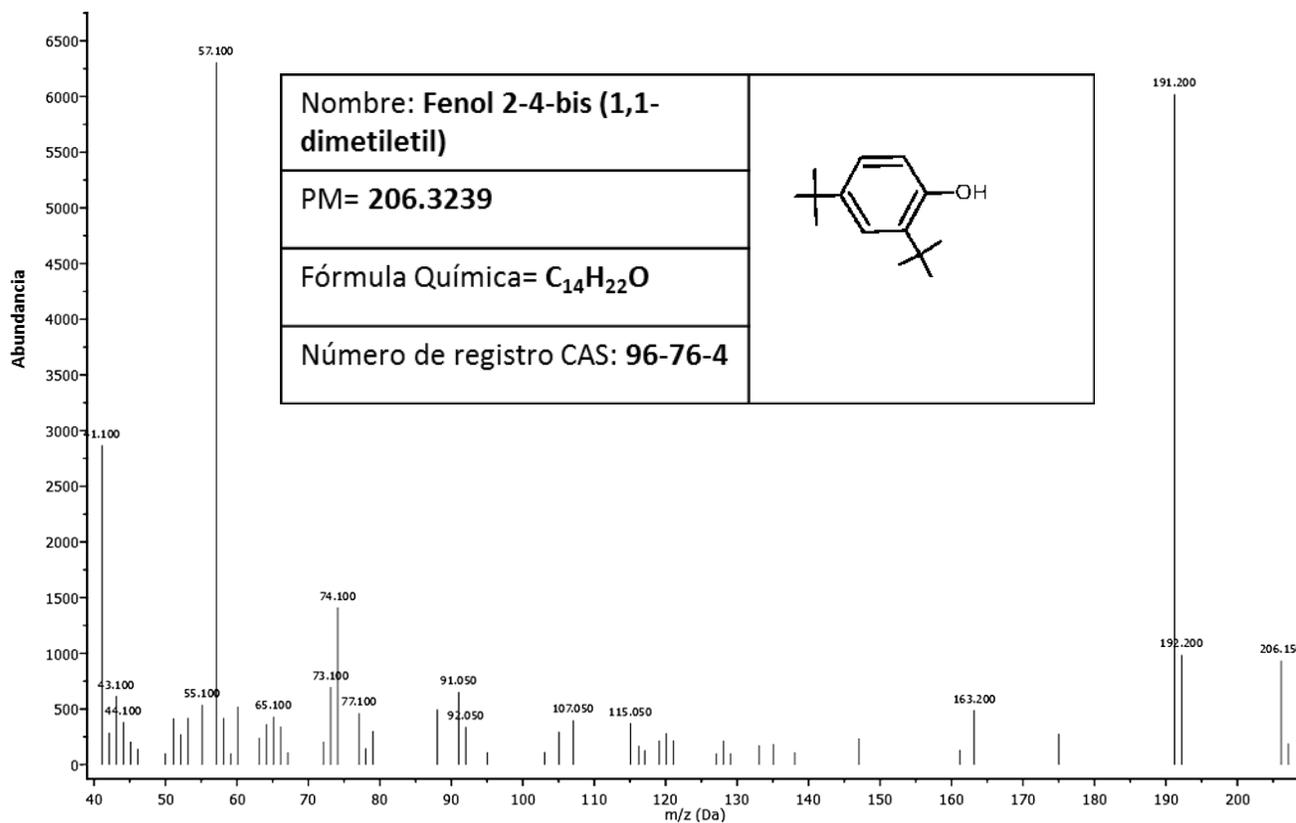
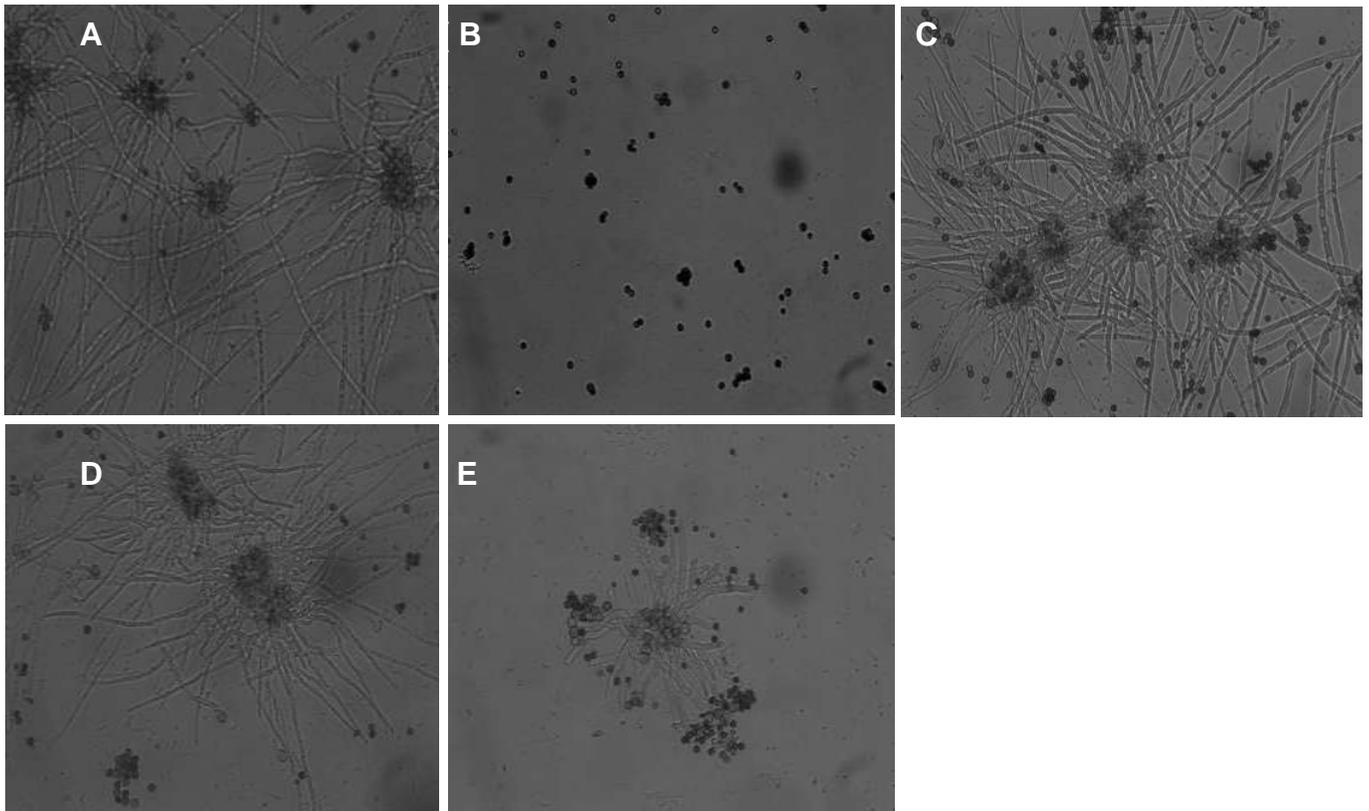


Figura 11. Identificación de los compuestos aislados del extracto de raíz de aguacate tratado con AS. (a) Cromatograma de gases. Se indica un pico mayoritario con un tiempo de retención de 12.18 minutos correspondiente al compuesto fenol 2,4-bis (1,1-dimetiletil). (b) Espectro de masas y estructura molecular del fenol 2,4-bis (1,1-dimetiletil).

(a)



(b)

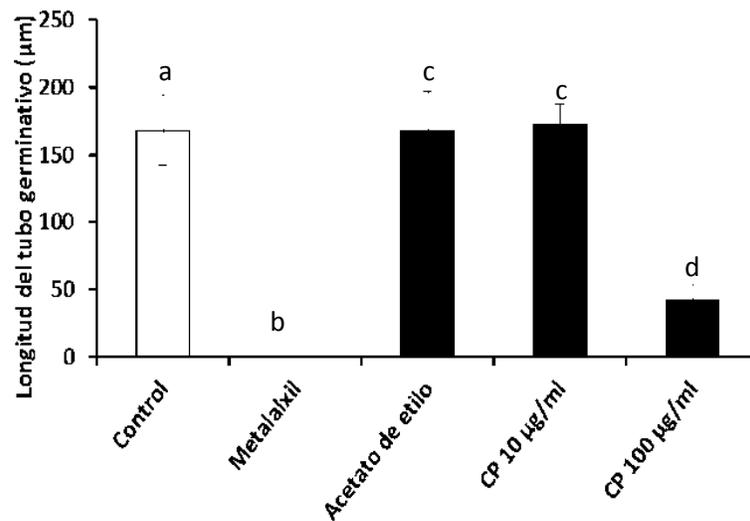
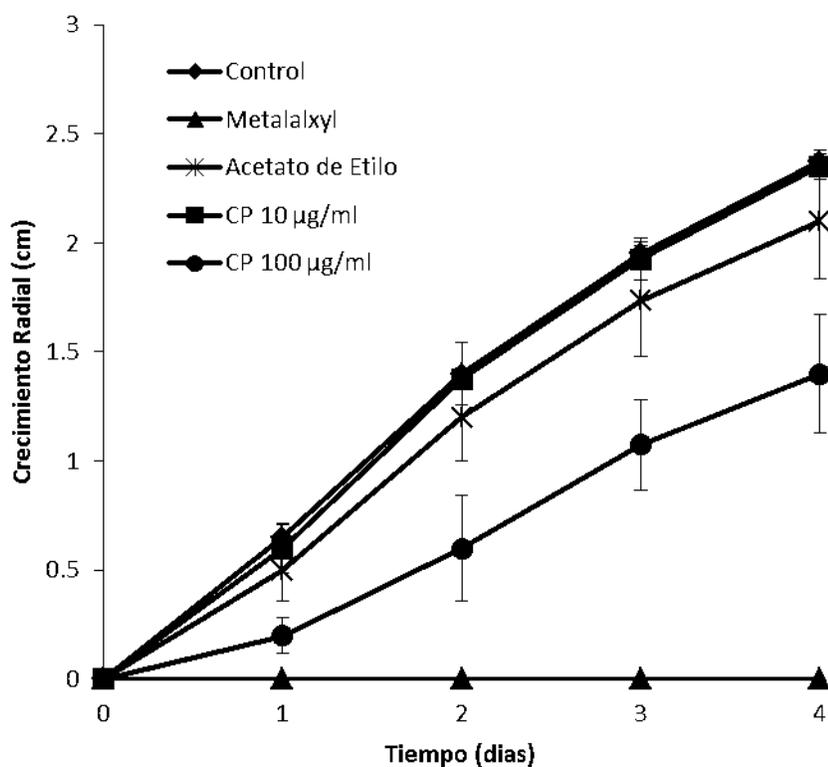


Figura 13. Efecto del fenol 2,4-bis (1,1-dimetiletil) sobre la longitud del tubo germinativo de *Aspergillus* spp. Fotografías representativas tomadas a 40x de amplificación. (a) Control [A]. Metalaxyl [B]. Acetato de etilo [C]. Compuesto 10 µg/ml [D]. Compuesto 100 µg/ml [E]. (b) Longitud del tubo germinativo. Los datos representan la media ± DE de tres experimentos independientes con n=4. Letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

A continuación, las esporas fueron incubadas en presencia del compuesto y se observó una menor longitud en el tubo germinativo de las esporas en presencia del compuesto, en comparación con tratamiento control (Figura 13 a y b).

(a)



(b)

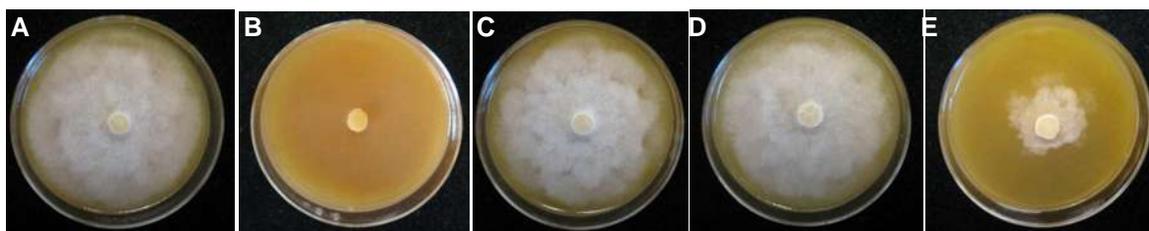


Figura 14. Efecto del compuesto purificado sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*. (a) Crecimiento micelial. El efecto sobre el crecimiento micelial en las placas se evaluó durante 4 días a partir de la inoculación del propágulo. El tratamiento control se consideró como el 0% de inhibición, mientras que el tratamiento con metalaxyl fue considerado como el 100% de inhibición. (b) Crecimiento radial medido en intervalos de 24 horas durante 4 días. Control [A], Metalaxyl [B], Metanol [C], CP 10 µg/ml [D], CP 100 µg/ml [E]. El experimento se realizó por duplicado con una n=4.

Con este resultado confirmamos que el compuesto que se aisló de la raíz de aguacate, tiene actividad antimicrobiana.

Finalmente, evaluamos el efecto de este compuesto sobre *P. cinnamomi in vitro*. A la concentración de 100 µg/ml el compuesto se observó una disminución en el crecimiento del micelio de *P. cinnamomi* de aproximadamente un 60% con respecto al tratamiento control (Fig. 15).

8. CONCLUSION

Se identificó un compuesto llamado fenol 2-4-bis (1,1-dimetiletil) en extractos de raíz de aguacate tratados con ácido salicílico, el cual mostro actividad antimicrobiana.

- Adie, B.A. Pérez-Pérez, J. Pérez-Pérez, M. Godoy, M. Sánchez-Serrano, J.J. Schmelz, E.A. y R. Solano. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 19: 1665–1681.
- Anand, A. Schmelz, E.A. y S. Muthukrishnan. (2003). Development of a lesion-mimic phenotype in a transgenic wheat line overexpressing genes for pathogenesis-related (PR) proteins is dependent on salicylic acid concentration. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 916–925.
- Balbi, V. y A. Devoto. (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist*. 177: 301-318.
- Bellés, J.M. Garro, R. Fayos, J. Navarro, P. Primo, J. y V. Conejero. (1999). Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12: 227–35.
- Bi, Y.M. Kenton, P. Mur, L. Darby, R. y J. Draper. (1995). Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *The Plant Journal*. 8: 235-245.
- Broekaert, W.F. Delaure, S.L. De Bolle, M.F. y B.P. Cammue. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review Phytopathology*. 44: 393–416.
- Catinot, J. Buchala, A. Abou-Mansour, E. y J.P. Métraux. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochlorogenic acid in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters*. 582: 473–478.
- Chen, Z. Silva, H. y D.F. Klessig. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*. 262: 1883-1885.
- Dean, J.V. Mohammed, L.A. y T. Fitzpatrick. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*. 221: 287–296.
- Delaney, T.P. Uknes, S. Vernooij, B. Friedrich, L. Weymann, K. Negrotto, D. Gaffney, T. Gut-Rella, M. Kessman H. Ward E. y J. Ryals. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247–1250.

- Durner, J. Shah, J. y D.F. Klessig. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*. 2:266–74.
- Gaffney, T. Friedrich, L. Vernooij, B. Negrotto, D. Nye, G. *et al.* (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. 261: 754–756.
- Garcion, C. y J.P. Métraux. (2006). Salicylic acid. In *Plant Hormone Signaling*, 24: 229–255. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Goodman, R.N. y A.J. Novacky. (1994). The hypersensitive reaction in plants to pathogens. St Paul: APS Press.
- Humphreys, J.M. y C. Chapple. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 224-229.
- Hwang, S.H. Lee, I.A. Yie, S.W. D.J. Hwang. (2008). Identification of an OsPR10a promoter region responsive to salicylic acid. *Planta*. 227: 1141–1150.
- Kogel, K.H. Beckhove, U. Dreschers, J. Münch, S. Y. Rommé . (1994). Acquired resistance in barley: the resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiology*. 106: 1269–1277.
- Leon, J. Lawton, M.A. y I. Raskin. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*. 108: 1673-1678.
- Li, J. Brader, G. y T. Palva. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell*. 16: 319-331.
- Loake, G. y M. Grant. (2007). Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 466-472.
- Lorenzo, O. y R. Solano. (2005). Señalización de ácido jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal.net*. 1: 1-16.
- Malamy, J. y D.F. Klessig. (1992). Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant Journal*. 2: 643–654.
- Mauch-Mani, B. y J.P. Metraux. (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*. 82: 535-540.

- Métraux, J.P. y I. Raskin. (1993). Role of phenolics in plant disease resistance. In *Biotechnology in Plant Disease Control*, ed. I Chet, 11:191–209. New York: JohnWiley & Sons.
- Morris, S.W. Vernooij, B. Titatarn, S. Starrett, M. Thomas, S. *et al.* (1998). Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11: 643–658.
- Neuenschwander, U. Vernooij, B. Friedrich, L. Uknes, S. Kessmann, H. y J. Ryals. (1995). Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance?. *Plant Journal*. 8: 227-233.
- Park, S.W. Kaimoyo, E. Kumar, D. Mosher, S. y D.F. Klessig. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*. 318:113–116.
- Petersen, M. Brodersen, P. Naested, H. Andreasson, E. Lindhart, U. Johansen, B. Nielsen, H.B. Lacy, M. Austin, M.J. Parker, J.E. Sharma, S.B. Klessig, D.F. y R. Martienssen. (2000). *Arabidopsis* Map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*. 103: 1111-1120.
- Raskin I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 43: 439-463.
- Shulaev, V. Silverman, P. y I. Raskin. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*. 385: 718–721.
- Spoel, S.H. Johnson, J.S. y X. Dong. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 18842–18847.
- Strawn, M.A. Marr, S.K. Inoue, K. Inada, N. Zubieta, C. *et al.* (2007). *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *J. Biol. Chem*. 282: 5919–5933.
- Summermatter, K. Sticher, L. y J.P. Métraux. (1995). Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology*. 108: 1379-1385.
- Uppalapati, S.R. Ishiga, Y. Wangdi, T. Kunkel, B.N. Anand, A. *et al.* (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 955–965.

- Van Loon, L.C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology*. 103: 753-765.
- Verberne, M.C. Verpoorte, R. Bol, J.F. Mercado-Blanco, J. y H.J.M. Linthorst. (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*. 18: 779–783.
- Vernooij, B. Friedrich, L. Goy, P.A. Saub, T. y H. Kessmann. *et al.* (1995). 2,6-dichloroisonicotinic acid induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 8: 228–234.
- Vlot, A.C. Dempsey, D.A. y D.F. Klessig. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47: 177-206.
- Wildermuth, M.C. Dewdney, J. Wu, G. y F.M. Ausubel. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*. 414: 562-571.