



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

**Inducción de respuestas de defensa con
estimuladores en raíces de aguacate criollo en
contra de *Phytophthora cinnamomi* Rands**

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta

QFB. Diana Edith Madrigal Silva

Asesor: D.C. Ernesto García Pineda

Co-asesor: D.C. Homero Reyes de la Cruz

Morelia, Michoacán México. Enero 2013.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS, DEPENDIENTE DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES ERNESTO GARCÍA PINEDA Y HOMERO REYES DE LA CRUZ.

RECONOCIMIENTOS

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CLAVE Y EL CONSEJO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA.

AGRADECIMIENTOS

AL EQUIPO DE TRABAJO POR PERMITIR QUE ESTE TRABAJO FUERA POSIBLE LOS DOCTORES: BELTRAN PEÑA ELDA, VALENCIA CANTERO EDUARDO, REYES DE LA CRUZ HOMERO, SALGADO GARCIGLIA RAFAEL Y GARCIA PINEDA ERNESTO. TAMBIÉN A TODOS AQUELLAS PERSONAS QUE ME HAN APOYADO. MUY ESPECIALMENTE A MIS PADRES.

DEDICATORIA

A Roberto

A mi familia por ser parte de mis proyectos y por el apoyo que me brindan.

A mi pilar de enseñanza D.C. Ernesto García Pineda por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo, por su ejemplo lleno de virtudes y talento, su confianza, amistad y apoyo en todo momento, mi admiración y respeto... Gracias.

A mi comité tutorial por sus valiosas aportaciones en este trabajo.

A la M.C. Elda Castro Mercado por su apoyo y asesoramiento constante e incondicional a lo largo del proyecto, por su amistad... Gracias.

A mis amigos y compañeros del laboratorio por compartir conmigo este proyecto y por todos los momentos vividos.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.	III
DEDICATORIA.	IV
ÍNDICE GENERAL.	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.	XII
ÍNDICE DE TABLAS.	XIV
RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
2. ANTECEDENTES.	4
2.1 Las enfermedades de las plantas inducidas por agentes bióticos y abióticos.	4
2.2 Las respuestas de defensa activadas por microorganismos.	6
2.2.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS).	7
2.2.2 Proteínas relacionadas a patogénesis.	9
2.2.3 Respuestas de la defensa mediadas por las fitoalexinas.	11
2.3 Señalización de las respuestas de defensa inducida.	12

	PÁGINA
2.4 Estimuladores de respuestas de defensa en las plantas.	15
2.5 Mecanismos de defensa implicados en las respuestas producidas por los estimuladores.	17
2.6 Respuestas de defensa mediadas por la riboflavina.	18
2.7 Función del ácido araquidónico (AA) en las plantas.	19
2.8 Características botánicas del aguacate.	20
2.9 Características del oomiceto <i>Phytophthora cinnamomi</i>.	22
2.10 Ciclo de vida de <i>Phytophthora cinnamomi</i>.	23
2.11 Condiciones ambientales optimas para el desarrollo de <i>P. cinnamomi</i>.	25
2.12 Interacción y propagación de <i>Phytophthora cinnamomi</i> con las plantas.	25
2.13 Pudrición de las raíces de aguacate por <i>Phytophthora cinnamomi</i>.	26
2.14 Control de la pudrición de la raíz del aguacate.	26
3. JUSTIFICACIÓN.	27

	PÁGINA
4. HIPÓTESIS.	27
5. OBJETIVO GENERAL.	28
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.	28
6. MATERIALES Y METODOS.	29
6.1 Material vegetal y condiciones de almacenamiento.	29
6.2 Producción de esporangios y liberación de las zoosporas de <i>Phytophthora cinnamomi</i>.	29
6.3 Sistema de infección <i>in vitro</i> con zoosporas de <i>P. cinnamomi</i>.	30
6.4 Análisis de la colonización de raíz por zoosporas de <i>P. cinnamomi</i>.	30
6.5 Determinación de la viabilidad del tejido de raíz.	31
6.6 Estimulación de raíces de plántulas de aguacate criollo.	31
6.7 Bioensayo para determinar el efecto de la riboflavina y el ácido araquidónico sobre el crecimiento de <i>P. cinnamomi</i>.	32
6.8 Determinación de peróxido de hidrógeno.	33
6.9 Determinación de fenoles totales.	33

	PÁGINA
6.10 Obtención de extractos metanólicos de los tejido de la raíz de aguacate criollo.	34
6.11 Obtención de los extractos de acetato de etilo del tejido de raíz de aguacate criollo.	34
6.12 Obtención de los extractos hexánicos del tejido de raíz de aguacate criollo.	35
6.13 Bioensayo para determinar el efecto de los extractos metanólicos de la raíz de aguacate criollo en <i>P. cinnamomi</i> .	36
6.14 Efecto de los extractos metanólicos sobre la germinación de las zoosporas de <i>P. cinnamomi</i> .	36
6.15 Efecto de los extractos de raíz en el desarrollo de <i>P. cinnamomi</i> .	37
6.16 Análisis de los extractos de raíz en el desarrollo de <i>P. cinnamomi</i> .	38
6.17 Cuantificación del desarrollo de <i>P. cinnamomi</i> con los extractos hexánicos de raíz.	39
6.18 Análisis estadístico de los datos obtenidos en los experimentos	40
7. RESULTADOS.	41
7.1 La colonización de las raíces de aguacate criollo por <i>Persea americana</i> Mill Variedad Drymifolia por zoosporas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .	41

	PÁGINA
7.2 Los tratamientos en el tejido de raíz de aguacate criollo no afectan su viabilidad.	43
7.3 Efecto de los estimuladores en el crecimiento de <i>P. cinnamomi</i>	45
7.4 Efecto de los estimuladores en la raíz de aguacate sobre la producción del peróxido de hidrógeno.	47
7.5 Efecto de los estimuladores en la raíz de aguacate en la producción de fenoles totales.	49
7.6 Efecto de extractos metanólicos sobre el desarrollo de <i>Phytophthora cinnamomi</i>.	51
7.7 Efecto de los extractos metanólicos sobre la germinación de <i>Phytophthora cinnamomi</i>.	53
7.8 Efecto de los extractos de raíz tratada con 1mM de ácido araquidónico y 5mM de riboflavina en el desarrollo de <i>Phytophthora cinnamomi</i>.	55
7.9 Efecto de los extractos metanólicos, de acetato de etilo y hexánicos de raíz tratada con 1mM de AA y 5mM de R en el desarrollo de <i>Phytophthora cinnamomi</i>.	58
7.10 Efecto de los extractos hexánicos de la raíz tratada con ácido araquidónico y riboflavina sobre el desarrollo de <i>P. cinnamomi</i>.	61
7.11 Efecto del extracto hexánico de raíz tratada con 1mM de ácido araquidónico sobre el desarrollo de <i>Phytophthora cinnamomi</i>.	63

	PÁGINA
8. DISCUSIÓN.	67
9. RESUMEN DE RESULTADOS.	72
10. CONCLUSIÓN.	73
11. PERSPECTIVAS.	74
12. LITERATURA CITADA.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 Funciones del peróxido de hidrógeno en las respuesta de defensa de las plantas.	8
Figura 2 Representación de la señalización de las respuestas de defensa inducida en la célula vegetal.	14
Figura 3 Las raíces del aguacate.	21
Figura 4 Ciclo de vida de <i>P. cinnamomi</i> .	24
Figura 5 Colonización de tejido de raíz de aguacate criollo con zoosporas de <i>P. cinnamomi</i> .	42
Figura 6 Efecto de los tratamientos en el tejido de raíz sobre la viabilidad celular.	44
Figura 7 Efecto de los estimuladores en el desarrollo de <i>P. cinnamomi</i> .	46
Figura 8 Efecto del ácido araquidónico y la riboflavina sobre la producción de peróxido de hidrógeno en la raíz de aguacate.	48
Figura 9 Efecto del ácido araquidónico y la riboflavina sobre el contenido de fenoles totales.	50

Figura 10 Efecto de los extractos metanólicos sobre el desarrollo de <i>P. cinnamomi</i>.	52
Figura 11 Efecto de extractos metanólicos de raíz sobre la germinación de <i>P. cinnamomi</i>.	54
Figura 12 Efecto de los extractos de raíz tratada con 1mM de AA y 5mM de R en el desarrollo de <i>P. cinnamomi</i>.	57
Figura 13 Efecto de los extractos de raíz tratada con 5mM de riboflavina y 1mM de ácido araquidónico.	60
Figura 14 Efecto de los extractos hexánicos de raíz estimulada con 1 mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina en el desarrollo de <i>P. cinnamomi</i>.	62
Figura 15 Efecto del extracto hexánico de raíz estimulada con ácido araquidónico sobre el desarrollo de <i>P. cinnamomi</i>.	64
Figura 16 Efecto del extracto hexánico de la raíz aplicado a los 6 días del desarrollo de <i>P. cinnamomi</i>.	66

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1 Las familias de las proteínas relacionadas a patogénesis.	10
Tabla 2 Estimuladores de respuestas de defensa en plantas.	15
Tabla 3 Tratamientos para bioensayo en medio PDA/V8.	32

RESUMEN

El fruto de aguacate es un producto vegetal que posiciona a México como líder mundial en su producción, sin embargo el cultivo es susceptible al daño provocado por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* el cual conduce a pérdidas millonarias en su producción. En el presente estudio analizamos el efecto de dos estimuladores de respuestas de defensa: el ácido araquidónico y la riboflavina en tejido de raíz de aguacate criollo, el cual sirve como porta injerto del cultivar Hass. Como los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que ambos estimuladores inhiben el crecimiento del micelio del oomiceto, analizamos el efecto de dichos estimuladores sobre algunas respuestas bioquímicas implicadas en la defensa: la producción de peróxido de hidrógeno y fenoles totales. Los resultados obtenidos mostraron que las respuestas bioquímicas analizadas se comportan de forma semejante en el tejido no estimulado. Experimentos realizados con extractos hexánicos, en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad contra *Phytophthora cinnamomi*, mostraron un comportamiento distinto en el desarrollo del oomiceto. Por un lado los extractos del tejido tratado con riboflavina estimularon la formación de clamidosporas, mientras que los extractos de tejido estimulado con ácido araquidónico tuvieron un efecto destructivo en el micelio de *P. cinnamomi*.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas continuamente se enfrentan al estrés biótico provocado por los ataques de bacterias, hongos, oomiceto, insectos y virus, así como a factores abióticos como el viento, la temperatura, los herbicidas y la deficiencia de nutrientes. En la rizosfera tiene lugar una interacción dinámica entre las plantas y los microorganismos a través de los compuestos producidos por ambos, lo que conduce a numerosas interacciones entre procesos celulares coordinados. Sin embargo, los microorganismos patógenos usan distintas estrategias para nutrirse y reproducirse en las plantas, activando respuestas que inducen la defensa en la planta, como la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO'S), la síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis (PR's) y compuestos antimicrobianos que al actuar en conjunto garantizan la supervivencia de las plantas (Hardman et al., 2004). El mecanismo de defensa antes mencionado es posible por las diversas señalizaciones intracelulares que activan estas respuestas en las plantas (Riveros, 2004). Reportes recientes han mostrado que los agentes bióticos y abióticos que activan varios sistemas de transducción de señales en las plantas, inducen respuestas de defensa, dichos agentes son conocidos como estimuladores de la defensa y son eficaces en el control de numerosas enfermedades ocasionadas por virus, bacterias y hongos (Graham y Leite, 2004). Los estimuladores de la defensa inducen varias reacciones, como la producción de fitoalexinas, proteínas antimicrobianas, reacciones de oxidación y cambios estructurales a nivel de la pared celular (Métraux et al., 2004). Un ejemplo de un estimulador disponible en Europa y Estados Unidos es el Actigard, el cual se ha utilizado para el manejo de diferentes enfermedades provocadas por virus bacterias y hongos en cultivos de manzana, pera, pepino, maíz, arroz, mango, chile y algodón entre otros (Oostendorp et al., 2001).

Algunos estimuladores como el ácido salicílico, ha sido ampliamente estudiado para explicar cómo se induce las respuestas de defensa en las plantas; mientras que otros como la riboflavina y el ácido araquidónico han sido escasamente analizados. La riboflavina es una vitamina hidrosoluble conocida como B2 que pertenece al grupo de pigmentos amarillos fluorescentes que se producen en las plantas y microorganismos. La riboflavina ha sido utilizada como un estimulador de defensa en algunos cultivos, como tabaco en donde se ha observado que altas concentraciones de la vitamina no fitotóxicas son necesarias para inducir las respuestas de defensa (Dong y Beer 2000). Por otra parte, el ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado presente en las membranas celulares de mamíferos que por procesos de oxidación produce ácidos grasos con actividad biológica como los tromboxanos y las prostaglandinas. Arreola et al., 2007 reportaron en Chile, que el ácido araquidónico fue capaz de inducir la acumulación de la fitoalexina capsidiol, la cual presenta efectos antimicrobianos. Sin embargo, no existen otros reportes que indiquen su papel como estimulador de respuestas de defensa, lo que sería un campo de investigación interesante con potencial para la estimulación de respuestas de defensa en plantas. La aplicación de estimuladores como el Actinogard en cultivos agrícolas como arroz y tabaco ha permitido el control de enfermedades que conducen a pérdidas económicas en los cultivos. Siendo el aguacate criollo el porta-injerto para el cultivar Hass, susceptible a enfermedades que afectan la calidad del fruto, y dañan al follaje, tronco y raíces. Principalmente estas últimas son afectadas por una enfermedad devastadora del cultivo, producida por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. No obstante lo antes mencionado, no existen reportes que indiquen la inducción de respuestas de defensa en el cultivo con estimuladores, por lo que el presente trabajo se enfocará al análisis de algunas respuestas inducidas por la riboflavina y el ácido araquidónico en aguacate criollo debido a que la enfermedad afecta en diferentes grados alrededor del 5% de la superficie cultivada (Ochoa, 2008). Aunado a esto no se ha podido controlar la enfermedad con el uso de fungicidas, los cuales provocan daños fisiológicos en el cultivo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Las enfermedades de las plantas inducidas por agentes bióticos y abióticos

Las plantas en su medio ambiente interactúan con múltiples organismos que pueden ocasionarles efectos dañinos, los cuales potencialmente causan enfermedades. Suceso que requiere que el patógeno emplee estrategias para encontrar una planta huésped, pasar a través de las capas externas de protección de la planta, así como tener acceso a la maquinaria celular y a los nutrientes que requiere para crecer y diseminarse (Dickinson, 2003).

Las enfermedades de las plantas son la manifestación de las respuestas de las células y tejidos a dos tipos de factores; los primeros son los agentes bióticos que incluyen a los virus, bacterias, hongos y oomicetos, donde los hongos y oomicetos son los patógenos más comunes en las plantas (Latijnhouwers et al., 2003), seguido de las bacterias y los nematodos. Las enfermedades por virus no se registran a menudo, porque son difíciles de detectar (Rodríguez, 1992).

A continuación se describe la forma de colonización de algunas especies de hongos y oomicetos:

- Los biotrofos crecen y se reproducen en tejido viviente de las plantas obteniendo sus nutrientes a través de interacciones con las células vivas. Un ejemplo de un hongo es *Cladosporium fulvum* y de oomicetos biotrofos: *Perenosporaceae* y *Albuginaceae* (Tuckers et al., 2001).

- Los necrotrofos matan el tejido antes de la colonización y se alimentan de las células vegetales muertas, ejemplos de algunas especies de hongos necrotrofos son: *Cochliobolus* y *Botrytis*, mientras que para oomicetos se encuentra el género *Pythium* y *Aphanomyces* (Rodríguez Suppo, 1992).
- Ejemplos de hemibiotrofos son los hongos *Magnaporthe grisea* y varias especies del género *Colletotrichum* y oomicetos del género *Phytium* y *Phytophthora*. Estos organismos inicialmente establecen una relación biotrofa con su hospedero, pero subsecuentemente las células del hospedero mueren como producto de la infección (Rodríguez Suppo, 1992).

A pesar del gran número de estos patógenos, en la mayoría de los casos las plantas son capaces de contrarrestar los efectos nocivos de los microorganismos, esta resistencia se debe a la ausencia de los factores esenciales de susceptibilidad del hospedero (resistencia pasiva) o a la existencia de varios sistemas de defensa como ERO'S, el peróxido de hidrógeno que los microorganismos patógenos deben de superar.

Por otra parte, agentes abióticos pueden ocasionar un desbalance nutricional fenómeno conocido como "síndrome del suelo", lo anterior debido a la deficiencia de diversos elementos minerales esenciales como: fósforo, nitrógeno, calcio, azufre, al contenido de materia orgánica, al estrés ambiental (por temperatura/humedad), a la toxicidad química (causada por plaguicidas) y contaminantes del aire (Ramírez - Rodríguez et al., 2005).

2.2 Las respuestas de defensa activadas por microorganismos

Las plantas para sobrevivir al ataque de microorganismos fitopatógenos, han desarrollado mecanismos complejos que llegan a activarse por algunos agentes abióticos o por microorganismos iniciadores de las respuestas de defensa.

Frecuentemente se activan respuestas complejas para salvar a las plantas de la destrucción por patógenos que involucran la activación transcripcional de numerosos genes relacionados a defensa como las proteínas relacionadas a patogénesis, la modificación del estado de fosforilación de las proteínas y de enzimas preformadas que alteran el metabolismo primario y secundario, asegurando con ello la coordinación de las respuestas de defensa que rápidamente detienen al patógeno (Delledone et al., 2001).

En las células ocurren respuestas inmediatas para privar a los patógenos biotrofos del acceso de nutrientes, como la respuesta hipersensible que inicia con la regulación de la muerte celular programada y la síntesis de compuestos tóxicos y radicales que dan como resultado la necrosis visible del tejido invadido por el patógeno (Dixon y Lamb, 1990).

A continuación se describirán algunas de las respuestas activadas en el proceso de defensa.

- Especies reactivas de oxígeno (ROS).
- Proteínas relacionadas a patogénesis (PR).
- Respuestas mediadas por fitoalexinas.

2.2.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El peróxido de hidrógeno es generado en las plantas después de la exposición a una gran diversidad de estréses bióticos y abióticos y ha sido demostrado que induce numerosas respuestas celulares. Por ejemplo conduce a la activación de algunas respuestas como la hipersensibilidad, la síntesis de H_2O_2 y la muerte celular programada, involucrando complejos procesos redox que requieren la participación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y óxido nítrico entre otros.

En gran cantidad de interacciones la producción de ROS es la primera respuesta detectada que ocurre en menos de 5 minutos, donde las especies típicas detectadas son el ion superóxido O_2^- y H_2O_2 (Wojtaszek, 2006).

Las plantas producen el ion superóxido a partir de oxígeno molecular y una NADPH oxidasa de la membrana plasmática, dicho ion sintetizado fuera de la célula se convierte en H_2O_2 . Este último es la molécula que atraviesa la membrana plasmática y entra a la célula de las plantas donde induce la expresión de genes de proteínas involucradas en los mecanismos de protección celular.

Varios papeles han sido propuestos para las especies reactivas de oxígeno como una respuesta de defensa en las plantas, en la figura 1 se muestra algunas funciones. Por ejemplo el H_2O_2 es un tóxico directo para los microorganismos patógenos y en presencia del hierro genera el radical OH^- extremadamente reactivo. El OH^- alternativamente contribuye al reforzamiento estructural de la pared celular de las plantas debido al entrecruzamiento de hidroxiprolinas y glicoproteínas ricas en prolina. (Vorwerk et al., 2004). Lo antes mencionado contribuye a que la pared celular sea más resistente a la penetración de microorganismos y a la degradación enzimática.

También, otra función en la señalización por H_2O_2 consiste en inducir la actividad enzimática de la ácido benzoico 2-hidroxilasa (BA-2H), la cual se requiere en la biosíntesis del ácido salicílico (Vasyukova y Ozeretskovskaya, 2006).

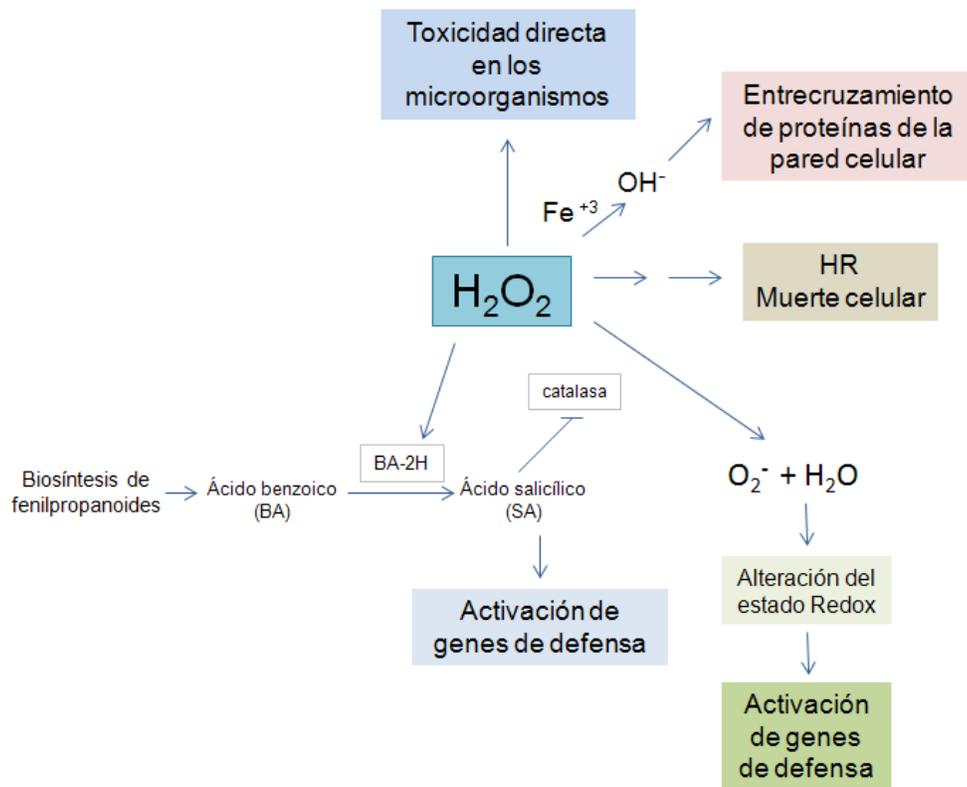


Figura 1. Funciones del Peróxido de hidrógeno en las respuesta de defensa de las plantas. Interconexión del H_2O_2 en la activación de las reacciones de defensa en las plantas (Vasyukova y Ozeretskovskaya, 2006).

2.2.2 Proteínas relacionadas a la patogénesis

Adicionalmente a la generación de las especies reactivas de oxígeno y la respuesta hipersensible, se induce la síntesis de nuevas proteínas en las plantas durante el ataque de un patógeno (hongos, virus, bacterias y oomicetos) local y sistémicamente. Dichas proteínas se conocen colectivamente como proteínas relacionadas a patogénesis o PR y han sido detectadas en una amplia variedad de plantas.

El papel bioquímico de la mayoría de estas proteínas ha sido determinado y a la fecha se agrupan en 17 familias de acuerdo a su homología (Tabla 1) (Dickson, 2003).

Un ejemplo es la inducción de las quitinasas, las cuales están involucradas en la degradación de la quitina (componente de la pared celular de las hifas del hongo *Colletotrichum lagenarium*) (Ishii et al., 1999). Además de interferir en el desarrollo del hongo también se liberan oligosacáridos del hongo que pueden amplificar otras respuestas de defensa en la planta.

Algunas proteínas como las PR-1 y PR-5 han mostrado que inhiben el desarrollo de los oomicetos, el papel bioquímico de la PR-1 aún no es claro, mientras que la PR-5 participa en la hidrólisis de glucanos y apoptosis del tejido (Zimmerli et al., 2000).

Tabla 1. Familias de las proteínas relacionadas a patogénesis (Dickson 2003; Rodríguez et al., 2010).

Familia	Miembro tipo	Propiedades
PR-1	PR-1a Tabaco	14-17kD
PR-2	PR-2 Tabaco	Clase I, II y III endo-beta-1,3-glucanasas, 25-35kD
PR-3	P, Q Tabaco	Clase I, II, IV, V, VI y VII <u>endoquitinasas</u> , 30kD
PR-4	R Tabaco	Actividad <u>endoquitinasa</u> , <u>antifúngica</u> , 13-19kD
PR-5	S Tabaco	Proteína tipo <u>taumatina</u> , <u>osmotina</u> , <u>zeamatina</u> , <u>permeatina</u> , similar a <u>inhibidores alfa-amilasa/tripsina</u> , <u>antifúngica</u>
PR-6	Inhibidor I Jitomate	Inhibidores de proteasas, 6-13kD
PR-7	P69 Jitomate	Endoproteasas
PR-8	Quitinasa Pepino	Clase III quitinasas, <u>quitinasa</u> / <u>lisasima</u>
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina	Peroxidasas, proteínas tipo <u>peroxidasas</u>
PR-10	PR-1 Perejil	Ribonucleasas, Proteínas- <u>Bet</u> v 1 -relacionadas
PR-11	Clase V Quitinasa Tabaco	<u>Endoquitinasa</u>
PR-12	Ps-AFP3 Rábano	<u>Defensinas</u>
PR-13	THI2.1 Arabidopsis	<u>Tioninas</u>
PR-14	LTP4 Cebada	Proteínas transportadoras de lípidos no-específicas (<u>ns-LTPs</u>)
PR-15	<u>OxOa</u> Cebada	Oxalato oxidasa
PR-16	<u>OxOLP</u> Cebada	Proteínas tipo oxalato-oxidasa
PR-17	PRp27 Tabaco	Se desconoce

2.2.3 Respuestas de la defensa mediada por las fitoalexinas

Las fitoalexinas son compuestos de naturaleza lipofílica, tóxicos para un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas de las plantas, principalmente son flavonoides de bajo peso molecular que se acumulan rápidamente en los sitios de infección del patógeno. Dichos compuestos constituyen un grupo químicamente heterogéneo, donde se han identificado cerca de 150 metabolitos distribuidos dentro de los grupos de los isoflavonoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, poliacetilenos, dihidrofenantrenos y estilbenos (García y Pérez, 2003).

Aunque el mecanismo de inducción de la producción de fitoalexinas aún no es claro, se han descrito varios inductores como los polisacáridos, glicoproteínas, péptidos y ácidos grasos (Reichling, 1999).

Los primeros reportes sobre la presencia de las fitoalexinas fueron descritos por Muller y Borger (Kuc, 1995) al observar en un cultivo de papa la producción de compuestos fungitoxicos en contra del oomiceto *Phytophthora infestans*. La mayoría de las fitoalexinas se han identificado en familias Leguminosae y Solanaceae; como un sesquiterpenoide en tomate *Lycopersicon esculentum* (Reichling 1999). También se ha reportado la presencia de la gliceolina, fitoalexina de naturaleza fenólica sintetizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL) en células de soya (García y Pérez, 2003). Fitoalexinas de carácter amídico reportadas por Ramos et al., 1997 como las fenolamidas, confieren resistencia a *Phoenix dactylifera* frente a *Fusarium oxysporum*.

El mecanismo por el cual las fitoalexinas alcanzan su efecto tóxico no es claro, sin embargo, considerando su diversidad estructural se ha propuesto que interactúan con diversos sitios celulares causando una disfunción en la integridad de la membrana.

2.3 Señalización de las respuestas de defensa inducida

Existen múltiples tipos de reacciones de defensa en cada célula que son transmitidos para la detección del ataque de un patógeno (virus, bacteria, hongo y oomiceto) en las plantas. Esto sucede mediante un vínculo entre las células vegetales con las moléculas liberadas por el patógeno, estas últimas pueden ser fragmentos de proteínas que se unen a un receptor en la superficie celular o a receptores membranales dando como resultado la fosforilación del receptor y la iniciación de cascadas de transducción que activan señales intracelulares. Algunas cascadas pueden involucrar segundos mensajeros como el 3, 5-Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y calcio (Ca^{+2}) intracelular (Catterall, 2008) y/o fosforilación de proteínas cinasas nucleares o citoplasmáticas (Rumbaugh, 2007), así como cambios en la expresión de genes (que codifican a las proteínas PR) y la producción de especies reactivas de oxígeno (Dickinson, 2003).

Sin embargo, en ausencia del reconocimiento del patógeno, ocurre una respuesta de defensa basal que involucra a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's por sus siglas en inglés). Los PAMP's son esenciales para la patogenicidad, tales como la flagelina. En este caso la respuesta de defensa no evita que el patógeno colonice el tejido vegetal, pero si detiene su extensión sobre el tejido (Cortés et al. 2010).

Cuando el patógeno ha liberado algunas enzimas o fragmentos de proteínas, estos se unen al receptor de la membrana celular y provocan su autofosforilación que puede ser

una señal específica por el reclutamiento selectivo de proteínas como las cinasas (Blumwald et al. 1998). Por ejemplo, activando la señalización de la vía de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) a través de las proteínas G se abren los canales de calcio en la membrana plasmática y con ello se inhibe la adenosín trifosfatasa dependiente de calcio (Ca^{+2} -ATPasa), lo cual a su vez previene la liberación del calcio en el apoplasto. Este último evento promueve entonces la síntesis de proteínas relacionadas a defensa y de enzimas de la ruta de fenilpropanoides (Catterall, 2008).

En los animales la señalización de las proteínas G ocurre mediante la fosfolipasa C, el diacilglicerol (DAG) y el inositol fosfato (IP_3), los cuales incrementan los niveles de calcio y de algunas proteínas cinasas C (PK-C). En las plantas, la fosfolipasa C libera el DAG, activa la PK-C y el flujo de calcio. Además el DAG puede ser convertido en ácido fosfatídico (PA), este último funciona como una molécula señalizadora en la respuestas de defensa de la planta (Laxalt y Munnik, 2002).

Por otro lado, el calcio citoplasmático puede unirse al motivo de unión a calcio en la NADPH oxidasa anclada a la membrana plasmática y generar los productos de la reducción secuencial del oxígeno (Glyan'ko e Ischenko, 2010); el radical superóxido que rápidamente dismuta en la célula a través de una superóxido dismutasa en peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.

El peróxido de hidrógeno es la molécula más importante en la señalización por especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a que es capaz de pasar a través de la membrana y activar genes de defensa como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cual es la primera enzima en la vía de biosíntesis del ácido salicílico (Figura 2).

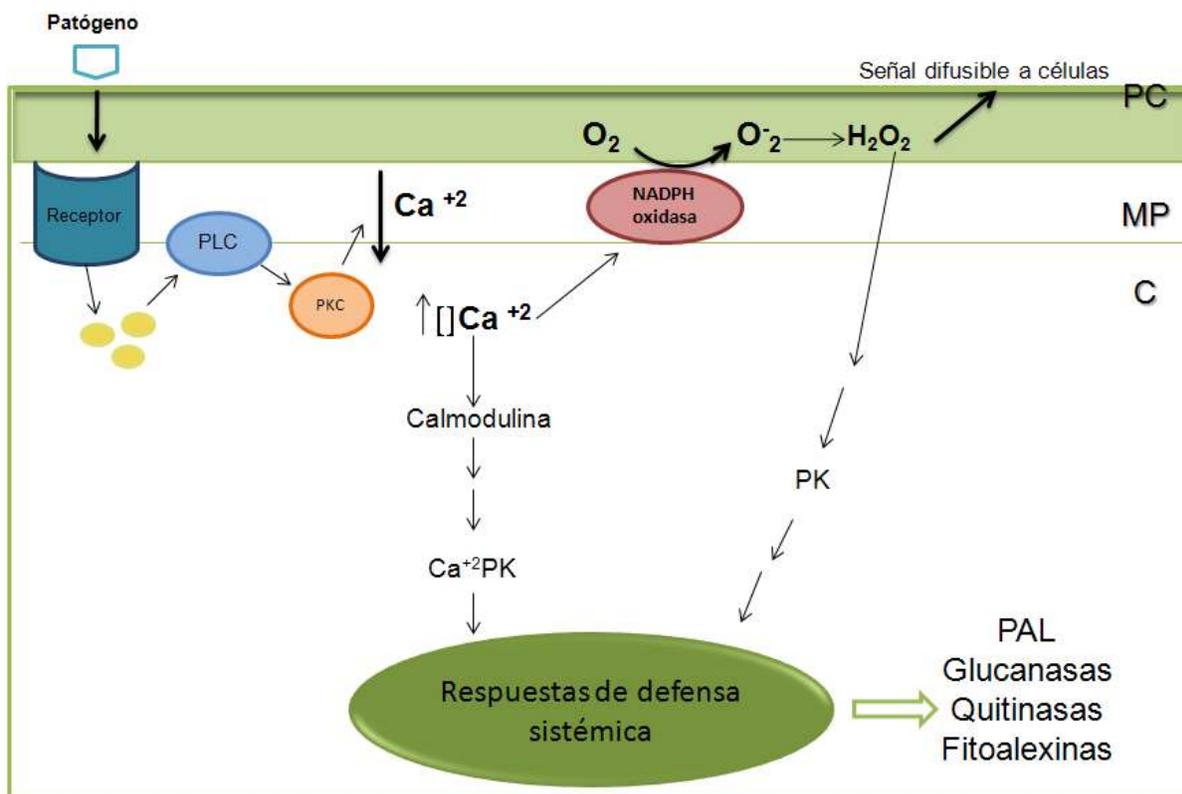


Figura 2. Representación de la señalización de las respuestas de defensa inducidas en la célula vegetal. La defensa vegetal inicia con la percepción de las moléculas liberadas del patógeno y el reconocimiento por el receptor de las células. Lo anterior provoca la activación de cascadas de señalización que resultan en la inducción de la síntesis de enzimas que regulan las rutas biosintéticas de los metabolitos implicados en la defensa, de proteínas relacionadas a patogénesis y de enzimas que generan compuestos antimicrobianos (Riveros, 2004).

2.4 Estimuladores de las respuestas de defensa en las plantas

En años recientes se ha reportado que varios compuestos de diversa naturaleza química, activan los mecanismos de defensa y protección de las plantas contra algunos patógenos como virus, bacterias, hongos y oomicetos.

Dichos compuestos, son conocidos como “estimuladores de defensa en plantas”, este concepto fue utilizado para moléculas capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en ausencia de patógeno y posteriormente se generalizó para cualquier molécula que pueda estimular los mecanismos de defensa o los asociados con la respuesta de defensa vegetal (Riveros, 2004).

Los estimuladores de defensa regulan reacciones de defensa en plantas como la producción de fitoalexinas, de proteínas relacionadas a patogénesis, de reacciones de oxidación y de cambios estructurales a nivel de pared celular entre otros. Estas respuestas de defensa son inducibles en las células vegetales durante su aplicación exógena, expresándose localmente en los sitios de infección y/o sistémicamente en la planta (Vidhyasekaran, 2004).

Los estimuladores pueden tener un papel dual durante la inducción en las plantas; primero activan algunos genes de defensa quiescente o de forma indirecta promueven respuestas de defensa cuando el patógeno invade a las plantas (Conrath et al., 2001).

En la Tabla 2 se presentan algunos estimuladores de defensa usados en el manejo de enfermedades de cultivos, donde se puede observar que estimuladores como el Actinogard, el Ácido Salicílico (SA), el ácido β amino butírico (BABA) y el metil jasmonato, han sido ampliamente utilizados en cultivos agrícolas de tabaco, fresa, algodón, papa, limón y papaya, al ser agentes eficaces para el control de enfermedades producidas por virus, hongos y bacterias. Otros estimuladores como la riboflavina, de la cual existen pocos reportes de su participación en la activación de respuestas de

defensa en plantas, mientras que otros compuestos como el ácido araquidónico, no se ha reportado su papel como estimulador de respuestas de defensa en las plantas.

Tabla 2. Estimuladores de respuestas de defensa en plantas.

Estimulador	Inducción	Patógeno	Cultivo	Referencia
Actinogard (Acibenzolar S-Metil)	Acumulación de Quitinasas	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Pepino	Ishii et al., 1999
Ácido Salicílico	Acumulación de proteínas PR	<i>Virus del Mosaico del Tabaco</i>	Tabaco	Spletzer y Envedi., 1999
BABA (ácido β amino butírico)	Acumulación de Lignina	<i>Peronospora tabacina</i>	Tabaco	Zimmerli et al., 2000
Metil Jasmonato	Síntesis de PAL	<i>Blumeria graminis</i>	Cebada	Walters et al., 2002
Riboflavina	Inducción de Resistencia Sistémica	<i>Peronospora parasitica</i>	Tabaco	Dong y Beer, 2000
Ácido Araquidónico	Capsidiol	?	Chile	Arreola et al. 2007

2.5 Mecanismos de defensa implicados en las respuestas producidas por los estimuladores

Los estimuladores pueden activar genes de defensa a través de diferentes cascadas de transducción de señales del hospedero (Besser et al., 2000). Por ejemplo, el acibenzolar-S-metil es un agente químico utilizado en el control de enfermedades de cultivos y fue desarrollado por Novartis Crop Protection AG., e introducido en 1996 como un estimulador de la defensa vegetal; el tratamiento con este agente de cultivos de rosas indujo respuestas de defensa contra el patógeno *Diplocarpan rosae* que resultaron en la acumulación de varias proteínas relacionadas a patogénesis PR -1, PR -2, PR -3, PR -5, que muestran actividad antimicrobiana (Ishii et al., 1999). El acibenzolar exhibe acción directa sobre el patógeno e induce los mismos genes que el ácido salicílico (Lawton et al., 1996). Por otra parte, el ácido salicílico (SA) es reconocido como una molécula clave en la respuesta inmune en las plantas; los mecanismos de señalización mediados por SA pueden considerarse como una red compleja y se ha propuesto que el SA puede unirse a proteínas vegetales afectando su actividad (Spletzer y Enyedi, 1999). También el SA puede inhibir la actividad de la enzima catalasa (que detoxifica el peróxido de hidrógeno), incrementando la concentración de peróxido de hidrógeno e induciendo a la explosión oxidativa en los sitios de invasión del patógeno (Vasyukova y Ozeretskoykaya., 2007). Por otra parte, el ácido β amino butírico (BABA), induce respuestas de defensa asociadas a barreras estructurales (Zimmerli et al., 2000) como la acumulación de la lignina en células hospederas. El metil jasmonato se ha reportado que induce resistencia sistémica en cultivo de cebada en contra del patógeno *Blumeria graminis*, mediante el incremento de la actividad de algunas enzimas como la fenilalanina amonio liasa (PAL) y peroxidasa, resultando en muerte celular del hospedero (Walters et al., 2002).

2.6 Respuestas de defensa mediadas por la riboflavina.

La riboflavina es una vitamina producida por las plantas y microorganismos que actúa como coenzima en una gran cantidad de procesos fisiológicos en plantas, animales y microbios. La participación de la riboflavina como una molécula señal en las respuestas de defensa local y sistémica es actualmente poco estudiada. La riboflavina está involucrada en la peroxidación y oxidación, procesos que afectan la producción de especies reactivas de oxígeno y la respuesta hipersensible (Packer et al., 1996).

Aunque las plantas pueden sintetizar la riboflavina, sus niveles varían en los diferentes órganos y también en sus estados de desarrollo. La riboflavina se cataloga como un estimulador de defensa cuando se aplica exógenamente y se ha observado que dicha aplicación no es fitotóxica a concentraciones altas (Dong y Beer, 2000).

La riboflavina en *Arabidopsis* y tabaco activa genes relacionados a patogénesis (PR) y es capaz de inducir resistencia y activar genes de defensa en ausencia del ácido salicílico (Dong y Beer, 2000). Se ha reportado que la riboflavina actúa mediante una nueva vía de señalización de respuestas de defensa sistémica. Se ha propuesto que la riboflavina actúa como un mediador durante la transducción de señales, debido a que cataliza la oxidación de lípidos, produciendo así intermediarios reactivos de oxígeno, función que antagoniza con su papel de vitamina antioxidante, el balance entre ambas reacciones es parte de la mediación de la señalización por riboflavina (Packer et al., 1996).

2.7 Función del ácido araquidónico (AA) en las plantas

El ácido araquidónico (AA) o ácido eicosatetraenoico es un ácido graso esencial poliinsaturado de la serie omega-6 constituido por una cadena de 20 átomos de carbono con 4 dobles enlaces en las posiciones 5,8,11,14. Los dobles enlaces ofrecen sitios de oxidación que conducen a la formación de diferentes lípidos con actividades biológicas como los denominados “eicosanoides”, entre los que se encuentran las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos. El ácido araquidónico se presenta como un constituyente de las membranas celulares animales; las células vegetales contienen poco o nada de este ácido. En las células animales, el AA se sintetiza a partir del ácido linoleico (C18:2).

Por otra parte, existen ejemplos del efecto del AA en plantas, como en frutos de chile (*Capsicum annuum* L.) tratados con ácido araquidónico e inoculados con peróxido de hidrógeno donde se observó la acumulación de cantidades considerables del capsidiol, el cual es una fitoalexina sesquiterpenoide (Arreola et al., 2007).

El tratamiento con ácido araquidónico en pimiento verde y tabaco indujo la producción de etileno y la biosíntesis del capsidiol (Watson y Brooks 1984). Los autores proponen que el etileno se produjo por el estrés generado por el ácido araquidónico. Aunque existen reportes que el tratamiento con ácido araquidónico induce la acumulación del capsidiol, no se conocen datos sobre su posible participación en la inducción de defensa frente a patógenos.

2.8 Características botánicas del aguacate

El aguacate es una *dicotiledónea* perteneciente a la familia de las *Lauraceas*, clasificada por Miller como *Persea americana* Var. *Drymifolia* (Rodríguez Suppo, 1992). Es un árbol originario de América central, cuenta con numerosas variedades que han sido estudiadas y clasificadas, incluyendo aspectos de productividad, calidad, cantidad, cultivo, resistencia a plagas y enfermedades.

Los estudios sistemáticos han clasificado más de 500 variedades de las cuales muchas han sido descartadas para fines comerciales. La variedad Fuerte es muy difundida en el mundo por su resistencia al transporte y su excelente calidad del fruto, en México es la segunda en importancia después del Hass (Lara et al., 2005).

El aguacate es un árbol cuyo crecimiento y desarrollo es variado, llegando a tener en su hábitat de especies subtropicales una altura de 10 a 12 metros (Rodríguez Suppo, 1992).

En forma general, a continuación se describen algunos de los aspectos botánicos del aguacate:

1. Especie perenne de tallo aéreo con características leñosas y follaje siempre verde.
2. Hojas elípticas y alargadas y nervadura pinnada con una dimensión aproximada de 15 cm de largo por 6 de ancho.
3. Las ramas son abundantes, delgadas y frágiles.
4. La raíz principal es axonomorfa o pivotante y presenta también raíces superficiales. La profundidad de la raíz puede ser de 1 a 1.5 metros (Figura 3). También se caracteriza por tener pocos pelos radicales y la absorción de agua y

nutrientes se realiza principalmente en las puntas de las raíces a través de los tejidos primarios (Moreno, 1984).

5. Las flores son de color verde amarillento con un diámetro de aproximadamente 1 cm, la inflorescencia es una panícula terminal, estimando unas 200 flores por panícula.
6. El fruto es una baya que posee un pericarpio (delgado, grueso o quebradizo), un mesocarpio carnoso y el hueso (protección seminal). Dicho fruto presenta una forma ovalada, color verde, violáceo con un peso que oscila entre 50 a 500 g.

En México, el aguacate se encuentra difundido principalmente en las huertas, donde la variedad comercial criolla por su adaptabilidad ecológica en el país es utilizada como patrón de injerto para el cultivar Hass, su fruto es pequeño y de cascara delgada de color verde o negra (Rodríguez, 1992).

Sin embargo, como muchas otras plantas, el árbol de aguacate es susceptible al ataque de algunos organismos como hongos y bacterias que provocan enfermedades en el cultivo, siendo una de las más devastadora la producida por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* que provoca innumerables pérdidas en el cultivo (Gisi et al., 2000).

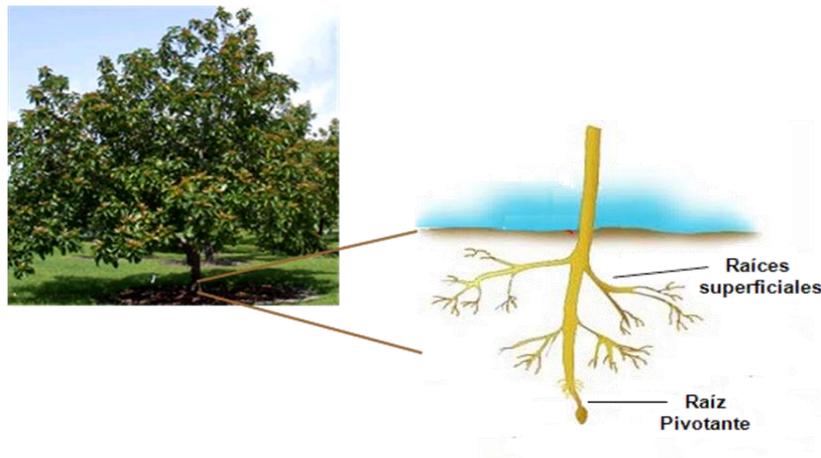


Figura 3. Las raíces del aguacate. La fotografía muestra el árbol de aguacate y el esquema los diferentes tipos de raíces.

2.9 Características del oomiceto *Phytophthora cinnamomi*

Phytophthora es un género de oomicetos de reproducción sexual y asexual que a menudo se aísla de suelos (Rossman y Palm 2007). Las especies de *Phytophthora* se encuentran en suelos tropicales y subtropicales y son capaces de colonizar las raíces de las plantas. Una de las especies de este género provoca una enfermedad devastadora en el cultivo de aguacate, la cual es conocida como pudrición de la raíz o marchitez del aguacate llegando a originar pérdidas totales en los huertos de aguacate.

Todas las especies del género *Phytophthora* poseen un micelio hialino continuo de paredes paralelas, se presenta cenocítico o con vesículas. *Phytophthora* es capaz de vivir de forma saprófita sobre la materia orgánica del suelo en ausencia del huésped. (Tucker et al., 2001). *P. cinnamomi* fue descrito por primera vez en 1922 por Rands.

El crecimiento *in vitro* presenta un desarrollo marcadamente radiado o ligeramente estrellado o en forma de roseta con los bordes de la colonia redondeados. Los esporangios son de forma ovalada y liberan zoosporas móviles en el suelo y si hay agua presente se desplazan hacia las raíces pequeñas (respuesta quimiotáctica de los exudados de la raíz) donde se enquistan y germinan en la superficie de la misma (Zentmyer, 1980).

Phytophthora cinnamomi sobrevive en el tejido muerto durante largos períodos de tiempo. Esta fase saprofítica puede permitir un aumento de la población del patógeno y supervivencia al extenderse en tejido orgánico (Rodríguez Suppo 1992).

El micelio y las clamidosporas de *P. cinnamomi* puede sobrevivir al menos 6 años en el suelo húmedo, mientras que los quistes de las zoosporas lo hacen por 6 semanas. Las clamidosporas se forman cuando las condiciones para la proliferación del oomiceto son desfavorables y se mantienen en el suelo, la grava o la planta durante los períodos secos y germinan en condiciones adecuadas de temperatura, humedad, donde crecen

formando micelios y esporangios o más clamidosporas. Este ciclo puede continuar por más de 5 años, siempre y cuando exista una fuente de nutrientes disponible (Kamoun, 2003).

2.10 Ciclo de vida de *Phytophthora cinnamomi*

Phytophthora cinnamomi tiene un ciclo de reproducción sexual del cual derivan la formación de oosporas, además por reproducción asexual se producen esporangios, zoosporas, micelio y clamidosporas (Kamoun, 2003).

En la figura 3, se muestra el ciclo de vida de *P. cinnamomi* y las estructuras infectivas de *P. cinnamomi*: **Esporangios** de los cuales se liberan esporas asexuales biflageladas capaces de nadar y en este estadio de desarrollo se conocen como **Zoosporas**, las cuales detectan al tejido de raíz por atracción química, desplazándose hacia él. Posteriormente las zoosporas se enquistan en el tejido perdiendo los flagelos, donde germinan para formar el **Micelio**. Esta última estructura está formada por hifas y esporangios que se extienden sobre el tejido hasta colonizarlo. Por otra parte, las **Clamidosporas** poseen una membrana gruesa que les permite sobrevivir a condiciones desfavorables como la privación de nutrientes o cambios en factores ambientales (altas y/o bajas temperaturas y alteraciones de pH del suelo) (Judelson y Blanco, 2005; Rossman y Palm 2007).

Las raíces que han sido colonizadas impiden el flujo de nutrientes del suelo y del agua, haciendo visibles los síntomas de la enfermedad en el árbol como la clorosis progresiva en el área foliar que resulta en la defoliación, disminución en tamaño y cantidad de frutos. Posteriormente, el oomiceto se disemina a plantas vecinas provocando cultivos enfermos que más tarde infectaran a los sanos.

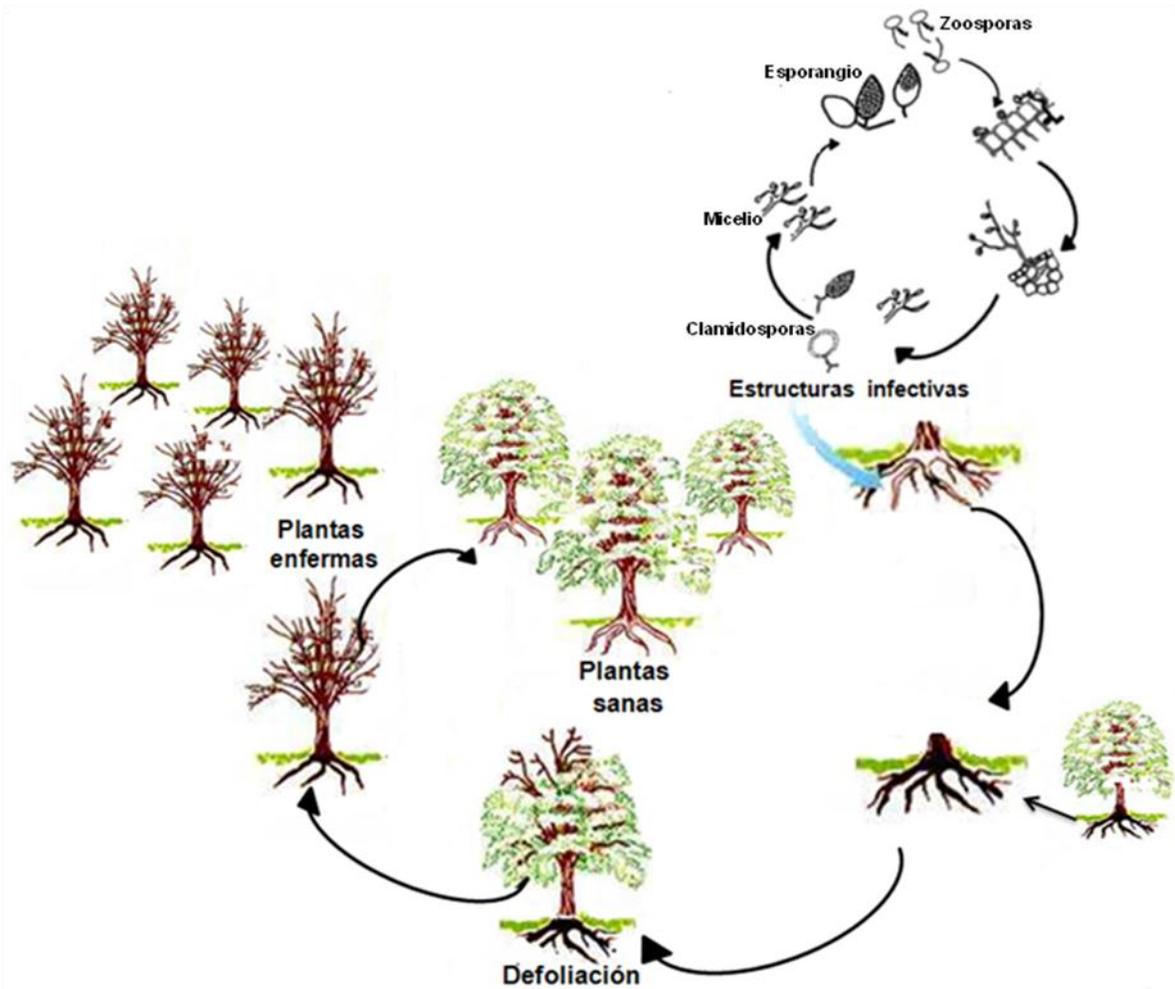


Figura 4. Ciclo de vida de *Phytophthora cinnamomi*. Ciclo de vida del oomiceto, en la parte superior derecha se muestran las estructuras infectivas que colonizan tejido de raíz provocando la sintomatología característica de la enfermedad y desencadenando la dispersión a tejidos de las plantas vecinas que potencialmente atacaran a las plantas sanas (Judelson y Blanco, 2005; Rossman y Palm 2007).

2.11 Condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de *P. cinnamomi*

El exceso de humedad en los suelos arcillosos, al igual que los mal drenados favorece el desarrollo del oomiceto, lo mismo que otros factores como una temperatura entre 20 - 30°C y un pH ligeramente ácido entre 3-5, (Rodríguez Suppo, 1992). Es importante resaltar el papel de la temperatura entre los factores que limitan el crecimiento vegetativo del oomiceto. En el caso del pH, el rango óptimo para el cultivo *in vitro* de estas especies es de 4.5 y 5.5. Generalmente, los valores de pH que permiten el mejor desarrollo del micelio también favorecen la producción de esporangios, clamidosporas y zoosporas (Gisi et al., 2000).

2.12 Interacción y propagación de *Phytophthora cinnamomi* en las plantas

El oomiceto puede proliferar, competir y sobrevivir en el suelo; además coloniza las raíces necrosándolas en forma progresiva, lo anterior puede suceder durante la interacción con plantas de todas las edades y llega a tal punto que podría eliminar todas las raíces, las cuales tienen como función la asimilación de agua y nutrientes (Mendgen et al., 1996). La colonización en el interior de las raíces se observa como manchas rojizas, castañas y las raíces se vuelven quebradizas cuando el tejido ya ha muerto (Hardman 2001).

Phytophthora cinnamomi se propaga a través del viento, el agua de riego, el traslado a tierra de plantas jóvenes de viveros infectados o por semillas no tratadas (Hulbert et al., 2001). Cuando los síntomas aparecen en los cultivos de aguacate se debe de realizar un control de la enfermedad, el cual consiste en determinar la localización del oomiceto, así como disminuir la humedad del suelo y tratar los arboles afectados con fungicidas específicos (Hardman, 2001).

2.13 Pudrición de las raíces de aguacate por *Phytophthora cinnamomi*

P. cinnamomi provoca un declinamiento progresivo del árbol de aguacate, el cual cuando es atacado, presenta hojas pequeñas en forma de cuchara de colores verde pálido o amarillentos y a menudo marchitos. También, las ramas mueren y los frutos son pocos y pequeños, como consecuencia el árbol muestra un aspecto general de marchitez y la copa del mismo se va defoliando llegando a secarse completamente en estados avanzados de la enfermedad (Zentmeyer y Erwin, 1970). Cuando las raíces absorbentes (raíces jóvenes que en el árbol se forman cada año) de las plantas de aguacate son colonizadas, estas se observan ennegrecidas y quebradizas, existiendo la posibilidad de no encontrarlas en estados avanzados de la infección. Sin embargo, la infección raramente se extiende hacia las raíces viejas (Gabor y Coffey, 1991).

2.14 Control de la pudrición de la raíz del aguacate

El control de la pudrición de la raíz de aguacate es difícil, y en el mercado existen tratamientos con fungicidas tales como el Aliette, Ridomil y ácido fosfórico, los cuales se aplican inyectándolos en el tronco y las raíces (Eden et al., 2000; Schwinn y Staub., 1995). Cabe mencionar que dichos tratamientos son costosos, por lo que una alternativa es el empleo de medidas que contribuyan a prevenir la enfermedad, como mejorar el drenaje del suelo y controlar adecuadamente la maleza para reducir la humedad relativa (Judelson y Blanco, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad producida por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* en aguacate es difícil de controlar con el uso de fungicidas, es por ello que la inducción de respuestas de defensa en plántulas de aguacate criollo mediante estimuladores podría contribuir a reducir la infección contra *Phytophthora cinnamomi*.

4. HIPÓTESIS

La riboflavina y el ácido araquidónico activan respuestas de defensa estimulando la resistencia en plántulas del aguacate criollo a la infección por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi*.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar estimuladores de respuesta de defensa en plantas de aguacate criollo en contra de *Phytophthora cinnamomi*.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el efecto de diferentes concentraciones del ácido araquidónico y la riboflavina, sobre la interacción entre las raíces de las plántulas de aguacate criollo y *Phytophthora cinnamomi*.
2. Analizar las respuestas de defensa relacionadas con la resistencia a *Phytophthora cinnamomi*, tales como producción de especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos en las plantas de aguacate tratadas sin y con ácido araquidónico y riboflavina.
3. Analizar el efecto de los extractos de las plántulas de aguacate tratadas con y sin los estimuladores de defensa, sobre la viabilidad de *Phytophthora cinnamomi*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal y condiciones de almacenamiento.

En los diferentes experimentos se utilizaron plántulas de aguacate criollo (*Persea americana* Mill Variedad Drymifolia) de 4 a 5 meses de edad, provenientes del vivero Salas ubicado en Uruapan, Michoacán, México. Dichas plantas, sanas y libres de daño biológico o mecánico fueron colocadas en un espacio abierto donde se mantuvieron con una humedad óptima hasta su utilización.

6.2 Producción de esporangios y liberación de las zoosporas de *Phytophthora cinnamomi*.

Se utilizó una cepa de *Phytophthora cinnamomi* de 7 días de crecimiento en medio agar V8 clarificado (jugo de verduras V8 campells®). Se inoculó un disco de 5 mm de diámetro de la cepa, en 10 ml de caldo clarificado V8 contenido en un matraz erlenmeyer de 125 ml, el cual se incubó a 25°C, con agitación constante de 40 rpm durante 72 hr en oscuridad. Al término del periodo de crecimiento se obtuvo un micelio del oomiceto tipo bolas de algodón.

Para estimular la esporulación, se realizaron tres lavados del micelio obtenido anteriormente con extracto de suelo al 1% (se colocaron 10 gr de suelo en 1 litro de agua desionizada estéril, se homogenizó durante 1 hr y se incubó por 24 hr, se filtró sobre papel Whatmann # 4 y se incubó a 5°C hasta su uso). El micelio se incubó en 10 ml de extracto de suelo al 1% a 25°C, en luz fluorescente durante 48 hr para inducir la producción de esporangios del oomiceto. Posteriormente, la muestra con esporangios

se incubó a 5°C durante 48 hr en oscuridad para romper por choque térmico los esporangios desarrollados. Se retiraron las muestras y se incubaron durante 1 hr a 24°C, se homogenizó la muestra en un vortex con agitación media (núm. 5) durante un minuto y se incubó 1 hr a 24°C para sedimentar la muestra. Se retiró con pipeta Pasteur el sobrenadante y se colocaron 10 ml en un tubo falcon. Posteriormente se realizó la determinación de la concentración de la suspensión de zoosporas para obtener una densidad de 1×10^4 zoosporas/ml (el total de zoosporas liberadas se calculó multiplicando el factor de dilución por el número de zoosporas contadas por ml en una cámara de Neubauer donde se le colocaron 20 μ l de la suspensión, el conteo se hizo por duplicado para cada muestra), con las cuales se realizó la infección en raíces de plántulas de aguacate criollo.

6.3 Sistema de infección *in vitro* con zoosporas de *P. cinnamomi*

Se obtuvieron segmentos de un cm de longitud de raíces lavadas con agua desionizada de plántulas de aguacate criollo, cuatro de estos trozos de raíz se inocularon con 1 ml de 1×10^4 zoosporas/ml de *P. cinnamomi* y se incubaron a 25°C durante 72 hr. Transcurrido este tiempo las raíces fueron lavadas con agua desionizada estéril para eliminar el exceso de la suspensión y se inocularon en medio selectivo PARPH (por sus siglas agar harina de maíz) donde se incubaron a 25°C, 72 hr en oscuridad.

6.4 Análisis de la colonización de la raíz por zoosporas de *P. cinnamomi*

Para determinar si la colonización de las raíces del sistema *in vitro* con zoosporas de *P. cinnamomi* se efectuó de manera adecuada, se realizaron observaciones con una lupa estereoscópica 6X para determinar el desarrollo de hifas en las raíces. Los porcentajes de colonización de la raíz fueron calculados a partir del número de raíces cubiertas por hifas del *P. cinnamomi* (N=4 para cada tratamiento).

6.5 Determinación de la viabilidad del tejido de raíz

Para determinar la viabilidad del tejido de la raíz de aguacate se realizaron cortes longitudinales en las raíces control, estimuladas con 5 mM de riboflavina y 1mM de ácido araquidónico e infectadas con 1×10^4 zoosporas/ml, dichos cortes posteriormente se tiñeron con azul de tripano al 4% (disuelto en etanol). Se eliminó el exceso del colorante lavando con agua desionizada estéril y las muestras se colocaron en un portaobjeto para observar en el microscopio la viabilidad del tejido. Esta última se determinó detectando las células carentes de colorante (viables) y células teñidas (muertas) y se determinó el porcentaje de viabilidad de las células. El análisis se realizó con una N=200, con tres repeticiones para cada tratamiento.

6.6 Estimulación de raíces de plántulas de aguacate criollo

Se cortaron segmentos de 1 cm de longitud de las raíces de plántulas de aguacate criollo, las cuales se lavaron con agua desionizada estéril y se colocaron cuatro de estos segmentos en 1 ml de solución de riboflavina a concentraciones de 5, 10 y 15 mM y de ácido araquidónico a 1 y 5 mM. Los fragmentos de raíz se incubaron durante 4 hr en agitación constante de 40 rpm a 25°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua desionizada estéril para remover la solución del estimulador. Las raíces tratadas de esta manera fueron almacenadas en agua desionizada estéril para su posterior utilización.

6.7 Bioensayo para determinar el efecto de la riboflavina y el ácido araquidónico sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*

Para este bioensayo se utilizaron placas que contenían 25 ml de medio PDA/V8 sobre las cuales se espatularon los tratamientos que a continuación se describen:

Tabla 3. Tratamientos para bioensayo en medio PDA/V8

Tratamientos	Cantidad agregada
Agua (control)	4 ml
Ácido araquidónico 1 mM	4 ml
Ácido araquidónico 5 mM	4 ml
Riboflavina 5 mM	4 ml
Riboflavina 10 mM	4 ml
Riboflavina 15 mM	4 ml

Las placas de medio PDA/V8 espatuladas con 4 ml de los respectivos tratamientos se dejaron secar por 30 min, posteriormente se tomaron discos de 5 mm de diámetro de una cepa de *P. cinnamomi* de 7 días de crecimiento, los cuales se colocaron en el centro de cada placa con los respectivos tratamientos. Para determinar el efecto de los tratamientos, las cajas se incubaron durante seis días donde al final se midió el crecimiento radial de *P. cinnamomi* de cinco cajas para cada tratamiento.

6.8 Determinación del peróxido de hidrógeno

El contenido de peróxido de hidrógeno a las 4 hr se determinó en tejidos de raíz de aguacate criollo sumergido por 4 hr en agua, 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico. La raíz fue congelada, con nitrógeno líquido a -80°C y molida hasta obtener un polvo, el cual se colocó en tubos eppendorf donde se adicionó 1 ml de agua desionizada estéril y se centrifugo a 10 000 rpm durante 1 min. Se tomaron 500 μl del sobrenadante y se mezclaron con 500 μl de una mezcla de reacción que contiene guaiacol, peroxidasa en buffer de fosfatos 25 mM a pH 7. La reacción se incubó por 15 min a 25°C en oscuridad y posteriormente se midió la absorbencia a 450 nm, usando como blanco agua desionizada estéril. La concentración de H_2O_2 se calculó en base a una curva patrón de peróxido de hidrógeno comercial y se realizó 5 veces para cada tratamiento.

6.9. Determinación de fenoles totales

Las raíces sumergidas por 4 h en agua, en solución de 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico se congelaron con nitrógeno líquido a -80°C hasta obtener un polvo que se colocó en tubos eppendorf. A los tubos se les adicionó 1 ml de metanol al 50% y agua (1:1) y se incubaron en agitación por 1 hr a 25°C , posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm por 5 min. En otro tubo, se colocaron 250 μl de sobrenadante, al cual se adicionó 250 μl del reactivo Folin-Ciocalteu y 500 μl de Na_2CO_3 al 20%, se agitaron los tubos por 1min a 25°C y se incubaron en oscuridad 30 min, finalmente se centrifugaron a 10 000 rpm por 5 min y se leyó la absorbencia a 735nm. La concentración de los fenoles totales determinada se grafico con los datos de absorbencia obtenidos. La determinación se realizó 5 veces para cada tratamiento.

6.10 Obtención de los extractos metanólicos de los tejidos de la raíz del aguacate criollo

Para la obtención de extractos metanólicos de tejido de raíz tratado por 4 hr con las soluciones de 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico se utilizaron 5 g de tejido, el cual posteriormente fue lavado tres veces con agua desionizada. Las muestras de raíces con sus respectivos tratamientos fueron congeladas con nitrógeno líquido a -80°C y molidas hasta obtener un polvo que se transfirió en tubos falcon con 10 ml de metanol. Las muestras se incubaron en oscuridad a 25°C y 125 rpm por 24 hr. Al término de la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 1 min y el sobrenadante correspondiente a la extracción metanólica del tejido de cada muestra se transfirió a otro tubo falcon, los cuales se incubaron en un termo-block previamente calentado a 35°C, donde se mantuvieron hasta evaporar completamente el metanol. Al término del proceso los extractos metanólicos de tejido de raíz fueron almacenados a 4°C. La cantidad de extracto obtenido se determinó a partir del rendimiento del extracto obtenido por diferencia de peso. Este procedimiento se realizó tres veces para cada tratamiento. Para efectuar los experimentos posteriormente, los extractos se resuspendieron con 150 µl de metanol.

6.11 Obtención de los extractos de acetato de etilo del tejido de la raíz del aguacate criollo

De los tejidos de las raíces se trataron por 4 hr con 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico se utilizaron 5 g, los cuales se lavaron tres veces con agua desionizada. Las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido a -80°C y se molieron hasta obtener un polvo, el cual se transfirió a tubos falcon con 15 ml de acetato de etilo grado reactivo. Las muestras se incubaron en oscuridad a 25°C y 125 rpm por 24 hr. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante

3 min y el sobrenadante correspondiente a la extracción del tejido de cada muestra se transfirió a otro tubo falcon, el cual se incubó en un termo-block previamente calentado a 35°C hasta evaporar por completo el acetato de etilo de las diferentes muestras. Al término del proceso, los extractos de tejido de raíz obtenidos fueron almacenados a 4°C. La cantidad de extracto obtenido se determinó a partir del rendimiento del extracto obtenido por diferencia de peso. Este procedimiento se realizó tres veces para cada tratamiento. Para posteriores experimentos los extractos se resuspendieron con 150µl de acetato de etilo.

6.12 Obtención de los extractos hexánicos del tejido de la raíz del aguacate criollo

Los tejidos de las raíces se trataron por 4 hr con solución de 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico. Se utilizaron 5 g de tejido, los cuales se lavaron tres veces con agua desionizada. Las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y molidas hasta obtener un polvo, el cual se transfirió a tubos falcon con 15 ml de hexanos grado reactivo. Las muestras se incubaron en oscuridad a 25°C y 125 rpm por 24 hr, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm durante 3 min y el sobrenadante correspondiente a la extracción hexánica del tejido de cada muestra se transfirió a otro tubo falcon. Este último se incubó en un termo-block previamente calentado a 35°C hasta evaporar el hexano de las diferentes muestras. Al término del proceso, los extractos de tejido de raíz obtenidos fueron almacenados a 4°C. La cantidad de extracto obtenido se determinó a partir del rendimiento del extracto obtenido por diferencia de peso. Este procedimiento se realizó tres veces para cada tratamiento. Para experimentos posteriores, los extractos se resuspendieron con 150µl de hexano.

6.13 Bioensayo para determinar el efecto de los extractos metanólicos de la raíz del aguacate criollo en *P. cinnamomi*

En los bioensayos para determinar el efecto de los extractos metanólicos sobre el desarrollo de *P. cinnamomi*, se utilizaron dichos extractos solubilizados en 150 µl de metanol, de los cuales se espatularon 50 µl sobre la caja de Petri con medio PDA/V8, como se describe a continuación:

- Controles: agua, metanol, metalaxil y extracto de tiempo cero.
- Tratamientos: extracto metanólico de raíz tratado en agua, y con las soluciones 5mM de riboflavina y 1mM de ácido araquidónico.

Después de espatular, las cajas se dejaron secar por 30 min. Posteriormente, se inoculo en el centro de la placa un disco de 5 mm de diámetro de una cepa de 7 días de crecimiento de *P. cinnamomi* y se incubo por 6 días. Para la determinación de este efecto se midió el crecimiento radial de *P. cinnamomi* y se realizo por quintuplicado para cada tratamiento.

6.14 Efecto de los extractos metanólicos sobre la germinación de las zoosporas de *P. cinnamomi*

Se añadieron en los tubos eppendorft, 1 ml de 1×10^4 zoosporas del oomiceto y 50 µl del extracto metanólico y de los controles como se indica a continuación:

- Controles: agua, metanol, metalaxil y extracto de tiempo cero.

- Tratamientos: extracto metanólico de raíz tratado en agua, y con las soluciones 5mM de Riboflavina y 1mM Ácido Araquidónico

Las muestras se incubaron en oscuridad a 25°C y 50 rpm por seis días. Al término de la incubación se colocaron 20 µl de azul de lactofenol y 25 µl de cada muestra con su respectivo tratamiento y con una pipeta Pasteur se homogenizo suavemente. Las muestras se observaron en un microscopio Leica a 40X. La determinación de la germinación se evaluó como el desarrollo del micelio de *P. cinnamomi* y se realizo por quintuplicado para cada tratamiento.

6.15 Efecto de los extractos de raíz en el desarrollo de *P. cinnamomi*

A tubos eppendorft con 1 ml de 1×10^4 zoosporas del oomiceto, se les adiciono 50, 100 y 150 µl de las siguientes soluciones:

- Controles: agua, metanol, metalaxil, extracto tiempo cero, metanol, acetato de etilo, hexanos.
- Tratamientos: extracto metanólico de la raíz inmersa en agua, en acetato de etilo y hexano, extracto de raíz tratada con 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico con los tres solventes.

Los tubos se incubaron en oscuridad a 25°C y 50 rpm por seis días. Al término, 25 µl de las muestras se colocaron en un portaobjeto y se adicionó 20 µl de azul de lactofenol con una pipeta Pasteur se homogenizo suavemente. Las muestras se observaron en un microscopio Leica a 40X. La determinación del efecto se evaluó como alteraciones en la estructura de las hifas de *P. cinnamomi* con respecto a los controles y se realizo por quintuplicado para cada tratamiento.

6.16. Análisis de los extractos de raíz en el desarrollo de *P. cinnamomi*

Se colocaron en tubos eppendorf 1 ml de 1×10^4 zoosporas del oomiceto y se adicionó 150 μ l de las soluciones que se muestran a continuación:

- Control: Hexano, 50 μ l de Metalaxil.
- Tratamientos: Extracto hexánico de raíz tratadas con las soluciones de 5 mM de riboflavina y 1mM de ácido araquidónico.

Los tubos se incubaron en oscuridad a 25°C y 50 rpm y se realizaron tinciones a las 0,4,8,12,16,24,36,48,56 y 72 hr, para lo cual se colocaron en un portaobjetos 20 μ l de azul de lactofenol y 25 μ l de cada muestra de los tiempos antes descritos.. Al término 25 μ l de las muestras se colocaron en un portaobjeto y se adicionó 20 μ l de azul de lactofenol con una pipeta Pasteur se homogenizo suavemente. Las muestras se observaron en un microscopio Leica a 40X. La determinación del efecto se evaluó como alteraciones en el micelio de *P. cinnamomi* con respecto al control y se realizo por quintuplicado para cada tratamiento.

6.17 Cuantificación del desarrollo de *P. cinnamomi* con extractos hexánicos de raíz

Para determinar el desarrollo de *P. cinnamomi* se utilizaron dos técnicas.

- En la primera determinación, se colocó en tubos eppendorft 1 ml de 1×10^4 zoosporas del oomiceto y se adicionó 150 μ l de las siguientes soluciones; Controles: Hexano, extracto de raíz tiempo cero, 50 μ l de metalaxil.
- Tratamientos: Extracto Hexánico de raíz estimulada con 1 mM de ácido araquidónico, se incubaron por 12 días a 25°C en oscuridad, con agitación constante de 50 rpm, cada día se leyó la absorbencia a 620nm.

El desarrollo de *P. cinnamomi* se graficó con los datos de absorbencia leídos y la determinación se realizó por quintuplicado para cada tratamiento.

- En la segunda determinación, se adicionó a tubos eppendorft 1 ml de la suspensión de 1×10^4 zoosporas, las cuales se incubaron durante seis días a 25°C en oscuridad y con agitación constante de 50 rpm. Diariamente se leyó la absorbencia de cada tubo a 620 nm, transcurrido este tiempo se adicionó 150 μ l de las siguientes soluciones; Controles: hexano, extracto de raíz tiempo cero, 50 μ l de metalaxil; Tratamientos: Extracto hexánico de raíz estimulada con ácido araquidónico. Las muestras se incubaron a 25°C en oscuridad y con agitación constante de 50 rpm y continuamos leyendo diariamente la absorbencia hasta completar los 12 días.

El desarrollo de *P. cinnamomi* se graficó con los datos de absorbencia leídos y la determinación se realizó por quintuplicado para cada tratamiento.

6.18 Análisis estadístico de los datos obtenidos en los experimentos

Los resultados estadísticos de los experimentos de la colonización de la raíz, la viabilidad del tejido, los diferentes bioensayos y la determinación de peróxido de hidrógeno y fenoles totales se obtuvieron con el programa GraphPad Prism 5.0. Los resultados de los experimentos fueron evaluados por análisis de varianza con el método de análisis de Bartlett. Las diferentes letras colocadas en las gráficas indican los tratamientos que difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1. Colonización de las raíces del aguacate criollo *Persea americana* Mill Variedad Drymifolia por zoosporas de *Phytophthora cinnamomi*

García Pineda y colaboradores en el 2009, reportaron que la inoculación de plántulas de aguacate criollo con el micelio del oomiceto *Phytophthora cinnamomi* ocasionaba lesiones parduscas en las raíces, debido a la colonización del tejido de las raíces por el micelio. Para obtener un sistema de infección *in vitro* de los tejidos de raíz, se colocaron cuatro segmentos de raíz en 10 tubos que contenían 1 ml de una suspensión de 1×10^4 zoosporas del oomiceto y se incubaron por tres días a 25° C. Posteriormente, se colocaron cuatro segmentos en una caja Petri con medio PARPH (medio selectivo para *P. cinnamomi*). El material se incubó tres días a 25°C en oscuridad. Los resultados mostraron que la concentración de zoosporas utilizada en los experimentos de colonización del tejido fue adecuada para dicho objetivo, al no encontrar diferencias en las muestras analizadas.

En la figura 5 se muestran las fotografías representativas de los experimentos realizados, donde se puede observar un halo blanquecino del micelio de *P. cinnamomi*, mientras que en las placas control no mostraron desarrollo del oomiceto. Además realizamos un acercamiento al tejido colonizado con una lupa estereoscópica 6X, y se puede observar las hifas colonizando el tejido de raíz.

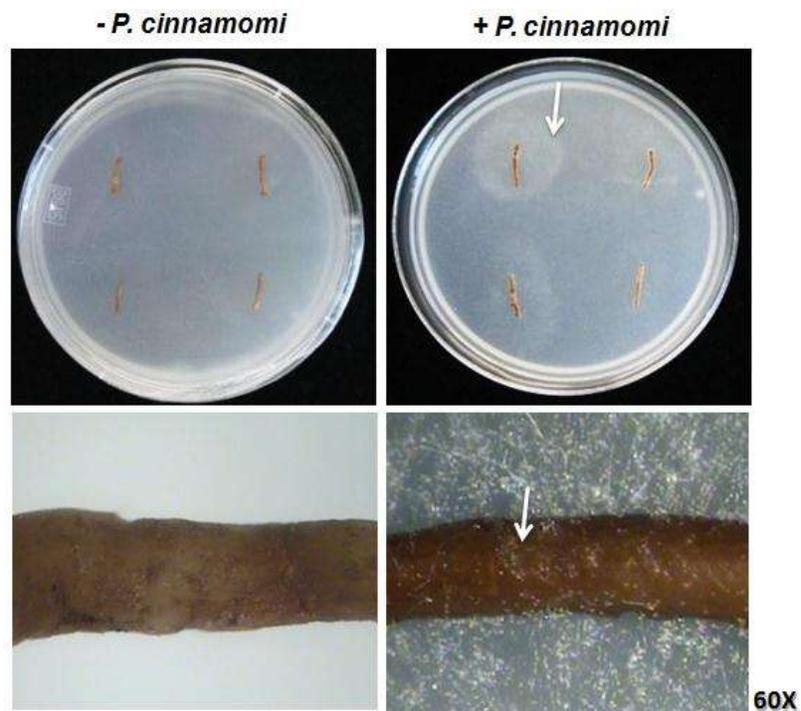


Figura 5. Colonización de tejido de raíz de aguacate criollo con zoosporas de *P. cinnamomi*. Fotografías representativas de tejido de raíz inoculado en medio PARPH, después de la incubación en zoosporas (+*P. cinnamomi*) o en agua (-*P. cinnamomi*). En el panel inferior se muestra un acercamiento a 60X donde se observa la colonización del tejido tratado respecto al control.

7.2. Los tratamientos en el tejido de raíz de aguacate criollo no afectan su viabilidad

Un parámetro importante es la viabilidad celular del tejido de raíz puesto que evalúa los daños en la membrana celular. Experimentos realizados, donde el tejido de la raíz se colocó en las siguientes soluciones: tejido intacto, tejido colonizado en 1 ml de 1×10^4 zoosporas del oomiceto, tejido expuesto a 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico, tejido estimulado con ácido araquidónico 1mM y colonizado con zoosporas y tejido estimulado con riboflavina y colonizado con zoosporas, se incubaron a 25°C por 72 hr en oscuridad. Posteriormente, se realizaron cortes longitudinales de los diferentes trozos de tejido con sus respectivos tratamientos, se colocaron en un portaobjetos con 30 μ l de azul de lactofenol y se observaron los efectos de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad del tejido de 200 células por cada tratamiento. Finalmente determinamos el porcentaje de células viables y células muertas.

Las células viables presentan ausencia del colorante lo que indica la integridad de las células, mientras que el tejido muerto mostró la acumulación de la coloración azul, debido al daño en las membranas. En todos los tratamientos obtuvimos viabilidad superior al 95% lo que sugiere que los tratamientos que realizamos en el tejido de raíz no lo dañaron y es adecuado para continuar con los experimentos. En la figura 6 se muestra el análisis estadístico de los tratamientos a los que se sometió el tejido de raíz.

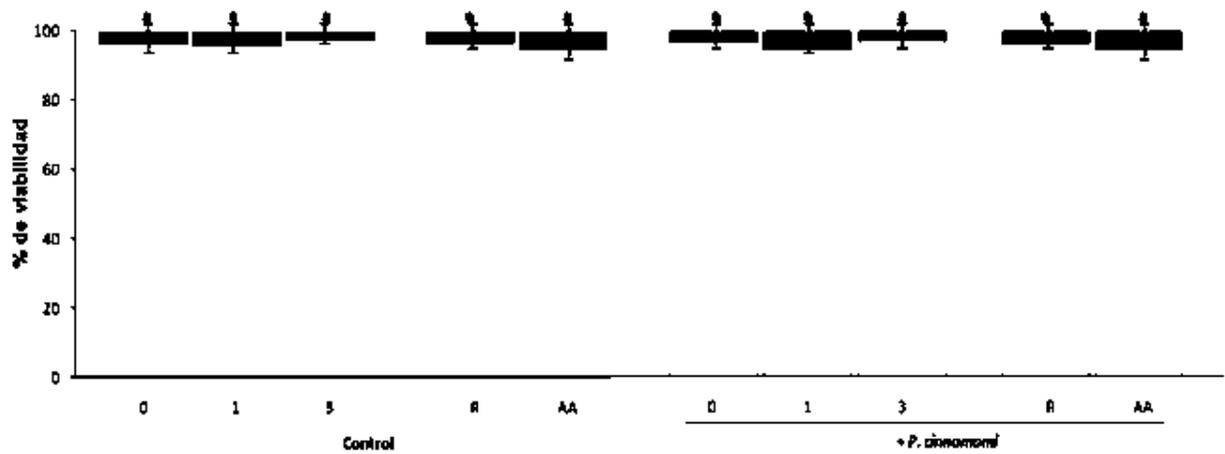


Figura 6. Efecto de los tratamientos en el tejido de raíz sobre la viabilidad celular. Las barras blancas representan células viables y las negras células muertas en los diferentes tratamientos. En el control se muestra el tejido inmerso en agua y en las soluciones de ácido araquidónico y riboflavina, del lado derecho el tejido de raíz sumergido en agua y en las soluciones de AA y R durante 0, 1 y 3 días. Posteriormente, el tejido se incubó en la suspensión de 1 ml de 1×10^4 zoosporas del oomiceto. Las barras de error representan la desviación estándar.

7.3 Efecto de los estimuladores sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*

Para investigar si los estimuladores: ácido araquidónico y riboflavina presenta un efecto directo sobre el crecimiento del oomiceto realizamos bioensayos colocando 4 ml de los estimuladores sobre placas con medio PDA/V8, después inoculamos en el centro de cada caja un disco de 5 mm de diámetro de una cepa de *P. cinnamomi*.

El análisis se realizó midiendo el crecimiento radial durante seis días. En la figura 7 podemos observar que las diferentes concentraciones de los estimuladores no presentaron ningún efecto sobre el crecimiento del oomiceto comparado con el control.

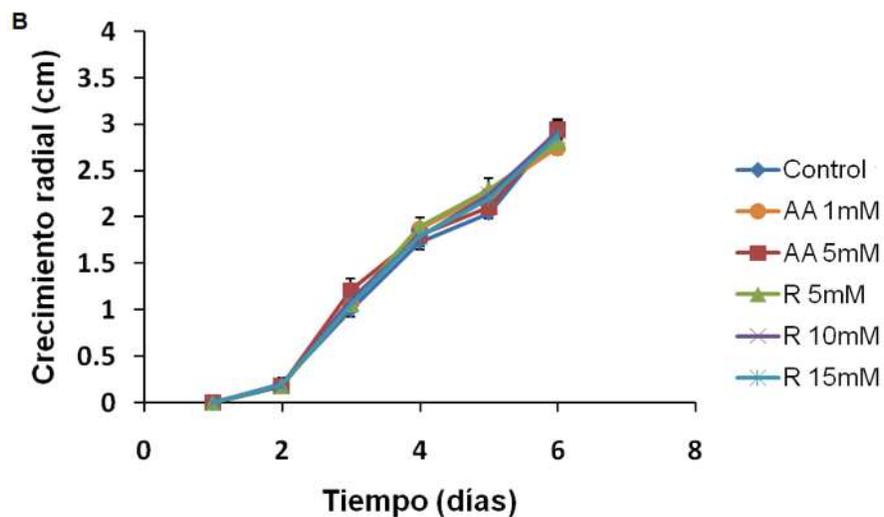
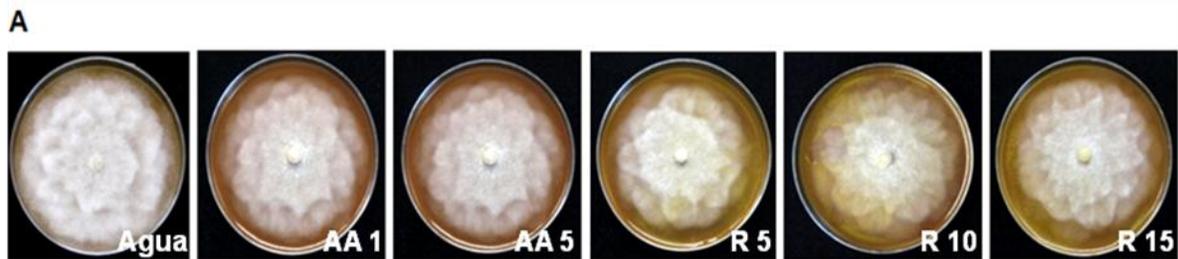


Figura 7. Efecto de los estimuladores sobre el desarrollo de *P. cinnamomi*. **A)** Imágenes representativas del crecimiento del oomiceto en medio PDA/V8 espatulado con 4 ml de los siguientes tratamientos; Control: agua, Tratamientos: 1 y 5 mM de ácido araquidónico y 5, 10, 15 mM de riboflavina e inoculadas con *P. cinnamomi*, se puede observar el desarrollo del micelio de *P. cinnamomi* en forma de roseta. **B)** Cinética del crecimiento radial durante seis días del oomiceto Las barras de error muestran la desviación estándar.

7.4 Efecto de los estimuladores en la raíz de aguacate sobre la producción del peróxido de hidrógeno

Para analizar si los estimuladores inducen la acumulación de peróxido de hidrogeno como respuesta de defensa, realizamos experimentos con tejidos de raíz de aguacate. El tejido fue colocado, para el control en agua y para los tratamientos en las soluciones estimuladoras de 1 mM de AA y 5 mM de R durante 4 hr en agitación constante a 25°C y oscuridad. Posteriormente, determinamos la cantidad de peróxido de hidrogeno acumulada. Los datos del experimento mostraron que en el tejido estimulado con ácido araquidónico existe una acumulación significativa de peróxido de hidrogeno respecto al control, mientras que tejido tratado con riboflavina presenta datos similares al control (Figura 8). Cabe mencionar que aunque los datos mostraron un incremento en el tratamiento con ácido araquidónico, los resultados oscilaron constantemente en la presencia del agua y el tiempo en que se llevo a cabo la determinación.

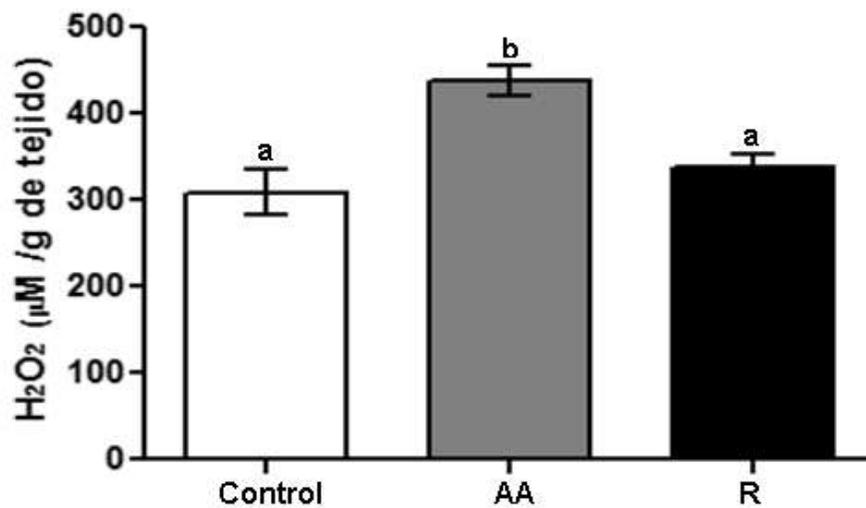


Figura 8. Efecto del ácido araquidónico y la riboflavina sobre la producción de peróxido de hidrógeno en la raíz de aguacate. Acumulación de peróxido de hidrogeno en el tratamiento del tejido de la raíz de aguacate criollo, la barra blanca, representa el control donde el tejido se sumergió en agua durante 4 hr. La barra gris, muestra el H₂O₂ del tejido tratado con 1 mM de ácido araquidónico y la negra al tejido tratado con 5 mM de riboflavina. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente (P<0.05). El experimento se repitió por triplicado con resultados similares.

7.5 Efecto de los estimuladores en la raíz de aguacate sobre la producción de fenoles totales

Como en las plantas la acumulación de compuestos derivados de la ruta de síntesis de fenilpropanoides juegan un papel importante en las interacciones con patógenos, actuando como respuesta de defensa. En el presente estudio tratamos el tejido de raíz de aguacate con las soluciones de 1 mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina por 4 hr. Posteriormente, se siguió el protocolo de Folin-Ciocalteu, en el que las muestras reaccionan formando un complejo que corresponde a la reducción de óxidos metálicos por polifenoles, lo que da como resultado una solución azul que absorbe a 765 nm, permitiendo así, leer la absorbencia de los fenoles totales en los diferentes tratamientos.

Como podemos observar en la figura 9, en el tejido tratado con 1 mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina, la cantidad de fenoles totales disminuyó respecto al control. Los resultados sugieren que esta respuesta de defensa no se activó al estimular el tejido.

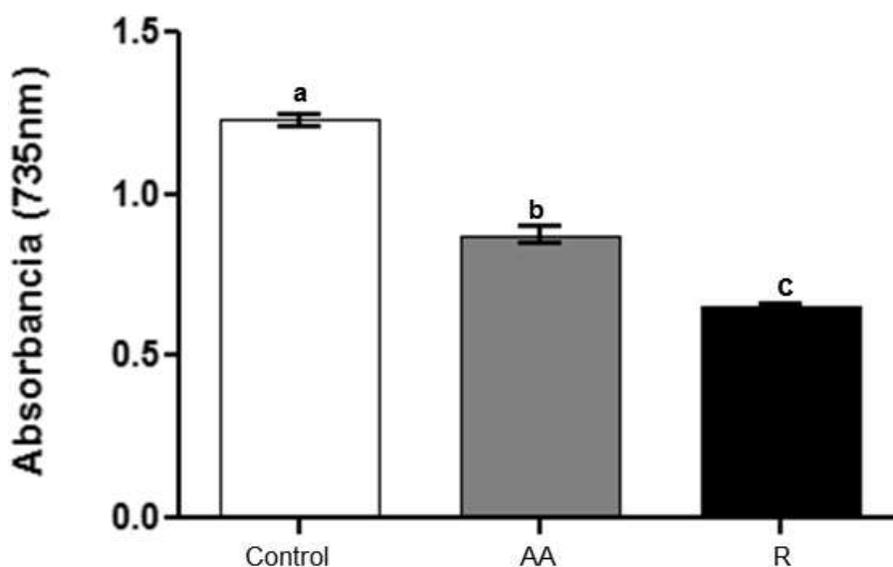


Figura 9. Efecto del ácido araquidónico y la riboflavina sobre el contenido de fenoles totales. La grafica muestra la cantidad de fenoles totales presente en el tejido de la raíz de aguacate criollo estimulado durante 4 hr. La barra blanca representa el control donde el tejido se sumergió en agua durante 4 hr. La barra gris, muestra los fenoles totales del tejido tratado con 1 mM de ácido araquidónico y la barra negra al tejido tratado con 5 mM de riboflavina. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió por triplicado con resultados similares.

7.6 Efecto de los extractos metanólicos sobre el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*

En algunos sistemas de interacción planta-patógeno se ha mostrado la presencia de varios metabolitos secundarios, que se sugiere participan en las respuestas de defensa, debido al efecto antimicrobiano observado, tales como las fitoalexinas. Debido a lo antes mencionado, realizamos una búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana en los tejidos de la raíz tratados con 1 mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina.

Como un primer acercamiento, se llevaron a cabo experimentos con extractos metanólicos en placas con medio agar papa dextrosa, en los que se espatularon 150 μ l de extractos o del solvente, equivalentes a 155 - 215 mg/ml, como se describe a continuación:

- Controles: nada, agua, metanol, metalaxil.
- Tratamientos: 1mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina.

Las placas se incubaron durante seis días a 25°C y en oscuridad, Transcurrido este tiempo se evaluó el crecimiento radial del oomiceto durante 6 días. Los resultados de las cinéticas se muestran en la figura 10. Las cinéticas sugieren que los tratamientos con ácido araquidónico y riboflavina contienen metabolitos que inhiben el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* respecto a los controles.

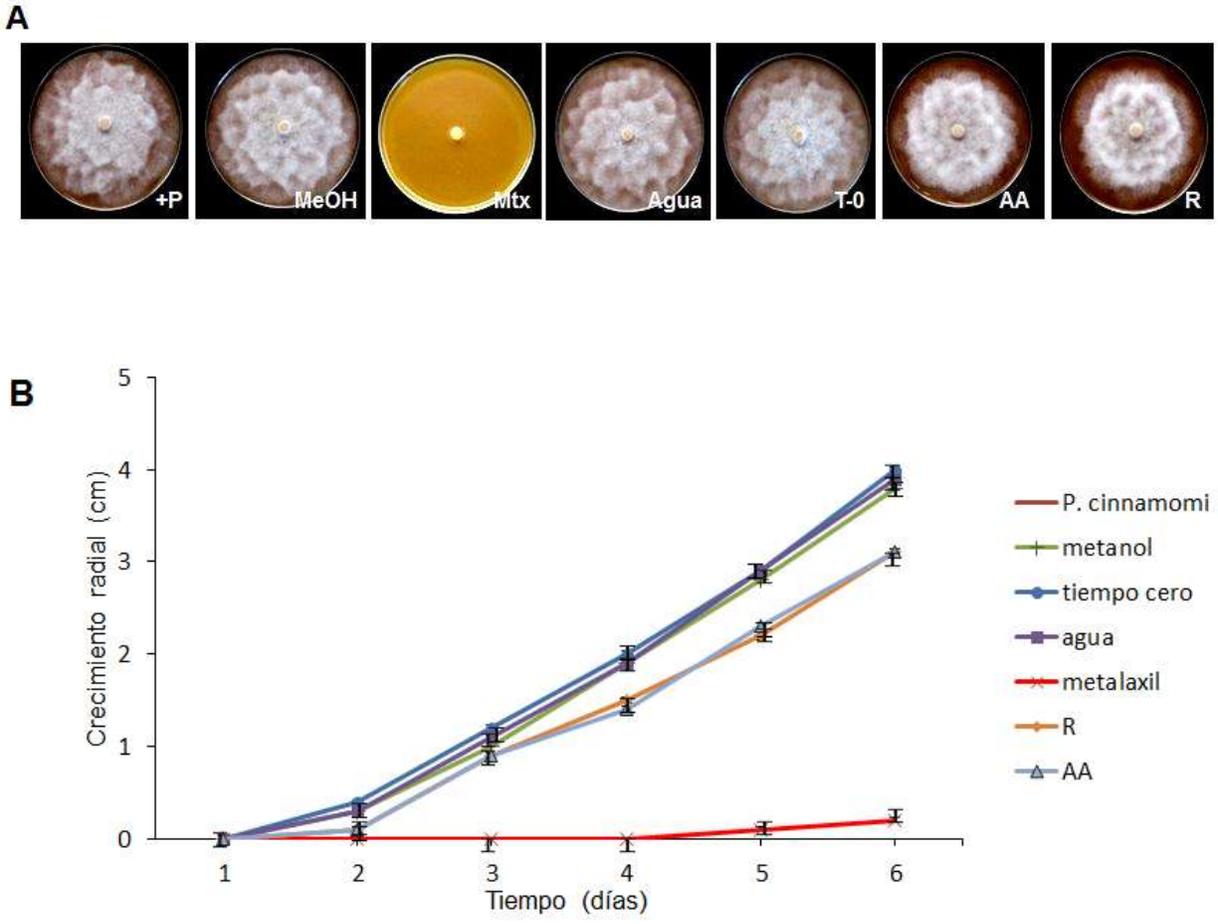


Figura 10. Efecto de los extractos metanólicos sobre el desarrollo de *P. cinnamomi*. **A)** Fotografías representativas de placas del bioensayo realizado con los extractos metanólicos donde 150 μ l de extracto equivalen a un rango de concentración de 155 a 215 mg/ml. **B)** Cinéticas del bioensayo, mostrando un desplazamiento en los tratamientos realizados respecto al control. Las barras de error representan la desviación estándar.

7.7 Efecto de los extractos metanólicos sobre la germinación de *Phytophthora cinnamomi*

Para evaluar el efecto de los extractos de tejido de raíz metanólicos previamente tratados con las soluciones de 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico sobre la germinación de zoosporas de *P. cinnamomi*, se adicionó a tubos eppendorf 1ml de la suspensión de 1×10^4 zoosporas y se agregó 50 μ l de las siguientes soluciones:

- Controles: agua, metanol, extracto de raíz no estimulado (Tiempo 0), metalaxil, y nada
- Tratamientos: extracto de raíz previamente tratada con las soluciones de riboflavina y de ácido araquidónico.

Los tubos fueron homogenizados por 1 minuto y se incubaron a 25°C por 6 días en oscuridad y 40 rpm. Posteriormente, se colocaron 15 μ l de muestra en un portaobjetos y 15 μ l de azul de lactofenol. Las laminillas fueron observadas en un microscopio Leica a 40X. En la figura 11 se muestran las fotografías representativas de los experimentos del grupo control con el micelio cenocítico característico del oomiceto. Mientras que en los tratamientos con extractos de tejido de raíz previamente estimulada, se observaron deformaciones en las hifas desarrolladas las cuales además muestran engrosamiento y algunas estructuras globulares.

Los resultados anteriores sugieren que los extractos del tejido de raíz tratados con las soluciones estimuladoras contienen metabolitos que afectan a las hifas de *P. cinnamomi*

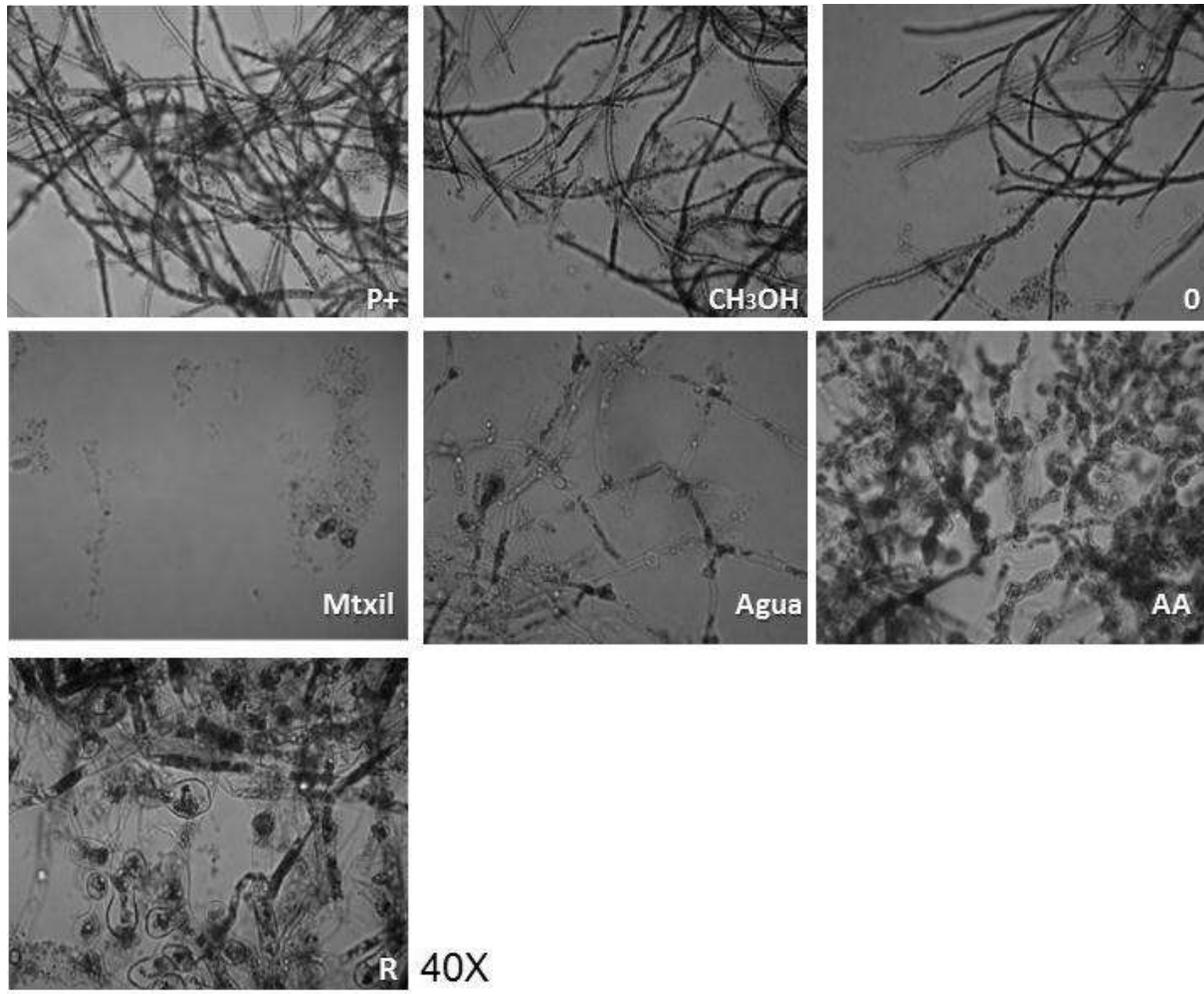


Figura 11. Efecto de los extractos metanólicos de la raíz sobre la germinación de *P. cinnamomi*. Fotografías representativas del desarrollo de las hifas del oomiceto a 40X en los controles: *P. cinnamomi*, metanol, extracto tiempo 0 y agua. Como control negativo se utilizó al metalaxil donde se observaron restos celulares y en los extractos de raíz estimulados con 1 mM de ácido araquidónico puede verse el engrosamiento de las hifas y en el tratamiento con 5 mM de riboflavina algunas estructuras globulares. Los experimentos fueron realizados al menos 3 veces con resultados similares.

7.8 Efecto de los extractos de la raíz tratados con 1 mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina sobre el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*

Posteriormente se realizaron experimentos para determinar si el efecto observado de los extractos metanólicos de raíz estimulada con 1 mM de AA y 5 mM de R se alteraba utilizando diferentes solventes. Para ello usamos solventes con distintas polaridades: metanol (muy polar), acetato de etilo (polar), hexano (no polar), los que permitiría la extracción de diferentes metabolitos con características tipo antimicrobianas es decir, de tipo fitoalexinas.

En primer lugar se realizó el tratamiento del tejido con las soluciones de 1 mM de AA y 5 mM de R, seguido del protocolo para obtener los diferentes extractos con los solventes y finalmente determinar el efecto de los extractos. Estos últimos, se colocaron en tubos eppendorf con 1 ml de 1×10^4 zoosporas de *P. cinnamomi* a los cuales se añadió 50 µl de las siguientes soluciones:

- Controles: metanol, acetato de etilo, hexanos y un grupo al que no se agregó nada.
- Tratamientos: extracto metanólico, extracto de acetato de etilo y extracto hexánico todos obtenidos de tejido de raíz estimulada con 1 mM de AA y 5 mM de R.

Se homogenizaron todos los tubos durante 1 minuto y se incubaron durante seis días en oscuridad a 40 rpm. El efecto de los extractos sobre el desarrollo de *P. cinnamomi* se evaluó colocando en un portaobjetos 15 µl de muestra y 15 µl de azul de lactofenol.

Los portaobjetos se observaron en un microscopio Leica a 40X. En la figura 12 se muestran fotografías representativas de los experimentos obteniendo los siguientes resultados; los controles mostraron un desarrollo característico de las hifas del oomiceto que no fue afectado por ninguno de los solventes usados. El efecto de los extractos de raíz metanólicos, de acetato de etilo y los hexánicos, los cuales previamente fueron estimulados con 1 mM de AA, fue la deformación de las hifas del oomiceto. Respecto a los extractos de tejido con los solventes utilizados y previamente estimulados con 5 mM de R, encontramos en las tres extracciones la presencia de estructuras globulares en las hifas de las muestras analizadas.

Los resultados permiten sugerir que en los diferentes extractos del tejido de la raíz de aguacate existen metabolitos que pudieran tener actividades semejantes. La sugerencia se debe a la observación de la presencia de estructuras globulares en el grupo de extractos estimulados con riboflavina y el efecto de deformación de las hifas del oomiceto en el grupo de extractos de raíces estimuladas con ácido araquidónico, los cuales son parecidos en todos los grupos.

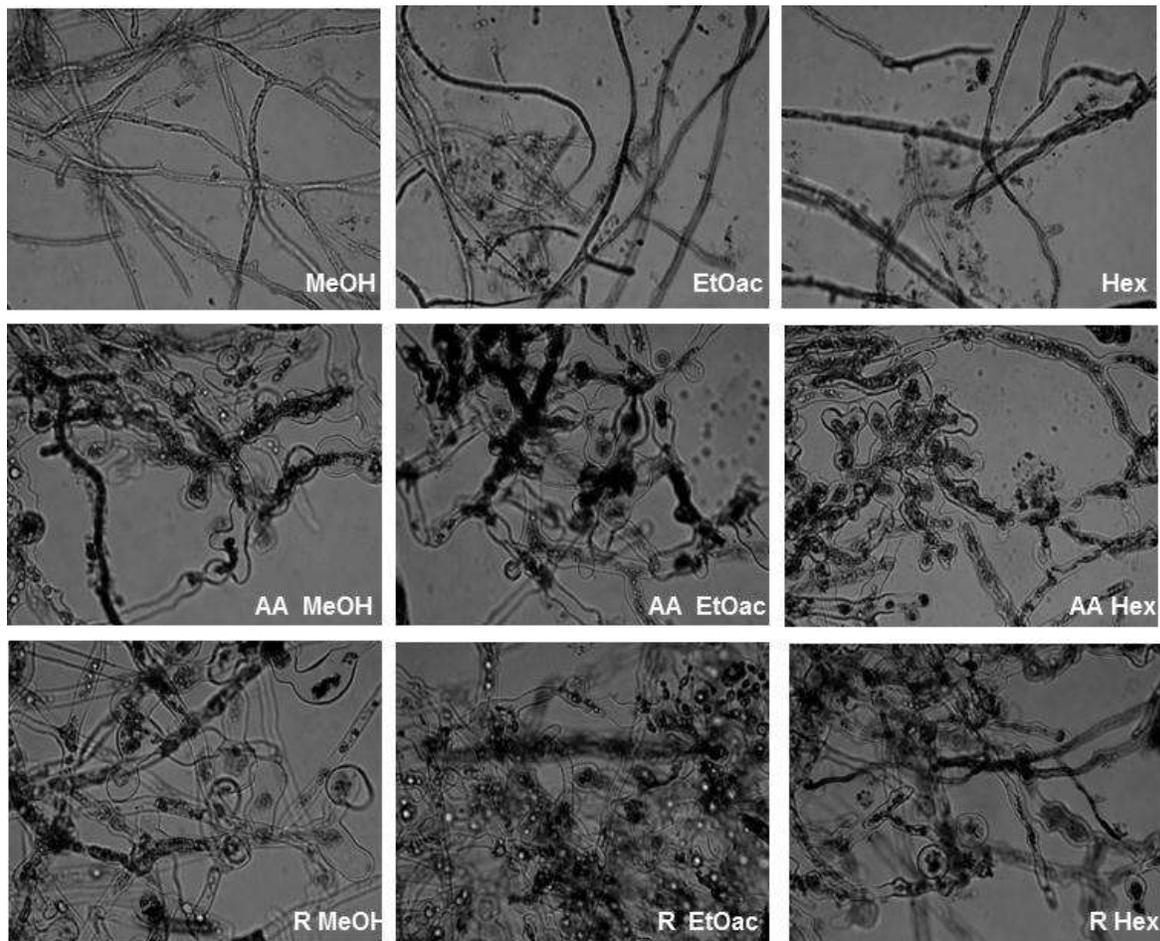


Figura 12. Efecto de los extractos de la raíz tratados con 1 mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina sobre el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*. Se muestran los controles con los solventes utilizados para las extracciones del tejido de raíz en la parte superior. En el centro, los extractos de tejidos previamente estimulados con 1 mM de AA y extraídos con los diferentes solventes y en la parte inferior los extractos de tejido de raíz estimulados con 5 mM de R y extraídos con los tres solventes. Las fotografías corresponden a tinciones con azul de lactofenol a 40X. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces con triplicados obteniendo resultados similares.

7.9 Efecto de los extractos metanólicos, de acetato de etilo y hexánicos de raíces tratadas con 1 mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina sobre el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*.

Los resultados de los experimentos con los diferentes extractos obtenidos de tejido previamente tratado con las soluciones estimuladoras de ácido araquidónico 1 mM y riboflavina 5 mM fueron interesantes y dieron lugar a la siguiente interrogante; ¿cuál sería el efecto de incrementar el volumen de los extractos de tejido de raíz sobre el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*? Para contestar la pregunta se eligieron 100 y 150 µl de cada extracto.

A tubos eppendorf con 1 ml de 1×10^4 zoosporas del oomiceto se adicionaron 100 y 150 µl de los siguientes extractos:

:

- Controles: metanol, acetato de etilo, hexano.
- Tratamientos: Extracto metanólico, de acetato de etilo y hexánico de tejidos de raíz previamente estimulados con ácido araquidónico y riboflavina.

Los tubos se homogenizaron por un minuto e incubaron en oscuridad a 40 rpm durante 6 días. Para determinar el efecto del volumen del extracto realizamos tinciones colocando sobre un portaobjetos 15 µl de muestra y 15 µl de azul de lactofenol, las tinciones se observaron en un microscopio Leica a 40X.

En la figura 13 se muestran fotografías representativas de los experimentos realizados, donde los controles se omitieron porque presentan el desarrollo característico del oomiceto. En la parte superior se presenta el grupo correspondiente a los 100 µl de extractos de raíces previamente tratadas con 1 mM de ácido araquidónico, donde se observó segmentación y agregados que pudieran ser desechos celulares de las hifas del oomiceto, mientras que para los extractos tratados previamente con riboflavina se

observó la acumulación de estructuras globulares. Por otra parte, el grupo correspondiente a 150 µl de extracto, en las muestras tratadas previamente con ácido araquidónico es evidente la pérdida del desarrollo de las hifas del oomiceto y la presencia de los desechos celulares con los tres extractos, mientras que en los extractos de raíces tratadas con riboflavina, presentan estructuras globulares definidas conocidas como clamidosporas. Estos últimos resultados sugieren que el incremento a 150 µl de extracto adicionado a las zoosporas del oomiceto tiene un efecto contrastante comparado con los controles, provocando mayor estrés en el oomiceto, debido a que en estas condiciones el oomiceto puede formar estructuras de resistencia o de sobrevivencia conocidas como clamidosporas. Interesantemente, en las muestras tratadas con extractos de tejido estimulado con ácido araquidónico el efecto fue muy agresivo e inhibitorio para el desarrollo del *P. cinnamomi*.

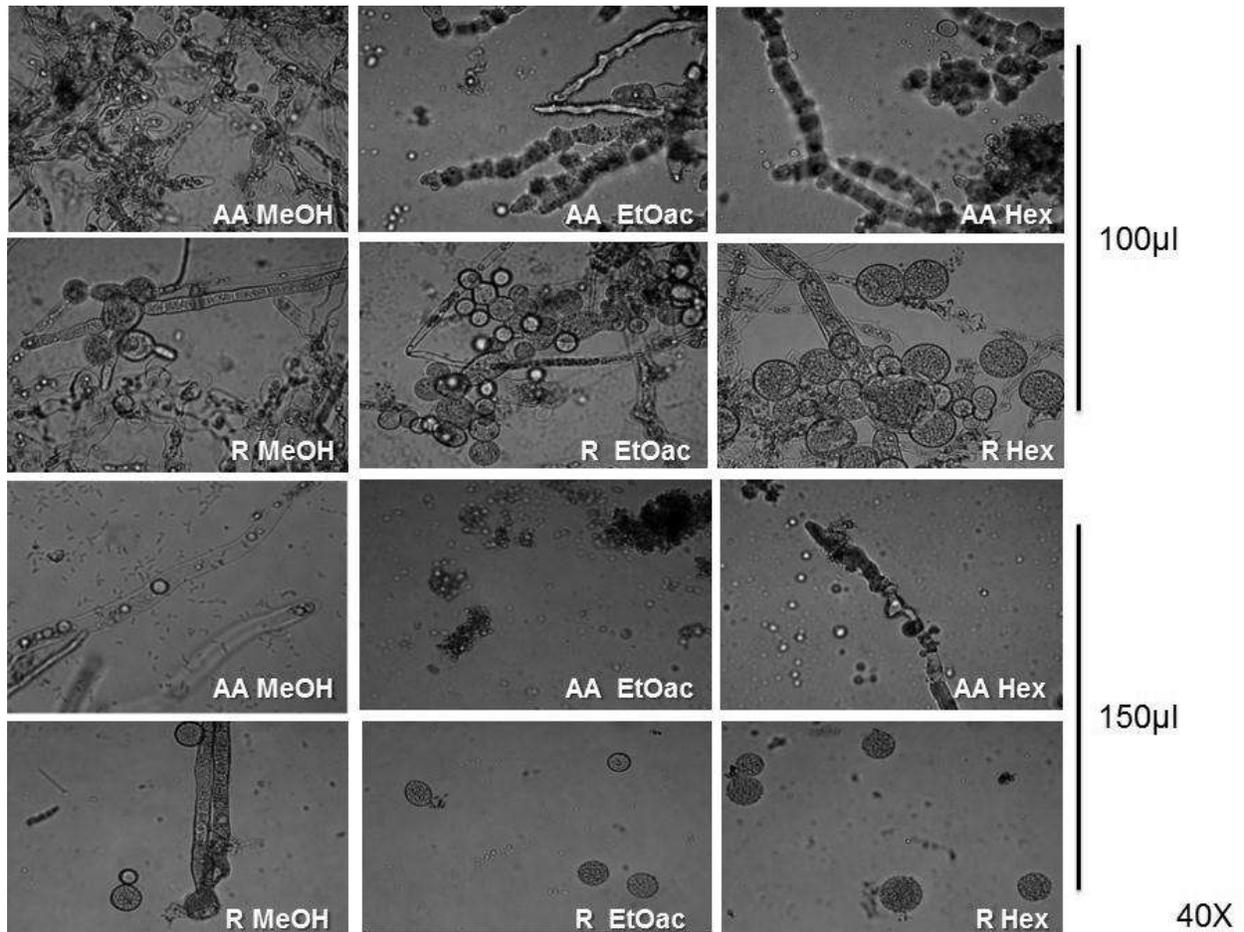


Figura 13. Efecto de los extractos de raíces tratadas con 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico. Fotografías representativas del efecto de 100 y 150 μ l de extractos de raíces tratadas con 5 mM de riboflavina y 1 mM de ácido araquidónico sobre 1×10^4 zoosporas/ml de *P. cinnamomi* a los 6 días de incubación. Al menos se realizaron tres tinciones con azul de lactofenol para cada tratamiento, los experimentos se hicieron por duplicado con resultados similares.

7.10 Efecto de los extractos hexánicos de la raíz tratada con ácido araquidónico y riboflavina sobre el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*.

Los resultados anteriores mostraron datos interesantes con 150 µl de extractos hexánicos sobre el desarrollo del oomiceto. En el caso de los tejidos estimulados con riboflavina, se observó la ausencia de hifas del oomiceto y la formación de clamidosporas, mientras que para los tejidos tratados con ácido araquidónico observamos segmentación de las hifas hasta su desintegración. Para evaluar el efecto del extracto hexánico de raíz estimulada con ácido araquidónico y riboflavina sobre el desarrollo de *P. cinnamomi*, se colocaron en tubos eppendorf, 1 ml de 1×10^4 zoosporas e incubaron durante 6 días a 25°C en oscuridad a 40 rpm. Posteriormente, se agregó: 150 µl de extractos hexánicos a 5 tubos (control), 150 µl de extracto de raíz estimulada con riboflavina a 5 tubos (R 5 mM) y 150 µl de extracto de raíz estimulada con ácido araquidónico a 5 tubos (AA 1 mM). Las muestras se homogenizaron por 1 min e incubaron en oscuridad a 25°C y 40 rpm. Se realizó una cinética que consistió en tomar 15 µl de muestra a las 0, 48 y 72 hr posteriores a la adición de los extractos hexánicos y 15 µ de azul de lactofenol en un portaobjetos para determinar el efecto en las muestras con sus respectivos tratamientos. En la figura 14 se observó que en las muestras correspondientes al grupo control, el desarrollo es el característico de *P. cinnamomi*; el grupo tratado con extracto de raíz hexánico estimulado con 5 mM de riboflavina mostró a las 48 hr la presencia de estructuras globulares y a las 72 hr algunas clamidosporas. Finalmente, el grupo tratado con extracto de raíz hexánico estimulado con 1 mM de ácido araquidónico, a las 48 hr las hifas presentaron restos celulares, y las 72 hr se determinó una importante disminución del desarrollo de hifas, lo que sugiere su posible degradación.

Los resultados aquí obtenidos muestran en las cinéticas efectos contrastantes, donde el extracto hexánico del tejido estimulado con ácido araquidónico fue mas agresivo para degradar las hifas del oomiceto.

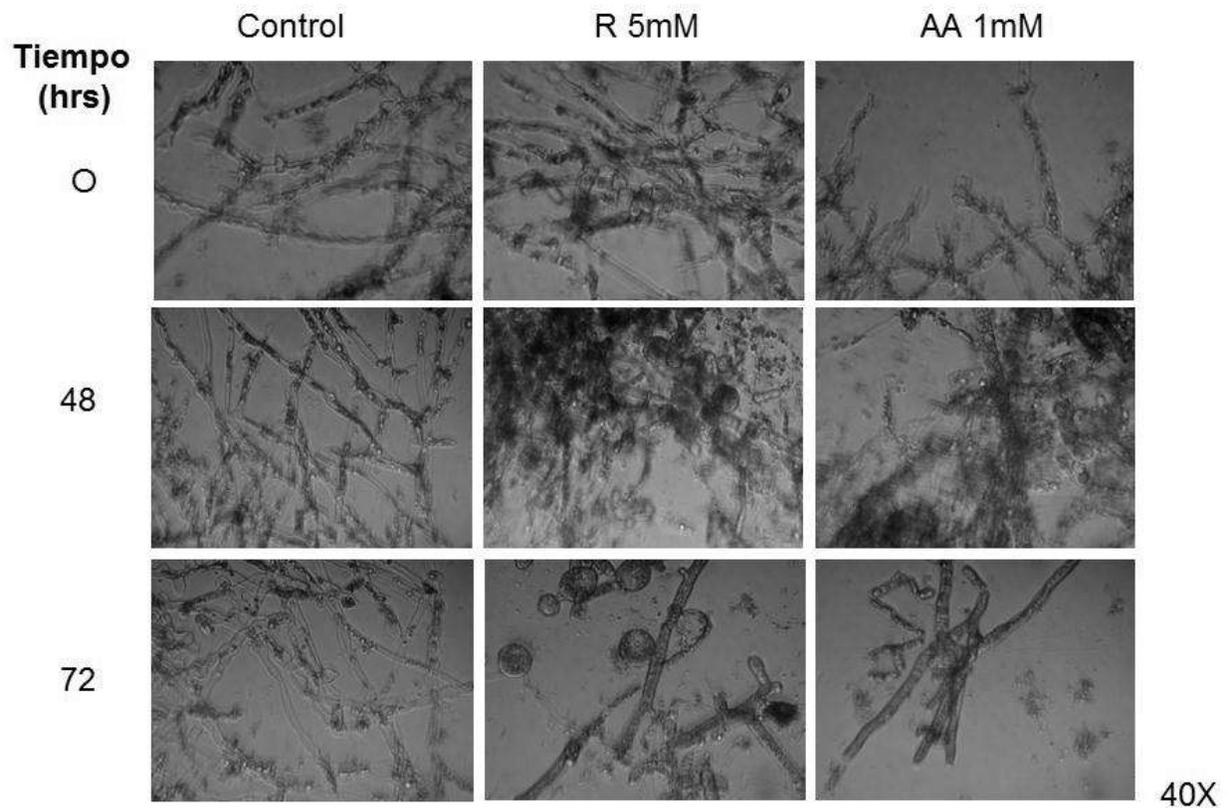


Figura 14. Efecto de los extractos hexánicos de raíz estimulada con ácido araquidónico y riboflavina sobre el desarrollo de *P. cinnamomi*. Las imágenes muestran la cinética del efecto de los extractos de raíz hexánicos aplicados al desarrollo de *P. cinnamomi*, se realizaron tinciones con azul de lactofenol de tres muestras para cada tratamiento. El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

7.11 Efecto del extracto hexánico de raíz tratada con ácido araquidónico sobre el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*.

Los resultados del efecto del extracto hexánico de raíz estimulada con ácido araquidónico sobre el desarrollo de *P. cinnamomi*, así como en experimentos de la cinética realizada sugieren que el extracto contiene metabolitos tipo fitoalexinas con un efecto en la degradación del oomiceto. Realizamos experimentos para la cuantificación del desarrollo de *P. cinnamomi*, en los cuales se utilizaron tubos con 1 ml de 1×10^4 zoosporas a los que se adicionaron 150 μ l de las siguientes soluciones:

- Controles: agua, hexanos, metalaxil, extracto de raíz sin estimular.
- Tratamientos: Extracto hexánico de tejido de raíz estimulada con ácido araquidónico 1 mM

Se homogenizaron los tubos por 1 min y se incubaron a 25°C en oscuridad y 40 rpm. Posteriormente, se determinó el desarrollo del oomiceto durante 12 días midiendo la absorbencia a 620nm. Los resultados obtenidos se graficaron, mostrando en el caso de los grupo control (agua, hexanos, metalaxil, extracto de raíz sin estimulador) una cinética característica del desarrollo del oomiceto. El grupo control con metalaxil inhibió el desarrollo del oomiceto debido a que es un fungicida utilizado para su control; los tratamientos con el extracto hexánico de raíz estimulada con ácido araquidónico mostraron un desplazamiento a la derecha a partir del día 5, datos que correlacionan con los experimentos anteriores, donde se observó la degradación de hifas y por consecuencia la disminución del desarrollo de *P. cinnamomi* (Figura 15).

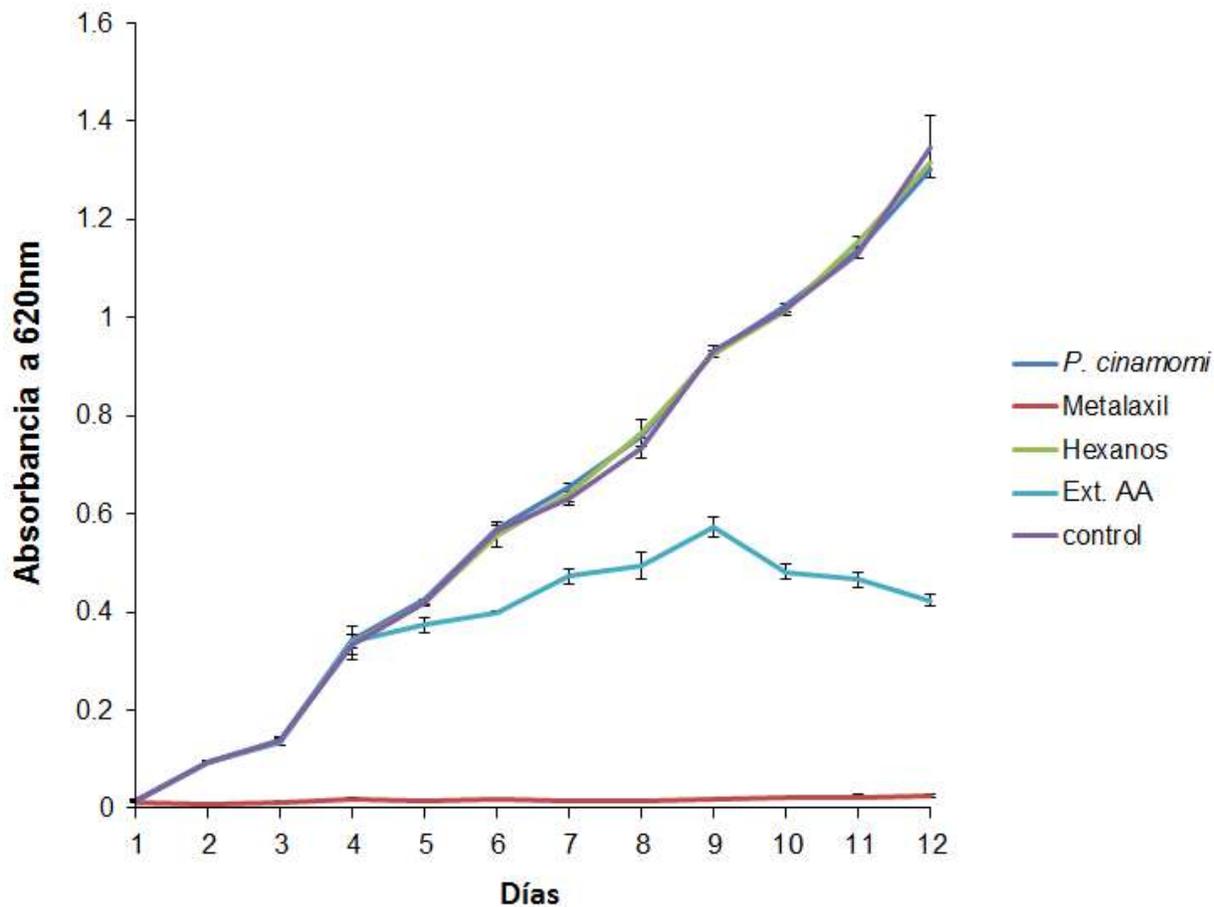


Figura 15. Efecto del extracto hexánico de raíz estimulada con ácido araquidónico sobre el desarrollo de *P. cinnamomi*. Cinética de crecimiento para los grupos control (agua, hexanos, metalaxil, extracto control) y con diferentes tratamientos (extracto hexánico de raíz estimulada con AA 1mM). Las barras de error representan el error estándar. El experimento se repitió por duplicado obteniendo resultados similares.

Realizamos una modificación al experimento anterior para determinar el efecto de los extractos sobre el micelio de seis días de crecimiento del oomiceto. Tubos con 1 ml de 1×10^4 zoosporas de *P. cinnamomi* se incubaron a 25°C en oscuridad a 40 rpm durante 5 días y el desarrollo del oomiceto fue avaluado diariamente midiendo la absorbencia a 620 nm y al sexto día se adicionó 150 µl de las siguientes soluciones:

- Control: agua, hexanos, extracto de raíz sin estimular y metalaxil.
- Tratamiento: extracto hexánico de raíz estimulada con 1 mM de ácido araquidónico.

Se homogenizaron los tubos con sus respectivos tratamientos y se incubaron a 25°C en oscuridad a 40 rpm, se continuó evaluando el desarrollo hasta completar los 12 días.

Los resultados obtenidos se graficaron como se muestran en la figura 16, donde el control muestra la cinética característica del desarrollo de *P. cinnamomi*. Los tratamientos con extracto hexánico presentaron una cinética común hasta los 6 días, y después de adicionar el extracto hexánico, al día 7 se observó un desplazamiento de la curva así como una caída hasta el término de la cinética.

Los resultados anteriores sugieren que el extracto hexánico contiene metabolitos capaces de actuar sobre el micelio del oomiceto provocando su destrucción, dichos datos resultan interesantes abriendo la posibilidad de realizar experimentos para identificar cuáles son los metabolitos contenidos en el extracto hexánico del tejido de la raíz del aguacate que tienen este efecto sobre el oomiceto *P. cinnamomi*.

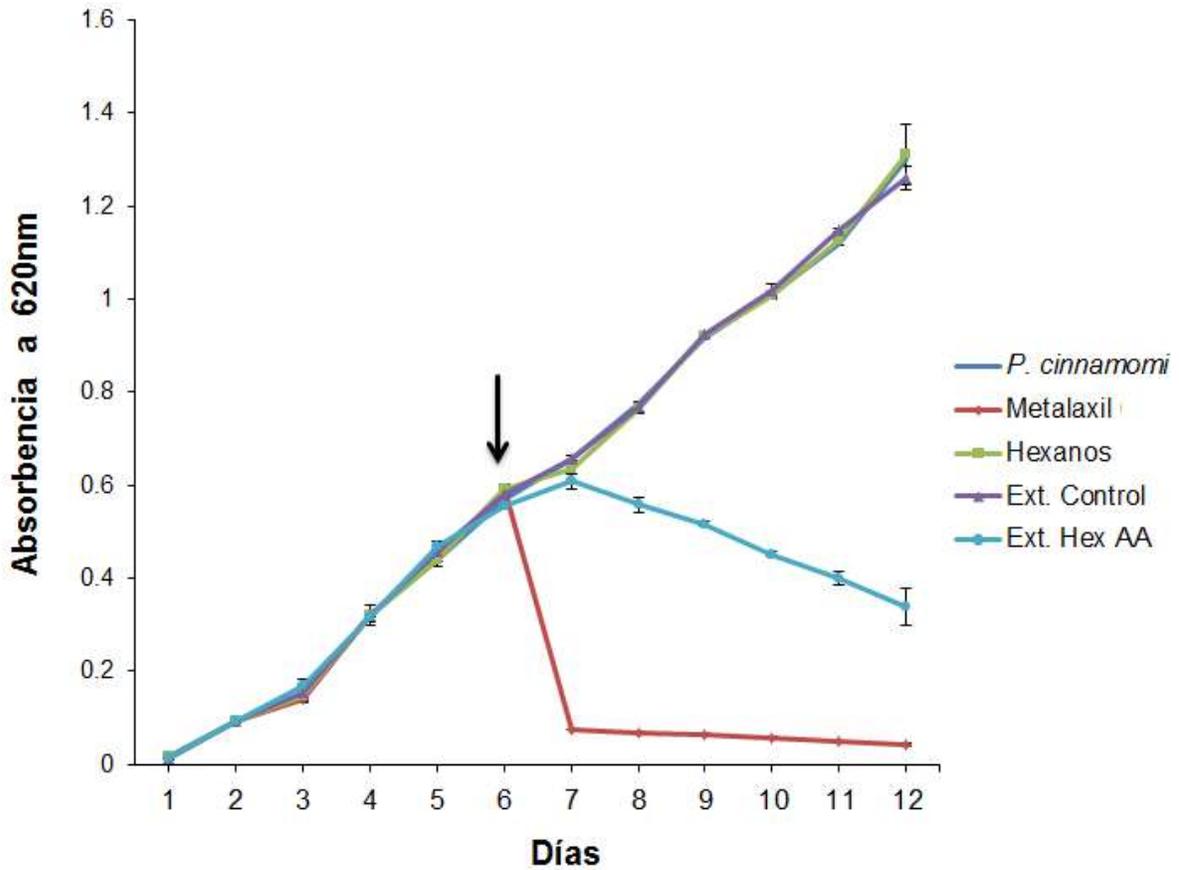


Figura 16. Efecto del extracto hexánico de la raíz aplicado a los 6 días del desarrollo de *P. cinnamomi*. Cinética obtenida del control (agua, hexanos, metalaxil, extracto control) y diferentes tratamientos (extracto hexánico de raíz estimulada con 1 mM de AA). La flecha indica el día en que se adicionó los 150 μ l de los tratamientos a los diferentes grupos. Las barras de error representan el error estándar. El experimento se repitió por duplicado obteniendo resultados similares

8. DISCUSIÓN

Phytophthora cinnamomi es la especie de *Phytophthora* mas ampliamente distribuida que puede colonizar las raíces de alrededor de 1000 especies de hospederos, induciendo efectos dañinos, como el impedimento al acceso de los nutrientes por las plantas (Judelson y Blanco, 2005). La mayor pérdida de aguacate en el país ocurre por la enfermedad de la pudrición de la raíz que se produce por la colonización de los propágulos infectivos del oomiceto al tejido de raíz del aguacate.

La planta modelo de estudio *Persea americana* Mill Var. *Drymifolia* posee una importancia económica debido a que es el cultivo de mayor exportación en el país. Mediante el desarrollo de un sistema de interacción *in vitro* de *P. cinnamomi*- *Persea americana* Var. *Drymifolia*, se mostró que la inoculación del tejido de la raíz de aguacate criollo con 1×10^4 zoosporas/ml de *P. cinnamomi* es colonizado a las 72 hr de incubación (Fig. 5). Este efecto se debe a que las zoosporas pueden germinar directamente sobre el tejido, para formar hifas o producir esporangios en condiciones en que las zoosporas puedan moverse en el tejido. Aunque las hifas infectan las raíces, las zoosporas son el común propágulo infectivo y la fuente de inoculación del oomiceto (Downer et al., 2001).

El efecto antes mencionado se correlacionó con la estimulación de las respuestas de defensa en el tejido de la raíz tratada con 1 mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina durante 4 hr e inoculado con la suspensión de 1×10^4 zoosporas/ml de *P. cinnamomi*. Dichos experimentos mostraron en los explantes de la raíz tratados con las soluciones estimuladoras una disminución en la colonización del tejido respecto al control (Fig. 6). Los tratamientos a las plantas con estimuladores de respuestas parecen

incidir en una inducción contra el patógeno (Lawton et al., 1996). Descartando un efecto directo de los estimuladores de defensa sobre el oomiceto (Fig. 7).

Recientes investigaciones muestran que los patógenos son productores de un gran número de metabolitos estructuralmente diversos, que tienen funciones sumamente importantes en las interacciones con las plantas y otros microorganismos. Estos metabolitos se encuentran implicados en redes complejas de transducciones de señales (Hardman et al, 2004).

Las interacciones entre las células vegetales y los patógenos promueven las respuestas de defensa en las cuales intervienen la señalización de diversos eventos en ambos, a nivel celular el resultado del reconocimiento se manifiesta, como una necrosis localizada en el lugar del ataque, además de diversos cambios celulares como el estallido oxidativo que produce la formación de especies reactivas de oxígeno (Lamb y Dixon 1997). El efecto observado de la inhibición de *P. cinnamomi* correlaciono con el estudio de algunas respuestas de defensa que se inducen con la aplicación de los estimuladores, una de ellas fue la acumulación de las especies reactivas de oxígeno (Fig.8), donde los resultados mostraron incremento con el tratamiento con ácido araquidónico respecto al control, los resultados oscilaron constantemente por la presencia del agua y el tiempo en que se llevo a cabo la determinación.

La producción de EROS en dichas interacciones impide el acceso al tejido del hospedero en los estados tempranos de infección y consiguiente crecimiento y desarrollo del patógeno (Able et al., 2000).

Por otro lado, recientes investigaciones muestran a una diversidad de compuestos bioactivos que poseen capacidad antioxidante e inhibición de la peroxidación de lípidos, e incluyen carotenoides, tocoferoles, ácidos fenólicos, fitosteroles, flavonoides y antocianinas (Sayed et al., 2008). Específicamente algunos flavonoides han mostrado que afectan la resistencia a la enfermedad modulando los niveles de los compuestos antifúngicos preformados en las plantas los cuales contrarrestan el ataque del patógeno (García et al., 2009). En el presente estudio, los experimentos realizados con la

estimulación del tejido de la raíz con 1 mM de ácido araquidónico y 5 mM de riboflavina mostraron una disminución de los fenoles totales en el tejido de la raíz respecto al control, mientras que el tejido estimulado con riboflavina mostró una disminución del 50% respecto al control (Fig. 9), estos resultados sugieren que esta respuesta de defensa no se activo al estimular el tejido.

El efecto sobre la inhibición de la colonización del tejido (mostrado en datos anteriores), sugiere la participación de algunos compuestos derivados del metabolismo secundario. Como se ha descrito diversos metabolitos funcionan como compuestos antimicrobianos (fitoalexinas) y se ha reportado que la aplicación de los estimuladores a las plantas induce la acumulación de estos compuestos (Adikaram et al., 1988).

Reportes recientes muestran que las extracciones metanólicas en algunas especies de plantas contienen fitoalexinas. Aquí, se realizaron experimentos para la búsqueda de estos metabolitos en extractos metanólicos de tejidos tratados con soluciones de ácido araquidónico y riboflavina, para lo cual, primero se realizó un bioensayo para descartar el efecto de los extractos sobre el desarrollo de *P. cinnamomi*. Los datos encontrados sugieren que los extractos obtenidos del tejido tratado con ambas soluciones contiene metabolitos que inhiben el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* respecto a los controles (Fig. 10).

Anteriormente se había mencionado que las zoosporas son el principal propágulo infectivo de *P. cinnamomi* por lo que se realizaron experimentos sobre la germinación de estas estructuras para evaluar si los extractos metanólicos obtenidos tienen un efecto sobre dichas estructuras. Los resultados mostraron que los extractos del tejido de la raíz tratados con las soluciones estimuladoras contienen metabolitos que no afectan a la germinación de las zoosporas, sin embargo los extractos mostraron un efecto sobre el desarrollo de las hifas de *P. cinnamomi* respecto al control (Fig. 11).

Los datos encontrados nos permitieron realizar experimentos para evaluar el efecto de los extractos de la raíz tratada con las soluciones estimuladoras de ácido araquidónico y riboflavina, obtenidos a partir de solventes con diferente polaridad sobre el desarrollo del oomiceto, mostrando que en los extractos del tejido de la raíz de aguacate existen metabolitos que pudieran tener actividad semejante, por la presencia de estructuras globulares en los extractos estimulados con riboflavina con los tres extractos utilizados y el efecto de deformación de las hifas en los estimulados con ácido araquidónico sobre *P. cinnamomi* es parecido en todos los grupos de los tres extractos utilizados (Fig. 12).

Debido a que los extractos obtenidos mostraron datos interesantes decidimos evaluar el efecto de la dosis sobre el crecimiento del oomiceto, para lo que se utilizaron dos cantidades, 100 y 150 μ l de los extractos de la raíz (hexánicos, etil acetato y metanol) obtenidos con los dos estimuladores (riboflavina y ácido araquidónico), mostrando segmentación y agregados de desechos celulares en los tratados con extractos de la raíz estimulada con 1 mM de ácido araquidónico, mientras que los datos con extracto de la raíz tratado con 5 mM de riboflavina muestran la formación de estructuras globulares correspondientes con la literatura a las estructuras de resistencia del oomiceto llamadas Clamidosporas, las cuales se caracterizan por tener una membrana gruesa que le permiten soportar las condiciones adversas en que se encuentra *P. cinnamomi* (Fig. 13).

Los datos antes mencionados se correlacionaron con el tiempo para lo que se realizó una cinética utilizando solamente los extractos hexánicos que fueron con los que se manifestaron los efectos contrastantes en el desarrollo del oomiceto. Los resultados mostraron un efecto a las 48 hr después del tratamiento, con la disminución en el desarrollo y la degradación de las hifas de *P. cinnamomi* (Fig.14).

Se realizaron cuantificaciones del desarrollo del oomiceto en forma de suspensiones. Para lo que se realizó un primer método de cuantificación del desarrollo del oomiceto con las zoosporas, con el extracto hexánico de la raíz tratada con 1 mM de ácido araquidónico, los resultados mostrados sugieren que no tiene efecto sobre la germinación, sin embargo claramente el extracto actúa sobre el micelio, mostrado en la cinética el desplazamiento de la curva como el control negativo (metalaxil) (Fig. 15). En el segundo método se realizó una modificación del método anterior, se dejaron incubar las zoosporas durante seis días, día en el que se trataron con los extractos hexánicos de raíz tratada con 1 mM de ácido araquidónico, mostrando rápidamente la disminución del desarrollo del oomiceto a las 48 horas post tratamiento (Fig. 16). Sugiriendo que las extracciones del tejido de la raíz poseen numerosos metabolitos posiblemente muchos de estos tengan características de antimicrobianos que pudieran ayudar al control de la infección por *P. cinnamomi*.

9. RESUMEN DE RESULTADOS.

- La estimulación de tejido de raíz de aguacate con ácido araquidónico y riboflavina inhiben el desarrollo de *P. cinnamomi*.
- Los estimuladores por si solos no tienen un efecto directo en el desarrollo de *P. cinnamomi*.
- Extractos de raíz estimulada con riboflavina muestran un efecto en la morfología del desarrollo característico de *P. cinnamomi*.
- Extractos de raíz estimulada con ácido araquidónico muestran un efecto destructivo en las hifas de *P. cinnamomi*.

10. CONCLUSION.

Las concentraciones utilizadas de Ácido araquidónico y Riboflavina utilizadas en este trabajo inhiben el desarrollo de *Phytophthora cinnamomi*.

11. PERSPECTIVAS.

Los datos presentados en este trabajo muestran la importancia de la aplicación de moléculas que promuevan la inducción de las respuestas naturales que poseen las plantas en el ataque de organismos patógenos. Nuestros resultados muestran que los extractos de la raíz poseen metabolitos que inhiben al oomiceto *Phytophthora cinnamomi*. Resultando interesante continuar con el estudio y caracterización de los extractos aquí presentados. Por lo que probablemente el uso de estas moléculas en el cultivo de aguacate promete generar nuevos conocimientos en el control de la enfermedad producida por el oomiceto.

12. Literatura citada

Adikaram N. K., Averil E. B., Swinburne T. R. 1988. Phytoalexin induction as a factor in the protection of *Capsicum annuum* L. Fruits against infection by *Botrytis cinerea* Pers. J. Phytopathol. **122**:267-273

Arreola C. A., Castro M. E., Lozoya G. E., García P. E. 2007. Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) induced by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst. Physiol. Mol. Plant Pathol. **70**: 69-76.

Blumwald E., Aharon G. S., Lam B. C. H., 1998. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. Trends plant science **3**: 342-346.

Besser K., Jarosh B., Langen G., Kogel K. H., 2000. Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. Mol. Plant. Pathol. **1**: 177-286.

Catterall W. A. 2008. structure and function voltage-sensitive ion channels. Science **242**: 50-61.

Conrath U., Thulke O., Katz V., Schwindling S., Kohler A. 2001. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. Eur J. Plant Pathol. **107**: 113-119.

Cortés R. M. A., Hernández G. A., López G. R., Salgado G. R. 2010. La búsqueda de genes de resistencia como una alternativa para la selección de portainjertos de aguacate con tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*. Biológicas. **12**: 143-150.

Delledone M., Zeir J., Marocco A., Lamb C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 13454-13459.

Dickinson M. 2003. Fungal and oomycete diseases- development of disease. Mol. Plant Pathol. **3**: 47-64.

Dixon R. A., Lamb C. J. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. Physiol Plant Mol. Biol. **41**: 339-367.

Dong H., Beer S. V. 2000. Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. Phytopathol. **90**: 800-811.

Downer A. J. Menge J. A. Pond E. 2001. Effects of Cellulytic enzymes on *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathol. 91: 839846

Eden M. A., Hill R. A., Galpoththage M. 2000. An efficient baiting assay for quantification of *Phytophthora cinnamomi* in soil. Plant Pathology **49**: 515-522.

Gisi U., Schwinn F. J., Oertli J. J. 2000. Dynamics of germination in *Phytophthora* sporangia. Trans. Br. Mycol. Soc. **72**: 437-446.

Gabor B. K. y Coffey M. D. 1991. Comparison of rapid methods for evaluating resistance to *Phytophthora cinnamomi* in avocado rootstocks. Plant Dis. **75**: 118-129.

García M. R. y Pérez L. R. 2003. Las fitoalexinas en las plantas. Ciencias forestales y del ambiente. **9**: 5-12.

García P. E., Benezzer B. M., Gutiérrez S. A., Rangel S. G., Arreola C. A., Castro M. E. 2009. Regulation of defense in avocado roots infected with *Phytophthora cinnamomi* (Rands). Plant Soil. 1-12.

Glyan'ko A. K., Ischenko A. A. 2010. Structural and functional characteristics of plant NADPH oxidasa: a review. Appl. Biochem. Microbiol. **46**: 463-471.

Graham J. H., Leite R. P. 2004. Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. Plant Dis. **88**: 745-751.

Hardman A. R. 2001. Cell biology of fungal infection of plants. Mycota VIII: Biology of the fungal cell. Gow N. R. eds. 91-123.

Hardman G. E., Howell C. R., Viterdo A., Chet I., Lorito M. 2004. Trichoderma species: opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. **2**: 43-56.

Hulbert H. S., Webb A. C., Smith M. S., Sun Q. 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. Ann. Rev. Phytopathol **39**: 285-312.

Ishii H., Tomita Y., Takesi H., Narusaka Y., Nakasawa Y., Nishimura K., Iwamoto S. 1999. Induced resistance of acibenzolar S- methyl (CGA245704) to cucumber and Japanese pear diseases. J. Plant Pathol. **105**: 77-85.

Judelson H. S. y Blanco F. A. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. Nature **3**: 47-58.

Kamoun S. 2003. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell* 191-199.

Kuc J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Phytopathol.* **33**: 273-297.

Lamb C., Dixon R. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **48**: 251-275.

Lara C. M., Gutierrez C., Andrade H. 2005. La industria del aguacate. *Revista de investigaciones agrícolas.* **23**:40-43.

Latijnhouwers M., Pierre J. G. M., Govers F. 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiol.* **11**: 462-469.

Laxalt A. M. y Munnik T. 2002. Phospholipid signaling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 332-338.

Lawton K., Friedrich L., Hunt M., Weymann K., Staub T., Kessmann H., Ryals J. 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* **10**: 71-82.

Mendgen K., Hahn M., Deising H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* **34**: 367-386.

Métraux, J. P. Ahl-goy P., Staub T., Speich J., Steinemann A., Ryals J., Ward E. 2004. Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6- dichloro-isonicotinic acid and pathogens. *Adv. Mol. Genetics Plant. Microbe Interact.* **1**: 432-440.

Moreno N. P. 1984. Glosario botánico ilustrado. Investigaciones sobre recursos botánicos. CECSA. 290-300.

Ochoa A. S. 2008. Resistencia inducida a *Phytophthora cinnamomi* en aguacate mexicano por acción del fosfito de potasio. Claridades agropecuarias. **10**:194-200.

Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B., Staub T. 2001. Induced diseases resistance in plants by chemicals. Eur. J. Plant Pathol. **107**:19-28.

Packer L., Podda M., Kitazawa M., Thiele J., Saliou C., Witt E., Traber M. 1996. Vitamin and the metabolic antioxidant network. Mol. Mechanisms Signal Membrane Transport. KJAW ed. Springer-Verlag. 283-304.

Ramírez R. V., Lopez B. J., Herrera E. I. 2005. Adaptative responses of plants to nonoptimal soil pH. Plant abiotic stress. Wiley-Blackwell. India **288**: 145-164.

Ramos T., Bellaj M., Idrissi-Tourane A., Daayf F., Hadrami I. 1997. Les phenolamides des rachis de plames vis a vis *Fusarium oxysporum* f. sp. Journal of phytopathology **145**: 487-493.

Riveros A. S. 2004. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia incorporadas en programas de agricultura sostenible. Manejo Integrado. **61**: 4-11.

Reichling J. 1999. Plant-microbe interactions and secondary metabolites with antiviral, antibacterial and antifungal properties. Fisiol. Mol. Plant Pathol. **50**: 167-178.

Rodríguez Suppo F. 1992. Descripción botánica del aguacate. Ed. AGT **1**:13-26.

Rodríguez C. M. A., Hernández G. A., López G. R., Salgado G. R. 2010. La búsqueda de genes de resistencia como una alternativa para la selección de portainjertos de aguacate con tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*. *Biológicas* **12**: 143-150

Rossmann Y. A. y Palm M. E. 2007. Why the *Phytophthora* and other oomycota not true fungi? *Mycol.* **58**: 216-219.

Rumbaugh P. K. 2007. Convergence of hormones and autoinducers at the host/pathogen interface. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**:425-435.

Sayed M., Aal A. y Rabalski I. 2008. Bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. *Agriculture Journal.* **2**:7-14

Schwinn F. y Staub T. 1995. Oomycetes fungicides. In modern fungicides selective: properties, applications. Lyr H. Ed. 323-344.

Singer S. J. y Nicolson G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.

Spletzer M. E., Enyedi A. J. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathol.* **89**: 722-727

Tucker S. L. y Talbot N. J. 2001. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 385-417.

Vasyukova N. I. y Ozeretskovskaya O. L. 2007. Induced plant resistance and salicylic acid: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* **43**:367-373.

Vidhyasekaran P. 2004. Molecular biology of pathogenesis and induced systemic resistance. *Indian Phytopathol.* **51**: 111-120

Vorwerk S., Somerville S., Somerville C. 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Science.* **9**: 202-209.

Walters D., Cowley T., Mitchell A. 2002. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *J. Exp. Botany* **53**:747-756.

Watson D. G., Brooks J. W. 1984. Formation of capsidiol in *Capsicum annuum* fruits in response to non-specific elicitors. *Physiol. Plant Pathol.* **14**: 331-337.

Wojtaszek P. 2006. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**: 681-693.

Zimmerli L., Jakab G., Métraux J. P., Mauch-Mani B. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12920-12925.

Zentmyer G. A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and diseases it causes. In monograph 10 The American Phytopathol. Society. 3340-3349.

Zentmyer G. A., Erwin D. C. 1970. Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology* **60**: 1120 – 1127.