



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN AGUACATE CRIOLLO
(*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) EN RESPUESTA A
LA INFECCIÓN POR *Phytophthora cinnamomi* Rands.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA
BIOL. MICAELA BENEZER BENEZER

ASESOR
D.C. ERNESTO GARCÍA PINEDA

MORELIA, MICHOACÁN, SEPTIEMBRE DEL 2008

IIQB

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Al ángel que estuvo conmigo en una etapa crucial de mi vida al cual le debo en gran parte estar en donde estoy ahora.

Al D.C. Ernesto García Pineda, por aceptar nuevamente ser mi asesor, por su paciencia y apoyo incondicionales, y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia.

A los D.C. Homero Reyes de la Cruz, D.C. Rafael Salgado Garciglia y D.C. Salvador Manso Avalos por aceptar ser parte de mi comité tutorial y brindarme su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A los D.C. Abraham García Chávez y Rafael Salgado Garciglia por haberme proporcionado las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Phytophthora cinnamomi*, respectivamente, utilizadas en esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio: Araceli, Areli, Elda, Gerardo, Jonathan, Luis, Nichi, y en especial, a Martha y Cintia. Por hacer más amenas las horas de trabajo.

A mis amigos Cintia y Randy, por su apoyo y amistad en todo momento.

Al personal directivo, docente, técnico y administrativo que conforma al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas por las facilidades otorgadas y por conjuntar un ambiente favorable para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada. No. de registro 199134.

“Science is nothing but developed
perception, interpreted intent, common
sense rounded out and minutely
articulated”

George Santayana

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D.C. Ernesto García Pineda.

	Pág.
CONTENIDO	i
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	iv
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	3
2.1. El aguacate (La planta)	3
2.1.1. Descripción botánica de <i>Persea americana</i>	6
2.1.2. Enfermedades del aguacate	7
2.1.2.1. Pudrición de la raíz o muerte descendente del aguacate	8
2.2. <i>Phytophthora cinnamomi</i> (El patógeno)	10
2.2.1. Descripción de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands.	10
2.2.2. Ciclo de vida	11
2.2.3. Ciclo de la enfermedad	13
2.3. Interacción planta-patógeno	15
2.3.1. Mecanismos de defensa en plantas	15
2.3.2. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	17
2.3.2.1. Anión superóxido	19
2.3.2.2. Peróxido de hidrógeno	19
2.3.2.3. Radical hidroxilo	21
2.3.2.4. El efecto de la acumulación de ERO varía dependiendo del tipo de patógeno	22
2.3.2.4.1. Tipos de patógenos con base en su estrategia de adquisición de nutrientes	22
2.3.2.4.2. Efecto de la acumulación de ERO dependiendo del tipo de patógeno	23
2.3.3. Sistemas antioxidantes en plantas	24
2.3.3.1. Peroxidasas (PODs)	25
2.3.3.2. Flavonoides	27

2.3.4. Lignificación	31
2.3.5. Antioxidantes producidos por patógenos	32
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. HIPÓTESIS	35
V. OBJETIVOS	36
5.1. Objetivo General	36
5.2. Objetivos Particulares	36
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1. Material	37
6.1.1. Material biológico	37
6.1.2. Reactivos	37
6.2. Método	38
6.2.1. Estrategia experimental	38
6.2.2. Inoculación de plántulas	39
6.2.3. Tinción de raíces y microscopía	39
6.2.4. Medición de especies reactivas de oxígeno	40
6.2.4.1. Anión superóxido	40
6.2.4.2. Peróxido de hidrógeno	40
6.2.4.3. Radical hidroxilo como peroxidación de lípidos	41
6.2.5. Bioensayos en medio sólido	42
6.2.6. Enzimas antioxidantes	42
6.2.6.1. Catalasa extracelular de <i>P. cinnamomi</i>	42
6.2.6.1.1. Extracción	42
6.2.6.1.2. Actividad por espectrofotometría	43
6.2.6.2. Peroxidasas totales	44
6.2.6.2.1. Extracción	44
6.2.6.2.2. Actividad por espectrofotometría	44
6.2.7. Cuantificación de lignina por su derivatización con ácido tioglicólico	45
6.2.8. Cuantificación de epicatequina	46
VII. RESULTADOS	47

7.1. Establecimiento del sistema de infección	47
7.1.1. Análisis del tejido de raíz infectado con <i>P. cinnamomi</i>	48
7.1.2. Análisis microscópico del tejido de raíz infectado con <i>P. cinnamomi</i>	48
7.2. Especies reactivas de oxígeno	49
7.3. Catalasa extracelular	56
7.4. Peroxidasas totales	57
7.5. Lignina	58
7.6. Epicatequina	59
VIII. DISCUSIÓN	60
IX. CONCLUSIÓN	70
X. LITERATURA CITADA	71
XI. APÉNDICES	91
APÉNDICE I. Preparación de medios de cultivo utilizados	91
1.1. Agar dextrosa papa (PDA)	91
1.2. Agar dextrosa papa con jugo de verduras V8 (PDAV8)	91
1.3. Dextrosa papa líquido	91
APÉNDICE II. Tinción de <i>P. cinnamomi</i>	92
APÉNDICE III. Medición de especies reactivas de oxígeno	92
3.1. Anión superóxido	92
3.2. Peróxido de hidrógeno	92
3.3. Radical hidroxilo como peroxidación de lípidos	93
APÉNDICE IV. Medición de la actividad de enzimas antioxidantes	93
4.1. Catalasa extracelular de <i>P. cinnamomi</i>	93
4.1.1. Extracción	93
4.1.2. Actividad por espectrofotometría	94
4.2. Peroxidasas totales	94
4.2.1. Extracción	94
4.2.2. Actividad de espectrofotometría	95
APÉNDICE V. Extracción y cuantificación de lignina	95
APÉNDICE VI. Extracción y cuantificación de epicatequina	96

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
Figura 1. Mapa de la región productora de aguacate del estado de Michoacán	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Phytophthora cinnamomi</i>	12
Figura 3. Mecanismos de defensa en plantas	16
Figura 4. Senalización del H ₂ O ₂ en plantas	20
Figura 5. Fases de un proceso de infección que son relevantes para cada tipo de hongo fitopatógeno que se conoce con base en su estrategia de adquisición de nutrientes	23
Figura 6. Estructura química básica de la molécula flavonoide, o núcleo flavan y de las moléculas de catequina y epicatequina	29
Figura 7. Estrategia general utilizada durante este trabajo	38
Figura 8. Plántulas de aguacate criollo inoculadas con <i>P. cinnamomi</i>	47
Figura 9. Raíces de aguacate infectadas con <i>P. cinnamomi</i>	48
Figura 10. Tejido de raíz de aguacate infectada con <i>P. cinnamomi</i>	49
Figura 11. Producción de ERO en plántulas de aguacate criollo infectadas con <i>P. cinnamomi</i>	50
Figura 12. Producción de peróxido de hidrógeno en raíces de aguacate criollo infectadas con <i>P. cinnamomi</i>	51
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>P. cinnamomi</i> hasta los 7 días en presencia de peróxido de hidrógeno	52
Figura 14. Producción de peróxido de hidrógeno en raíces de aguacate criollo tratadas con <i>C. lindemuthianum</i> o <i>P. cinnamomi</i> durante 4 días . . .	53
Figura 15. Plántulas inoculadas con un patógeno y un no patógeno de aguacate criollo	54
Figura 16. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>C. lindemuthianum</i> y <i>P. cinnamomi</i>	55
Figura 17. Actividad enzimática de catalasa extracelular de <i>P. cinnamomi</i> y <i>C. lindemuthianum</i>	56

Figura 18. Actividad de peroxidasa en raíz de aguacate infectada con <i>P. cinnamomi</i>	57
Figura 19. Cantidad de lignina en raíz de aguacate infectada con <i>P. cinnamomi</i> a diferentes tiempos	58
Figura 20. Concentración de epicatequina en raíz de aguacate infectada por <i>P. cinnamomi</i>	59
Tabla 1. Características de la raza Mexicana de aguacate en su uso como portainjerto	5
Tabla 2. Ejemplos de los sistemas antioxidantes en plantas	25

RESUMEN

La pudrición de la raíz o muerte descendente causada por *Phytophthora cinnamomi* es la enfermedad más devastadora de los árboles de aguacate a nivel mundial. El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta oxidativa en raíces de aguacate criollo infectadas por *P. cinnamomi*, lo cual incluyó el análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO): anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo como peroxidación de lípidos; de la actividad de catalasa extracelular de *P. cinammomi in vitro*; y de la actividad de peroxidasas totales; así como la determinación de la concentración de lignina y de epicatequina. Se encontró que las ERO se acumulan en respuesta a la infección por *P. cinnamomi*, y que este patógeno es capaz de secretar catalasa *in vitro*, lo cual le podría permitir contrarrestar el peróxido de hidrógeno producido por la planta. Así mismo, se encontró que la actividad de peroxidasas totales se incrementa de una manera dependiente del tiempo de inoculación y que dicho incremento no se debe a la participación de estas enzimas en el proceso de lignificación ya que la cantidad de lignina no cambia como resultado de la infección. Finalmente, la concentración de epicatequina disminuye en respuesta a la infección, lo cual correlaciona con el incremento en la cantidad de peróxido de hidrógeno y favorece la permanencia de dicha especie en niveles elevados. Esto podría facilitar el proceso de infección por *P. cinnamomi*, al disparar la muerte celular hipersensible. Se concluye que la respuesta oxidativa es evadida por *P. cinnamomi* durante la infección del aguacate criollo.

PALABRAS CLAVE:

Aguacate criollo, *Phytophthora cinnamomi*, especies reactivas de oxígeno.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas responden activamente a la infección por patógenos a través de cambios específicos en su metabolismo y en su patrón de expresión genética. Una de las primeras respuestas bioquímicas durante la transducción de la señal externa detectables en la planta es la formación de especies reactivas de oxígeno, tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Ryan y Farmer, 1991; Levine y col., 1994). Este evento forma parte de un conjunto de mecanismos de defensa inducibles conocidos colectivamente como respuesta hipersensible.

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es uno de los cultivos de mayor importancia económica tanto a nivel nacional como estatal. Al igual que otras especies vegetales, el aguacate se encuentra expuesto al ataque de los patógenos presentes en su medio ambiente, que son potenciales generadores de una enfermedad en el cultivo. Las enfermedades son uno de los factores de baja en la productividad de las plantas, que incrementan los costos de producción y limitan la exportación al demeritar la calidad de la fruta. La muerte descendente del aguacate es una de las enfermedades más devastadoras que se presentan en las plantaciones de aguacate a nivel mundial. Los métodos tradicionales de control químico de la enfermedad han provocado el desarrollo y distribución de cepas más resistentes a los fungicidas, además de la contaminación de los suelos. De ahí la importancia de conocer los mecanismos de defensa de la planta de aguacate ante el ataque por *P. cinnamomi*, ya que, eventualmente estos conocimientos se pueden emplear en el diseño de estrategias para mejorar sus características de resistencia al patógeno.

II. ANTECEDENTES

2.1. EL AGUACATE (LA PLANTA)

El aguacate Hass (*Persea americana* Mill. cv. Hass) es, sin lugar a dudas, uno de los cultivos tropicales o subtropicales de mayor importancia económica en el agro Nacional y Estatal. México y el estado de Michoacán, ocupan el primer lugar en superficie y producción de aguacate a nivel mundial, con 124,000 Ha. y 1,127,000 Ton. anuales. Michoacán, con 92,349 Ha. y 1,012,000 Ton. anuales, contribuye con alrededor del 90% de la producción total del país, y aporta poco más del 30% de la producción mundial de este frutal (FAO, 2006; SUMA, 2006; SAGARPA, 2007). Aunado al aspecto económico, se encuentra el aspecto social, ya que su cultivo representa una fuente de generación de empleos a la población, generando 47 mil directos, 70 mil estacionales (equivalentes a 10.5 millones de jornales anuales) y 187 mil empleos indirectos permanentes en toda la cadena, hasta la comercialización (COMA, 2005).

Los principales estados productores de aguacate del país según el censo de COMA (Comisión Michoacana del Aguacate) son: Michoacán, Nayarit, Morelos, Puebla y Estado de México (SUMA, 2006).

La franja productora de aguacate en Michoacán se encuentra ubicada en la región agrícola “Sierra Purhépecha”, que forma parte de la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico, que cruza la entidad por el centro de oriente a poniente, desde Zitácuaro hasta Cotija. También se encuentra creciendo en la región agrícola de “Los Reyes Cotija” y al oriente del estado con una participación de menor importancia en la región agrícola de “Mil Cumbres Valle de Maravatío” (SUMA, 2006) (Figura 1). Esta franja ocupa 7,752 kilómetros cuadrados y representa el 12.9% de la superficie estatal. El clima relevante es templado húmedo y subhúmedo, con temperatura media de 8 a 21 °C y una precipitación anual de 1,200 a 1,600 mm. También tiene una zona de transición (subtropical) entre trópico-seco y zona templada (Salazar y

col., 2004). Los municipios mas destacados por superficie y producción son: Uruapan, Tancítaro, Peribán, Ario de Rosales, Tacámbaro, Tingambato, Zitácuaro, Ziracuaretiro, Nuevo Parangaricutiro, Villa Escalante, Tingüindín, Los Reyes y Chilchota (INIFAP, 2006).

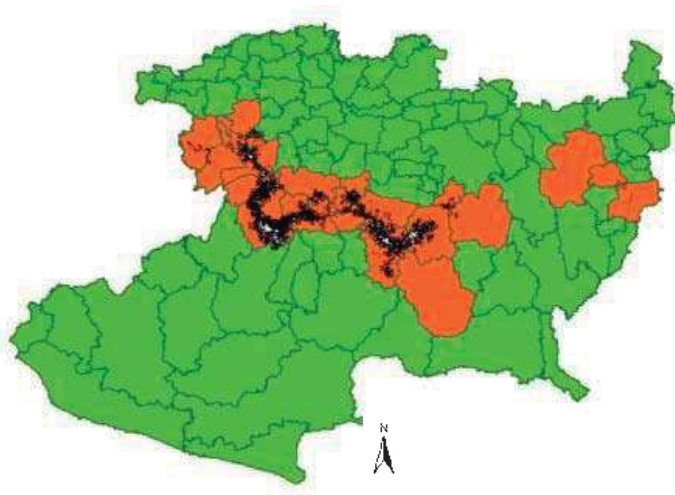


Figura 1. Mapa de la región productora de aguacate del estado de Michoacán (SUMA, 2006).

El aguacate puede cultivarse desde el nivel del mar hasta los 2,500 m; sin embargo, su cultivo se recomienda en altitudes entre 800 y 2,500 metros sobre el nivel del mar (msnm), para evitar problemas con enfermedades, principalmente de las raíces. La temperatura y la precipitación son los dos factores de mayor incidencia en el desarrollo del cultivo. El aguacate se desarrolla favorablemente en áreas con lluvia anual de 1,000 a 1,800 mm, humedad relativa del 85 al 80%, fotoperiodo anual de 980 a 1,200 horas luz y un régimen térmico anual de 1,750 a 3,250 unidades calor acumuladas entre 10 y 30°C. Estas condiciones son prevalecientes en los grupos climáticos de Köppen modificados por García: templado húmedo y subhúmedo del grupo de climas templados C, y semicálidos húmedos y subhúmedos del grupo de climas semicálidos (A)C. En cuanto a suelos, el óptimo es el Andosol de la clasificación de la FAO, conocido localmente como “tupere”, aunque también se puede desarrollar en cualquier otro con textura media (INIFAP, 2006).

En general, las huertas comerciales de aguacate en México se establecen con plantas injertadas. La propagación por injerto, preferentemente por enchapado lateral, es el método utilizado para reproducir las variedades o cultivares seleccionados para cultivo comercial, ya que los árboles injertados son uniformes en cuanto a la calidad, forma y tamaño de la fruta. El proceso de injertado requiere de una planta patrón o portainjerto, que en nuestro país, es el aguacate criollo de raza Mexicana (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) debido a su gran adaptabilidad ecológica en el país, al cual se le injerta la púa o vareta de interés comercial como lo es el cultivar Hass (Gallegos, 1983; Sánchez-Pérez y col., 2001). De este modo, los árboles comerciales de aguacate se componen de dos materiales vegetales, el de la parte aérea que proviene del injerto y el del sistema radical que es del aguacate criollo (portainjerto).

Los mayores atributos buscados en un portainjerto de aguacate son: resistencia a *P. cinnamomi*, tolerancia a salinidad, adaptabilidad a suelos calcáreos, árboles pequeños y una alta cosecha sostenible en el tiempo (Newett y col., 2002). Como portainjerto, la raza Mexicana se caracteriza por tener una buena adaptación a suelos pesados con poca aireación y por ser resistente a las bajas temperaturas. Sin embargo, es muy sensible a la salinidad y a la clorosis férrica; y es susceptible a *P. cinnamomi* (Schaffer y Whiley, 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de la raza Mexicana de aguacate en su uso como portainjerto (Ben-Ya'acov, 2002).

ADAPTACIÓN A:	RAZA MEXICANA
Suelos pesados con poca aireación	Buena
Bajas temperaturas	Resistente
Carbonatos	Medianamente resistente
Salinidad	Muy sensible
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Susceptible
Productividad	No depende de la raza. Portainjertos productivos pueden ser seleccionados en cada raza.

Por su parte, el cultivar Hass se caracteriza por una productividad sostenida, alternancia poco marcada, cualidades para tolerar el transporte y la conservación, así como la excelente calidad de su pulpa. Además, el hábito de crecimiento del árbol, considerado compacto, permite incrementar las densidades de población y facilita las labores de cultivo. Bajo las condiciones climáticas de la región productora de aguacate en el estado, difícilmente se puede encontrar una variedad o cultivar de interés comercial que supere al cultivar Hass (INIFAP, 2006).

2.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Persea americana*

El aguacatero fue clasificado por Gaertner como *Persea gratissima* y como *Persea americana* por Miller (Suppo, 1992). Es una dicotiledónea perteneciente al orden de las Ranales y a la familia de las Lauráceas, a la que también pertenecen otras especies como *Laurus nobilis* (el laurel), *Cinnamomum burmannii* (el canelo) o *Cinnamomum camphora* (el alcanforero).

Es un especie arbórea perenne que en su hábitat natural puede alcanzar de 8 a 15 m de altura. Sus hojas son simples y enteras, de forma elíptica-alargada y nervadura pinnada; su inserción en el tallo es peciolada; cuando jóvenes son pubescentes y rojizas, volviéndose lisas, coriáceas y de color verde intenso y oscuro al madurar. Las ramas son abundantes, generalmente delgadas y frágiles, por lo que se rompen al cargar muchos frutos o por la acción del viento. Las raíces son superficiales, alcanzando de 1 a 1.5 m de profundidad. Poseen muy pocos pelos radiculares, y la absorción de agua y nutrientes se realiza principalmente en la punta de las raíces a través de los tejidos primarios; esto determina la susceptibilidad del árbol al exceso de humedad que induce a las asfixias y ataques de hongos que pudren los tejidos (Calderón, 2006).

Las flores son hermafroditas, simétricas, agrupadas en panículas (racimos de racimos) axilares o terminales. Cada flor consta de un perigonio con dos verticilos trímeros y 12 estambres insertos debajo o alrededor del ovario. De estos estambres

solo 9 son funcionales. El gineceo posee un solo pistilo, un ovario súpero (por enzima del pedúnculo), es unilocular y con un solo óvulo. El fruto es una baya que posee un pericarpio, un mesocarpio carnoso y un hueso. Sus características varían según el tipo ecológico (Suppo, 1992).

Actualmente, se reconocen tres grupos ecológicos o razas de aguacate: Mexicana, Guatemalteca y Antillana (Yahia y Baez, 1992; Knight, 2002). En particular, la variedad criolla (var. *drymifolia*) de aguacate pertenece a la raza Mexicana, y se caracteriza por que sus hojas poseen un olor característico a anís. Los árboles son altos, de corteza delgada, con numerosas ramas delgadas y con gran cantidad de lenticelas. Las hojas son de color verde oscuro, lustrosas y pequeñas (de 8 a 10 cm de largo); los brotes son vellosos y de color verde pálido o plateado; las flores son de color verde claro. Los frutos son pequeños, con un peso generalmente menor de 250 g. Su pericarpio es delgado y liso, de color verde o casi negro. La pulpa es blanca-verdosa. El hueso contiene cotiledones lisos y apretados (Suppo, 1992).

2.1.2. ENFERMEDADES DEL AGUACATE

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

Las enfermedades de mayor importancia económica que se presentan en las plantaciones de aguacate en Michoacán son: a) la antracnosis del fruto, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.; b) la roña, causada por *Sphaceloma perseae* Jenkins; c) el anillamiento del pedúnculo, causado por el complejo bacteriano-fúngico de los géneros *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Clavibacter* (*Corynebacterium*) sp., *Alternaria* sp., *Diplodia* sp., *Dothiorella* sp. y *Pestalotia* sp.; 4) la muerte

descendente o pudrición de la raíz, causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands.; 5) el cáncer de tronco y ramas, causado por *Fusarium epishaeria* Snyder y Hansen, *Phytophthora boehmeriae* Sawada y *Nectria galligena* Cayley; y 6) las enfermedades de poscosecha, causadas por *Diplodia natalensis* Pole evans., *Rhizopus nigricans* Ehr., *Alternaria* sp., *Verticillium* sp., *Fusarium roseum*, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. y *Sphaceloma persea* Jenkins (Sánchez-Pérez y col., 2001).

2.1.2.1. Pudrición de la raíz o muerte descendente del aguacate

La pudrición de la raíz es la enfermedad más devastadora de los árboles de aguacate a nivel mundial. Su agente causal es el oomiceto *P. cinnamomi* Rands. La denominación pudrición de la raíz se debe a los daños que ocasiona al sistema radical, y la de muerte descendente se debe a la sintomatología que presenta la planta en su parte aérea.

Esta enfermedad se reportó por primera vez en 1927, en Puerto Rico (Zentmyer y Mitchell, 1986). Actualmente, se ha reportado que ataca al aguacate en aproximadamente 70 países de las regiones tropicales y subtropicales (Pegg y col., 2002), por lo que, se encuentra ampliamente distribuida en las zonas productoras de aguacate del mundo, como Sudáfrica, Israel, Nueva Zelanda, Estados Unidos (California), Australia, Centro América, el Caribe, y por supuesto, México, siendo un factor limitante en la producción, además del alto costo que implica su prevención y control (Téliz y col., 1992).

En nuestro país, el cultivo de aguacate ha sido severamente dañado en los estados de Puebla, Querétaro y Michoacán (Cova, 1993). En particular, en Michoacán en 1994 esta enfermedad ocasionó daños severos a por lo menos 100,000 árboles de aguacate, causando pérdidas económicas para los productores de 32'700'000 pesos (Vidales y Alcántar, 1994). Actualmente, se encuentra en áreas muy localizadas de los municipios de Uruapan, San Juan Nuevo, Tingüindín, Los Reyes y Ziracuaretiro (INIFAP, 2006).

La enfermedad puede presentarse en cualquier estado de desarrollo de la planta, lo cual implica árboles de cualquier edad. Se caracteriza en un inicio por un amarillamiento de las hojas ya presentes en el árbol; las hojas nuevas brotan más pequeñas que las normales, presentan una forma acucharada, de color verde pálido en lugar de verde oscuro y con puntas necróticas. Al evolucionar la enfermedad, éstas tienden a caer, dejando a las ramas casi desnudas. Frecuentemente ya no se producen brotes nuevos, y las ramas van muriendo desde la parte superior de la copa y de los extremos de las ramas hacia abajo, fenómeno conocido como “muerte descendente o regresiva” (Jorge y Medina, 2000). Los frutos no alcanzan su tamaño normal y es común observar que se produzcan en mayor número (fructificación excesiva), debido a que el daño en la raíz impide la circulación completa de los nutrientes, los cuales se acumulan en la parte aérea, estimulando la formación excesiva de frutos. El síntoma mas característico que se presenta en el sistema radical es la pudrición de las raíces absorbentes (alimentadoras, delgadas, de 1 a 3 mm de diámetro), las cuales se tornan oscuras y quebradizas; las raíces principales (gruesas) solo ocasionalmente son colonizadas, requiriéndose de una herida para que ello ocurra, por lo que, mantienen su capacidad de producir nuevas raicillas, las cuales prolongan la vida del árbol durante algún tiempo, aunque finalmente la enfermedad conlleva a la muerte del mismo (Cova, 1993). Raras veces causa chancros o cáncer en la base del tronco (Jorge y Medina, 2000).

La pudrición de la raíz afecta la absorción de agua y nutrientes, provocando deficiencias de algunos elementos. Cuando el árbol pierde mas agua por transpiración que la absorbida por el sistema radical destruido por el patógeno, empieza a mostrar el síntoma de marchitamiento en la parte aérea. La falta de agua también reduce la capacidad de las hojas para formar clorofila y esto es causa de la clorosis o amarillamiento de las hojas (Téliz, 2000).

Esta enfermedad se presenta en focos, con una mayor incidencia en regiones donde prevalecen las condiciones favorables para la reproducción y diseminación del oomiceto, como son: suelos con altas temperaturas (entre 25°C y 30°C), con

humedad excesiva, compactos, con drenaje deficiente y con un pH ligeramente ácido (de 6.5) (Zentmyer, 1985; Jorge y Medina, 2000).

2.2. Phytophthora cinnamomi (EL PATÓGENO)

2.2.1. DESCRIPCIÓN DE *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Esta especie fue aislada por primera vez por Rands en 1922 de chancros de árboles de canela (*Cinnamomum burmannii* Blume) en Sumatra. Se cree que se pudo haber originado cerca de Papua Nueva Guinea pero actualmente tiene una distribución cosmopolita. Cuenta con un rango de hospederos de alrededor de 3,000 especies de plantas entre las que se encuentran 2,500 especies nativas de Australia, además de cultivos como aguacate, piña, durazno, macadamia y papaya (Hardham, 2005). De acuerdo con Hardham (2005), *P. cinnamomi* pertenece al Reino Chromista, Phylum Oomycota, Orden Peronosporales, Familia Peronosporaceae y Género *Phytophthora* sp.

Presenta un micelio compuesto por hifas cenocíticas (aseptadas), ramificadas. La principal característica que la diferencia de otras especies del género *Phytophthora* es que las hifas presentan abundantes hinchazones subesféricas, aisladas o en racimos, generalmente terminales, que les da un aspecto botrioso a coraloide. En colonia, el micelio presenta un aspecto de camelia, debido a su crecimiento deprimido y algodonoso, que da lugar a intervalos regulares (Erwin y Ribeiro, 1996).

Es diploide en su estado vegetativo. Posee esporangióforos simples o ramificados en simpodio, a veces por proliferación esporangial, cortos o largos; los esporangios son ovoides u oval-alargados, no papilados, persistentes (no caducos), con un ápice compacto, no sobresaliente y nacen en el extremo terminal (Erwin y Ribeiro, 1996). En ellos ocurre el proceso de zoosporogénesis, que da lugar a la formación de zoosporas móviles biflageladas con una marcada habilidad para

sintetizar una pared celular enquistada en pocos minutos. Las zoosporas son heterocontas, es decir, los dos flagelos que poseen son morfológicamente diferentes. El flagelo anterior es mas corto que el posterior y posee dos hileras paralelas de mastigonemas a todo lo largo (Hardham, 2005).

Posee numerosas clamidosporas esféricas, de paredes delgadas y de 41 μm de diámetro en promedio. Estas pueden ser terminales o intercalares, y se encuentran frecuentemente en racimos de 3 a 10 (Erwin y Ribeiro, 1996).

Es una especie heterotática, con tipos de apareamiento A1 y A2 que pueden interactuar de manera sexual para formar oosporas, sin embargo, parece ser que la diversidad genética surge de manera asexual más que como resultado de la recombinación sexual. El tipo A2 es más ampliamente distribuido a nivel mundial que el tipo A1 (Zentmyer, 1980). Los oogonios son esféricos, terminales, de pared lisa y hialina, y de color amarillo pálido al envejecer. Los anteridios son subclaviformes y anfígenos. Las oosporas casi llenan al oogonio, son redondas, hialinas a amarillo-cafesosas, y con un diámetro de 20 a 40 μm (Cova, 1993; Erwin y Ribeiro, 1996). Las oosporas se pueden formar *in vitro* sin fertilización en cultivos del tipo A2 incubados en granos de avena (Royle y Hickman, 1964), en extractos de raíces (Zaki y col., 1983), o en tejidos de raíces de aguacate enfermos (Zentmyer y Mircetich, 1966), aunque no se encuentran en estos tejidos cuando son naturalmente infectados.

2.2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *P. cinnamomi* incluye dos tipos de reproducción, una sexual y una asexual (Figura 2). En la sexual se producen oosporas como resultado de la unión de los gametos masculino y femenino, anteridio y oogonio, respectivamente. En la fase asexual se producen clamidosporas. Ambas son estructuras de supervivencia que dependiendo de las condiciones presentes en su ambiente, pueden persistir en el suelo o en material vegetal infectado durante algún tiempo, para posteriormente dar lugar a esporangios multinucleados, los cuales al madurar

liberan de 20 a 30 zoosporas biflageladas cada uno. Las zoosporas viajan hacia sitios de infección favorables y una vez ahí, se enquistan para después germinar y penetrar en las células de la raíz, en donde se desarrolla en micelio, cerrando así el ciclo. La fase asexual puede repetirse en varias ocasiones sucesivas, amplificando rápidamente el potencial de inóculo en el área infectada. Cualquier estadio de vida de este microorganismo es potencialmente infectivo para una planta (Hardham, 2005; Anónimo, 2006).

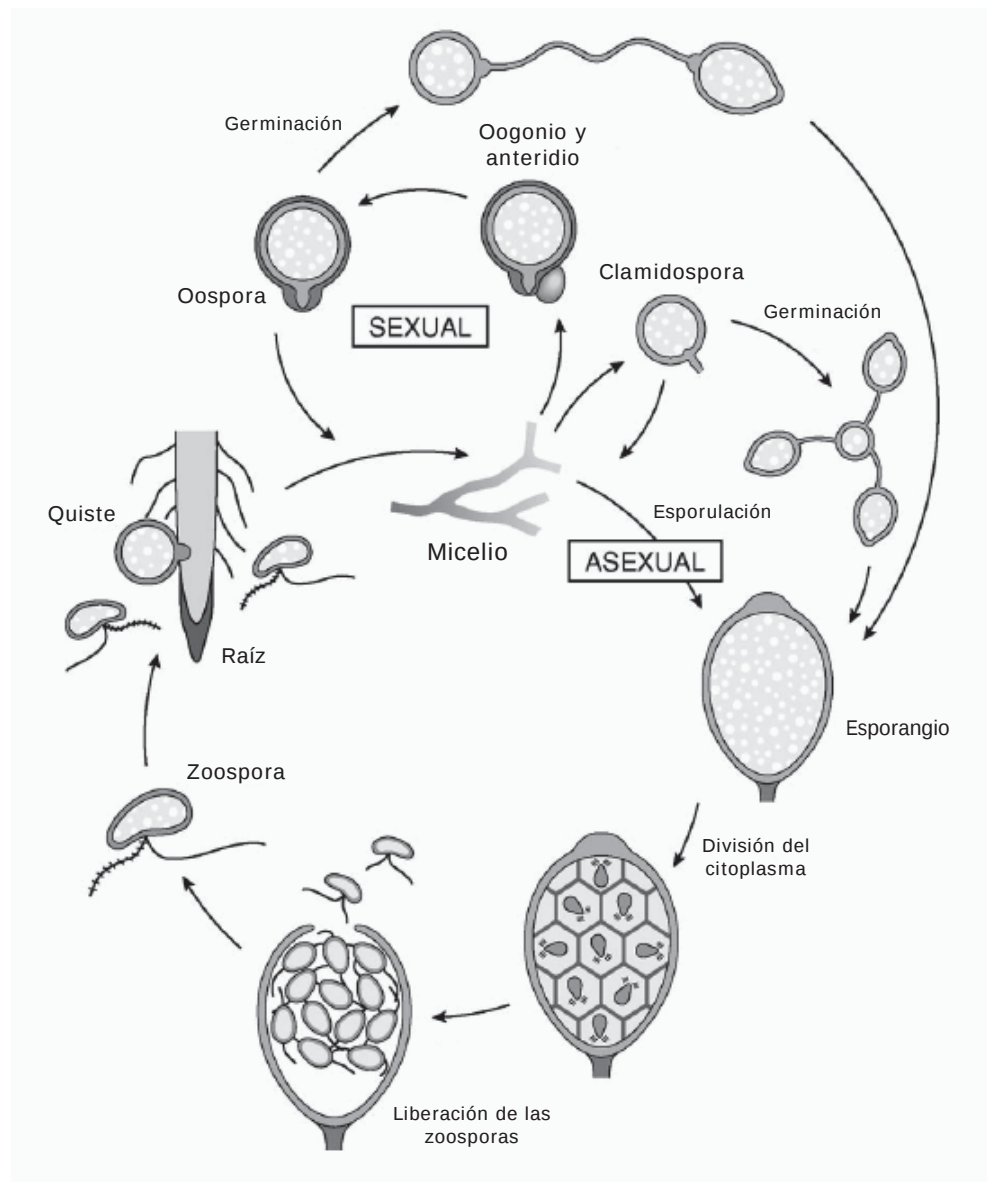


Figura 2. Ciclo de vida de *Phytophthora cinnamomi*. Tomado de Anónimo, 2006.

2.2.3. Ciclo de la enfermedad

El paso inicial en cualquier interacción planta-patógeno es el reconocimiento. En este caso, el reconocimiento del potencial hospedero por parte de *P. cinnamomi* consiste en reconocer las características químicas, eléctricas y físicas de las raíces de la planta. En esto juegan un papel clave las zoosporas, en particular, los mecanismos que éstas siguen para localizar un nuevo hospedero para colonizar en tiempos de mucha lluvia y suelos anegados. Las zoosporas se propagan a través del agua del suelo. Pueden cubrir distancias de varios centímetros, a una velocidad de aproximadamente 200 $\mu\text{m/s}$ (Hardham, 2005). Son atraídas a las raíces de su potencial hospedero por gradientes químicos y eléctricos, es decir, que exhiben quimiotaxis y electrotaxis positivas (Gow y col., 1992; Morris y Ward, 1992; Morris y col., 1992; Morris y Gow, 1993; Cahill y Hardham, 1994; Morris y col., 1998).

Se sabe que las plantas secretan exudados que sirven como quimioatrayentes para las zoosporas. Sin embargo, a la fecha se han descrito solo unos cuantos ejemplos de quimioatrayentes específicos. En *Phytophthora sojae* las zoosporas son atraídas específicamente por las isoflavonas daidzeina y genisteina, exudadas por las raíces de plantas de fíjol soya (Morris y Ward, 1992; Morris y col., 1998). En cambio, las zoosporas de *P. parasitica* aparentemente no tienen preferencias por las raíces de especies específicas sino por las zonas de elongación y diferenciación de las mismas (Attard y col., 2008). En 1961, Zentmyer demostró que los quistes de *P. cinnamomi* adjacentes a la raíz de su hospedero germinaban rápidamente y crecían en la dirección de la raíz, pero la señal química no fue identificada.

Por otra parte, las raíces de las plantas generan de manera natural corrientes eléctricas y campos eléctricos asociados debido al flujo de iones dentro y fuera de la región apical, por lo que, la atracción de las zoosporas a las raíces de las plantas está mediada en parte por electrotaxis. Este es un mecanismo que determina el sitio

de acumulación de las zoosporas en la superficie de la raíz, lo cual resulta en la colonización selectiva de raíces vivas y no muertas, maximizando la sobrevivencia de las zoosporas. De este modo, las señales eléctricas pueden aumentar o anular las señales químicas mediando las respuestas de las zoosporas en la superficie de las raíces (Morris y col., 1992; Morris y Gow, 1993; van West y col., 2002).

Una vez que las zoosporas de *P. cinnamomi* se encuentran en la superficie de la raíz, tardan de 5 a 10 min en enquistarse, y de 20 a 30 min después germinan, emergiendo tubos germinativos que química y físicamente penetran la superficie de la raíz. Una vez dentro, los tubos germinativos se desarrollan en micelio y crecen a lo largo de las paredes anticlinales (perpendiculares a la superficie) de las células epidérmicas aunque también son capaces de crecer directamente a través de las paredes periclinales (paralelas a la superficie) de dichas células (Hardham, 2001). En especial, durante la penetración de las paredes periclinales, los tubos germinativos forman hinchamientos de tipo apresorio. La penetración primaria normalmente ocurre por el ápice de las raíces absorbentes. Las raíces de plantas susceptibles son colonizadas rápidamente. El micelio avanza inicialmente de manera intercelular y posteriormente de manera intracelular a través del cambium, induciendo hidrólisis de las paredes celulares y colapso de protoplastos (Coffey, 1992). Los esporangios pueden aparecer en la superficie de la planta después de 2 o 3 días en un hospedero susceptible (Hardham, 2005). La penetración del hospedero involucra la producción y secreción de enzimas que degradan las paredes celulares vegetales. *P. cinnamomi* secreta poligalacturonasas que degradan la pectina de las paredes (Götesson y col., 2002). Otro grupo de proteínas secretadas son las elicinas, que sirven como estimuladores de las respuestas de defensa del hospedero. Las elicinas son proteínas acarreadoras de esteroides (Mikes y col., 1998; Boissy y col., 1999) secretadas por oomicetos del género *Phytophthora* (Ricci y col., 1989). Se ha reportado que inducen la necrosis en hojas de tabaco (Rustérucci y col., 1996), así como la producción de ERO en células en suspensión de tabaco (Bourque y col., 1998). *P. cinnamomi* produce dos elicinas denominadas α - y β -cinnamomina (Pernollet y col., 1993; Perez y col., 1999).

P. cinnamomi puede vivir como saprofita en el suelo, persistiendo en él o en material vegetal infectado, por periodos que varían dependiendo del propágulo en cuestión: micelio inactivo, esporangios, clamidosporas u oosporas (Weste, 1994; Hardham, 2005). El micelio tiene un periodo de supervivencia que varía de 1 a 60 días; es el propágulo más vulnerable a la destrucción por bacterias. Los esporangios tienen un periodo de supervivencia menor, que varía de 3 a 42 días. En las clamidosporas, la pared gruesa y tolerancia a humedad mínima les permite tener un periodo de supervivencia mayor, que varía de 84 a 365 días; mientras que las oosporas pueden permanecer viables por más de un año. En suelos con elevada humedad, poca materia orgánica y baja densidad microbiana, *P. cinnamomi* puede sobrevivir mas de seis años en ausencia del hospedero (Weste, 1994). También requiere de un pH de 6.5 para su buen desarrollo en el suelo (Zentmyer y col., 1994).

2.3. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

2.3.1. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS

Durante el curso de la evolución, las plantas han desarrollado todo un arsenal de mecanismos de defensa efectivos contra el ataque de los microorganismos presentes en el medio ambiente, a los que están constantemente expuestas. Dichos mecanismos les confieren resistencia a las enfermedades, y pueden ser constitutivos o inducibles. Los primeros, también denominados pasivos o preexistentes, forman parte de las características de desarrollo de la planta, es decir, son barreras anatómicas o químicas que impiden el establecimiento de un patógeno en el hospedero, tales como la cutícula, la pared celular o reservorios de compuestos antimicrobianos (fitoanticipinas) localizados estratégicamente; mientras que los segundos, también denominados activos, requieren del metabolismo del hospedero, y son activados después del contacto con un microorganismo invasor, es decir, cuando el hospedero queda expuesto a un patógeno (Figura 3).

Para que los mecanismos de defensa inducibles se activen de manera eficiente, es necesario que las células expuestas a un patógeno cuenten con un sistema de vigilancia capaz de reconocer una amenaza externa, una ruta de transducción de la señal y una respuesta, usualmente regulada a nivel de transcripción genética por medio de la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta (Lamb y col., 1989).

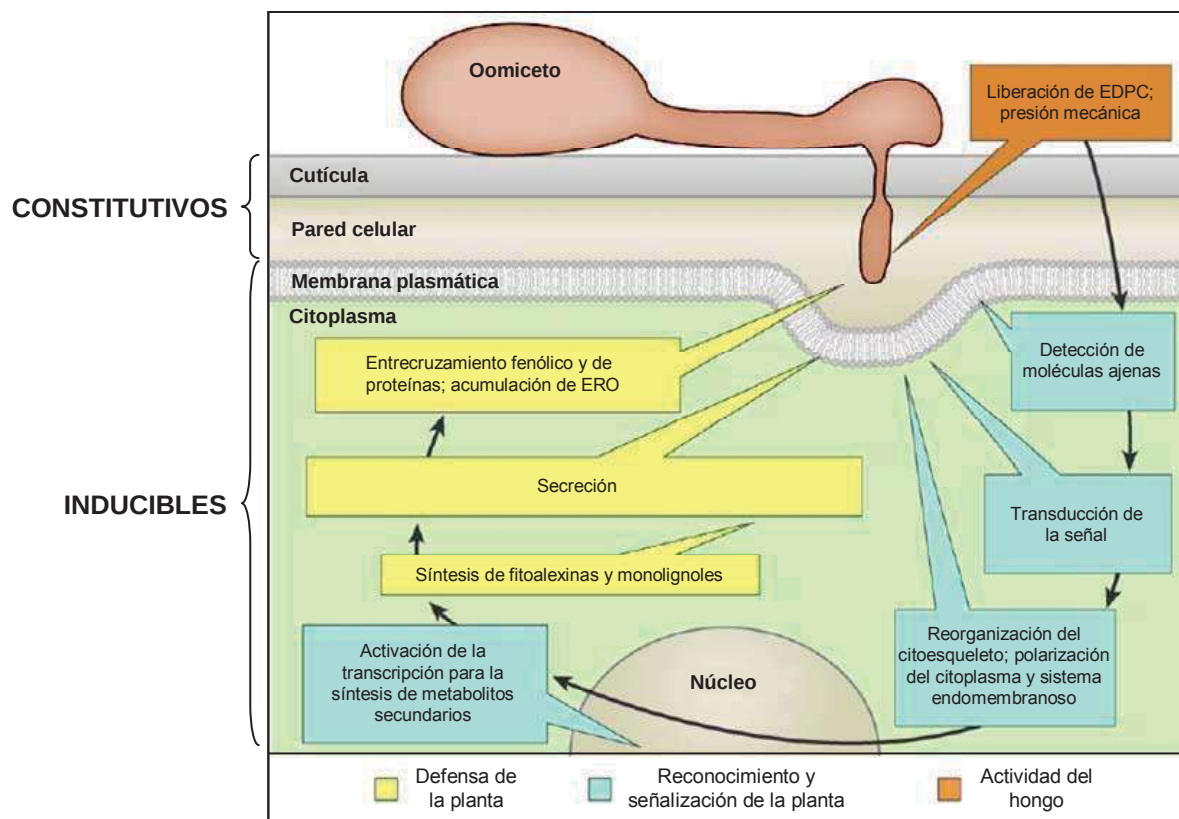


Figura 3. Mecanismos de defensa en plantas. La figura debe observarse en el sentido de las manecillas del reloj. EDPs, enzimas degradadoras de la pared celular; ERO, especies reactivas de oxígeno (Modificado de Hüchelhoven, 2007).

Los mecanismos de defensa inducibles incluyen la generación rápida de especies reactivas de oxígeno (Levine y col., 1994), cambios en los polímeros estructurales de la pared celular, deposición en la pared celular de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, síntesis de fitoalexinas (Dixon, 1986) y de proteínas

relacionadas con la patogénesis (proteínas PR). Colectivamente, estos sistemas primero inhiben y después bloquean la entrada para el potencial colonizador.

Las primeras reacciones durante la transducción de la señal externa detectables en la planta son la apertura de canales iónicos específicos y la formación de especies reactivas de oxígeno, tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Ryan y Farmer, 1991). Estas reacciones iniciales transitorias son prerequisites para eventos de transducción de la señal que posiblemente lleven a la construcción de una red compleja de señalamiento que dispara las respuestas de defensa (Hammond-Kosak y Jones, 1996). Esta red puede comprender numerosos cambios en la actividad metabólica, incluyendo cambios en la polaridad de la membrana plasmática y cambios en las concentraciones citosólicas de H^+ y de Ca^{2+} , así como de varias enzimas reguladas alostéricamente, tales como NADPH oxidasas, fosfolipasas, fosfatasas y proteínas cinasas (Yang, 1997).

2.3.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Bajo condiciones normales, las células con metabolismo aerobio obtienen la energía necesaria para su buen funcionamiento, reduciendo la mayor parte del oxígeno molecular (alrededor del 95%) hasta agua, sin formación de intermediarios tóxicos (especies reactivas de oxígeno, ERO) mediante la vía de reducción tetravalente; mientras que un pequeño porcentaje del oxígeno (alrededor del 5%) es metabolizado por las células mediante la vía de reducción monovalente, a través de la cual se forman las ERO, como son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) (Hippeli y col., 1999; Halliwell y Gutteridge, 1999). El anión superóxido y el radical hidroxilo son literalmente radicales libres, mientras que el peróxido de hidrógeno no puede ser considerado como tal, debido a que químicamente, un radical libre se caracteriza por tener un electrón desapareado, y el peróxido de hidrógeno posee el número de electrones apareados. Su peculiaridad consiste en que, sin ser realmente un radical libre se "comporta" como una sustancia oxidante (Ramón, 1993).

Aunque la generación de ERO es una característica intrínseca de muchas células, no todas las ERO tienen un origen endógeno. La existencia de factores exógenos potencialmente dañinos para las plantas, ya sean de origen biótico o abiótico, tales como contaminantes del aire (ozono o dióxido de sulfuro), temperaturas extremas, altas intensidades de luz, herbicidas, metales pesados, sequía, luz ultravioleta, heridas, ataque de patógenos, senescencia, entre otros, puede incrementar el nivel de producción de ERO en las células, causando una pérdida del balance entre su producción y la capacidad de las células para evitar su acumulación, dando lugar a la explosión oxidativa (Buchanan y col., 2000; Kuzniak y Urbanek, 2000).

La explosión oxidativa es la acumulación de ERO en respuesta a estímulos externos (Mathieu y col., 2002). Es uno de los eventos característicos de las plantas durante la fase temprana de las interacciones planta-patógeno (Mehdy, 1994; Baker y Orlandi, 1995; Low y Merida, 1996). Esta respuesta se ha observado en numerosas interacciones que involucran a hongos (Doke, 1983; Vera-Estrella y col., 1992), bacterias (Adam y col., 1989; Keppler y col., 1989) o virus (Doke y Ohashi, 1988), en donde se ha relacionado con la aparición de la respuesta hipersensible (Tenhaken y col., 1995). Generalmente, la explosión oxidativa se presenta tanto en interacciones compatibles como incompatibles, como un incremento de ERO rápido, transitorio e inespecífico, que no impide que el patógeno se disemine en el tejido vegetal (van Breusegem y col., 2001). Sin embargo, en interacciones incompatibles, en donde las células vegetales se encuentran en contacto con patógenos que son capaces de disparar la muerte celular hipersensible (Baker y Orlandi, 1995; Low y Merida, 1996), esta explosión oxidativa es un proceso bifásico, por lo que, en ellas se presenta un segundo incremento de ERO fuerte y prolongado (Levine y col., 1994). Las formas predominantes de ERO detectadas en interacciones planta-patógeno son el $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $OH^{\cdot}$. La explosión oxidativa fue reportada por primera vez en 1983 por Doke, quien demostró la generación de anión superóxido en respuesta a la inoculación de tejido de tubérculo de papa (*Solanum tuberosum*) con un cultivo no virulento del oomiceto *Phytophthora infestans* (Grant y Loake, 2000).

Se ha demostrado que las ERO participan en las respuestas de defensa debido a que tienen un efecto antimicrobiano en contra del patógeno (Peng y Kuc, 1992; Wu y col., 1995), están involucradas en el entrecruzamiento de proteínas en las paredes celulares alrededor del sitio de infección (Bradley y col., 1992), están implicadas como inductoras/activadoras de genes de defensa, y tienen un papel en el desarrollo de la muerte celular durante la respuesta hipersensible (RH) (Alvarez y col., 1998; Grant y Loake, 2000; Orozco-Cárdenas y col., 2001).

2.3.2.1. Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

La producción de esta molécula en las plantas se realiza mediante una reacción que involucra a la enzima NADPH oxidasa, localizada en la membrana plasmática de las células, la cual lo produce a partir de la reducción monovalente del oxígeno molecular. Este radical tiene una vida media de 1 μ s y reacciona principalmente con los centros Fe-S de las proteínas, difícilmente con los lípidos, y no reacciona con el DNA o carbohidratos (Møller y col., 2007).

2.3.2.2. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno es una molécula oxidante relativamente estable, capaz de difundirse fácilmente a través de las membranas plasmáticas debido a su carencia de carga (Baker y Orlandi, 1999; van Breusegem y col., 2001). Al no contener electrones desapareados no puede ser considerado como un auténtico radical libre (Ramón, 1993). Tiene una vida media de 1 ms y reacciona principalmente con las cisteínas de las proteínas, difícilmente con los lípidos, y no reacciona con el DNA o carbohidratos (Møller y col., 2007).

Durante muchos años, se ha asumido que el peróxido de hidrógeno se forma de manera secuencial a partir de la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ como origen primario, ya sea de manera espontánea o de manera enzimática, a través de la superóxido

dismutasa (SOD) (Reacción 1). Sin embargo, actualmente se sabe que esta ERO se puede producir de manera independiente a través de distintas fuentes.



Las plantas generan y acumulan peróxido de hidrógeno en respuesta a una amplia variedad de estímulos tanto bióticos como abióticos (Figura 4). Las fuentes enzimáticas potenciales del peróxido de hidrógeno generado en respuesta a estímulos específicos incluyen a la NADPH oxidasas de la membrana plasmática, peroxidasas de la pared celular, amino oxidasas, oxalato oxidasas y oxidasas dependientes de una flavina (Zhang y col., 1995; Allan y Fluhr, 1997; Bolwell y Wojtaszek, 1997; Lamb y Dixon, 1997; Bolwell y col., 2002; Torres y col., 2006).

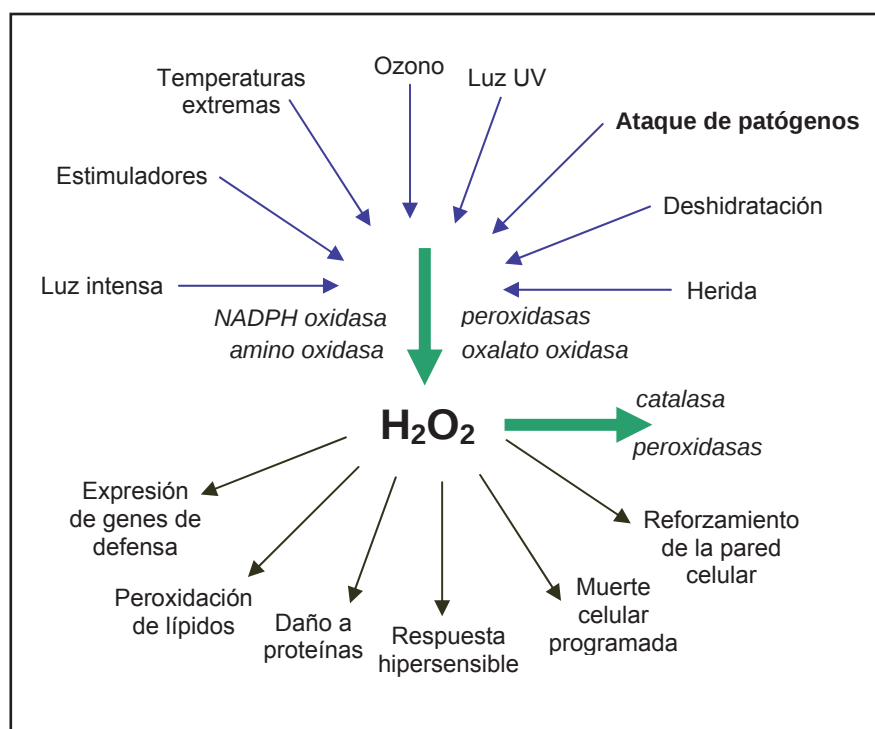
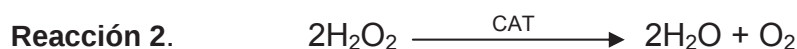


Figura 4. Señalización del H_2O_2 en plantas. Las flechas gruesas representan su potencial síntesis y degradación. Las flechas delgadas representan sus fuentes y efectos celulares potenciales (Modificado de Neill y col., 2002).

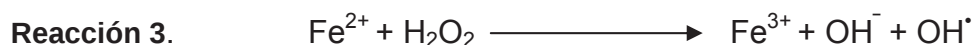
El peróxido de hidrógeno es metabolizado por la catalasa (CAT) (Reacción 2), o por peroxidasas, las cuales lo reducen a agua a costa de la oxidación de un sustrato orgánico (Mathews y van Holde, 2000).



Se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno juega un papel importante como molécula señal, al inducir la muerte celular y la expresión de genes de defensa durante la RH (Levine y col., 1994; Lamb y Dixon, 1997; Grant y Loake, 2000). Se ha sugerido que el peróxido de hidrógeno induce la muerte celular iniciando una vía de transducción de la señal, y no por la muerte directa como resultado de su fitotoxicidad (Levine y col., 1994; Neill y col., 2002). Sin embargo, poco se conoce acerca de los componentes celulares involucrados en la respuesta de las plantas al peróxido de hidrógeno.

2.3.2.3. Radical hidroxilo (OH·)

Es un agente altamente oxidante (tiene una afinidad extremadamente alta por átomos de hidrógeno) que se genera por la adición de un electrón al peróxido de hidrógeno, en la denominada reacción de Fenton, que requiere de la presencia de iones metálicos libres como el Fe^{2+} , Cu^{2+} o Mn^{2+} para llevarse a cabo (Reacción 3) (Baker y Orlandi, 1999; Grant y Loake, 2000; Scandalios, 2005).



Es la ERO más tóxica que se produce. Tiene una vida media de 1 ns, y reacciona rápidamente con cualquier tipo de biomolécula cercana (Møller y col., 2007). Los lípidos, de gran importancia biológica por ser los constituyentes principales de las membranas celulares, son particularmente susceptibles a la oxidación por parte del radical hidroxilo, que inicia una reacción en cadena de

peroxidación lipídica, lo cual genera la pérdida de la integridad de las membranas, que conlleva a la muerte celular (Esterbauer y col., 1990).

Puesto que en conjunto las ERO reaccionan con cualquier tipo de biomolécula, sus efectos tóxicos sobre los microorganismos patógenos son muy importantes como mecanismos de defensa para las plantas.

2.3.2.4. El efecto de la acumulación de ERO varía dependiendo del tipo de patógeno.

2.3.2.4.1. Tipos de patógenos con base en su estrategia de adquisición de nutrientes.

Un estilo de vida patogénico se caracteriza por una dependencia metabólica en el hospedero. Es una asociación finamente regulada en donde la fisiología del hospedero es explotada y modificada para optimizar la producción de nutrientes para el patógeno, y de manera recíproca, el metabolismo del patógeno es adaptado para utilizar lo que se vuelve disponible (Divon y Fluhr, 2007).

Tradicionalmente, los hongos fitopatógenos han sido clasificados de acuerdo a su estilo de vida en biótrofos y necrótrofos. Los patógenos biótrofos se distinguen por una dependencia total del hospedero para completar su ciclo de vida, obteniendo nutrientes de las células vivas a través de la diferenciación de estructuras de nutrición especializadas denominadas haustorios (Mendgen y Hahn, 2002). En contraste, los patógenos necrótrofos no poseen estructuras de nutrición especializadas debido a que obtienen los nutrientes de células muertas (Van Kan, 2006). Con el fin de ajustar la futura diversificación de los estilos de vida, se ha acuñado el término hemibiótrofo para considerar a los patógenos que mantienen vivas las células de sus hospederos mientras se establecen en el tejido, y solo después de esta breve fase tipo biotrófica cambian a un estilo de vida necrotrófico (Perfect y Green, 2001).

Un proceso de infección comprende tres fases principales: penetración, proliferación y esporulación (Solomon y col., 2003). Las fases de penetración y esporulación son comunes a todos los hongos, mientras que la fase de proliferación varía de acuerdo al tipo de patógeno, por lo que, puede ser biotrófica, necrotrófica o ambas, en el caso de los patógenos hemibiotrófos (Figura 5). Así, los biotrófos carecen de una fase de proliferación necrotrófica; los hemibiotrófos pasan por fases sucesivas de proliferación biotrófica y necrotrófica; y los necrótrofos carecen de una fase de proliferación biotrófica (Divon y Fluhr, 2007).

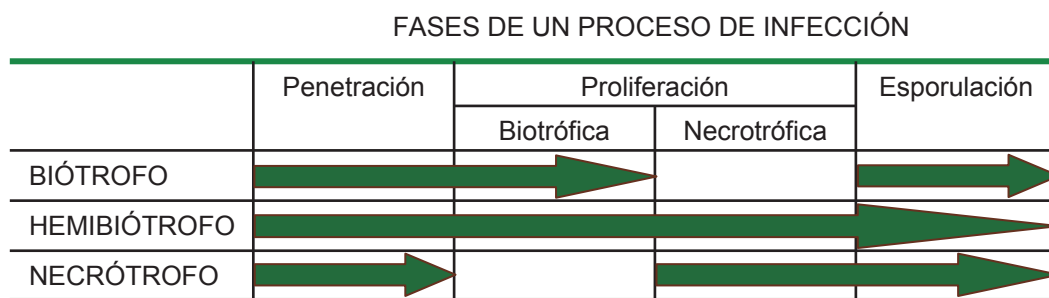


Figura 5. Fases de un proceso de infección que son relevantes para cada tipo de hongo fitopatógeno que se conoce con base en su estrategia de adquisición de nutrientes (Divon y Fluhr, 2007).

2.3.2.4.2. Efecto de la acumulación de ERO dependiendo del tipo de patógeno.

Uno de las primeras respuestas de defensa activadas en el tejido vegetal en respuesta al ataque de patógenos es la acumulación de ERO o explosión oxidativa (Bolwell y col., 1995; Bolwell, 1999; Apel y Hirt, 2004). Varios estudios de interacción planta-patógeno hacen evidente que la acumulación de ERO ejerce un efecto distinto en la patogénesis de la planta dependiendo de muchos factores, de los cuales el estilo de vida del patógeno es el principal (Hückelhoven y Kogel, 2003).

En el caso de patógenos biotrófos, que requieren de células vivas para nutrirse, la acumulación de ERO es un mecanismo de defensa efectivo contra ellos, ya que restringe la infección por este tipo de patógenos (Thordal-Christensen y col.,

1997; Mellersh y col., 2002) como ocurre durante la infección de la cebada por *Blumeria graminis* (Vanacker y col., 2000). Cuando los patógenos son necrótrofos, lo cual implica que requieren de células muertas para su supervivencia, la acumulación de ERO lejos de ser un mecanismo de defensa viable para la planta, facilita la infección por este tipo de patógenos (von Gönner y Schlösser, 1993; Kumar y col., 2001) como en el caso de la infección de *Arabidopsis* por *Botrytis cinerea* (Govrin y Levine, 2000) y de la cebada por *Rhynchosporium secalis* (Able, 2003). En el caso de patógenos hemibiótrofos, que exhiben características de ambos estilo de vida, las ERO restringen la infección durante la fase biotrófica y la facilitan durante la fase necrotrófica, como ocurre durante la infección del trigo por *Septoria tritici* (Shetty y col., 2007). Estos y otros reportes sugieren que una patogénesis exitosa de algunos patógenos necrótrofos o hemibiótrofos depende de o es al menos apoyada por una alta concentración de peróxido de hidrógeno (von Tiedemann, 1997; Govrin and Levine, 2000; Kumar y col., 2001).

2.3.3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN PLANTAS

La naturaleza altamente tóxica de las ERO implica que en conjunto pueden reaccionar con cualquier tipo de biomolécula, lo cual les otorga una gran importancia como mecanismos de defensa para las plantas en contra de los patógenos. Sin embargo, las plantas requieren mantener los niveles de ERO bajo un estricto control para evitar los efectos tóxicos hacia sus propios componentes. Es por ello que las plantas cuentan con mecanismos de destoxificación para eliminar a las ERO cuando éstas ya no sean requeridas (Foyer y Noctor, 2005).

De acuerdo con esta idea las plantas poseen sistemas de defensa antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos que evitan el daño oxidativo (ejemplos, Tabla 2). Estos sistemas forman una unidad versátil de control de la acumulación de ERO en espacio y tiempo, resultado de sus propiedades bioquímicas y de su inducción a nivel enzimático y genético (Alscher y Hess, 1993). Durante el estrés en plantas, el incremento en la producción de ERO puede ser resultado del

incremento de la actividad y/o expresión genética de las enzimas que las generan (NADPH oxidasa, peroxidasas, oxalato oxidasa, etc.); de la desactivación y/o inhibición de la expresión de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasas); y/o del decremento en los componentes antioxidantes no enzimáticos (ascorbato, glutatión, etc.) que eliminan las ERO o reducen químicamente los compuestos oxidados por ellas (Wojtaszek, 1997; Kuzniak y Urbanek, 2000; Mathews y van Holde, 2000; Møller, 2001; Vranová y col., 2002). Por ejemplo, en el incremento del ácido salicílico se ha implicado la desactivación de la catalasa y la ascorbato peroxidasa (Chamnongpol y col., 1998). De esta manera dependiendo del modelo de estudio (planta-agente estresante), la producción de ERO puede ser regulada por una o varias enzimas citosólicas y/o apoplásticas, y amortiguada por uno o varios de los sistemas antioxidantes.

Tabla 2. Ejemplos de los sistemas antioxidantes en plantas.

ENZIMÁTICOS	NO ENZIMÁTICOS
Superóxido dismutasa (SOD)	Tocoferoles (α -tocoferol)
Peroxidasas (PODs)	Carotenoides (β -caroteno)
Catalasa (CAT)	Flavonoides (epicatequina)

2.3.3.1. Peroxidasas (PODs)

Las PODs (EC 1.11.1.7) son enzimas oxido-reductasas que están ampliamente distribuidas en los tejidos vegetales con diferentes funciones asociadas con una aparente carencia de especificidad de sustrato (Campa, 1991; Mäder, 1992; Hiraga y col., 2001). Se ha sugerido que las PODs participan en el entrecruzamiento de proteínas estructurales en la pared celular (Fry, 1986; Schnabelrauch y col., 1996), en el entrecruzamiento de pectinas por puentes diferúlicos (Amaya y col., 1999), en el catabolismo de auxinas (Normanly y col., 1995; Lagrimini y col., 1999),

en la defensa contra patógenos (Chittoor y col., 1999), en la respuesta a herida (Egea y col., 2001), en la senescencia (Abeles y col., 1988), y en la oxidación de alcoholes hidroxycinamílicos antes de su polimerización durante la formación de lignina y suberina en las paredes celulares (Roberts y col., 1988; Whetten y col., 1998; Bernards y col., 1999).

Así, la resistencia de las plantas al ataque de patógenos está asociada con la inducción de peroxidasas en sus tejidos (van Breusegem y col., 2001; Lin y Kao, 2001). En el apoplasto actúan como enzimas tanto consumidoras como productoras de peróxido de hidrógeno. Como consumidoras al catalizar la oxidación de un grupo diverso de moléculas orgánicas como los fenoles usando el peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones (Dawson, 1988; Dunford, 1999). En este sentido, la actividad de peroxidasa podría esperarse que reduzca el nivel de ERO al metabolizar el peróxido de hidrógeno, sin embargo, las peroxidasas también son capaces de llevar a cabo varias reacciones que llevan a la generación de esta ERO. Las PODs que usan NADH como aceptor de electrones se conocen como NADH peroxidasas y se ha sugerido que juegan un papel importante en la formación del peróxido de hidrógeno (Elstner y Heupel, 1976; Gross y col., 1977; Halliwell, 1978; Mäder y col., 1980; Mäder y Amberg-Fisher, 1982; Bolwell y col., 1995). En 1976, Elstner y Heupel reportaron la producción de peróxido de hidrógeno a expensas de NADPH o NADH en presencia de Mn^{2+} por peroxidasas de las paredes celulares de la raíz de rábano. La oxidación de NADPH or NADH puede generar peróxido de hidrógeno, el cual entonces puede ser utilizado en la peroxidación de fenoles. Reportes mas recientes mencionan que la acumulación apoplástica de ERO en lechuga en respuesta al patógeno no hospedero *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* es sensible a cianuro y azida, indicando una posible contribución de las peroxidasas a la generación de las ERO (Bestwick y col., 1997). En el frijol ayocote las peroxidasas de la pared celular pueden oxidar reductores aún no identificados para producir peróxido de hidrógeno de una manera dependiente del pH, siendo la alcalinización del apoplasto un prerrequisito para su actividad (Bolwell y col., 2002).

Sin embargo, es difícil definir las funciones específicas de PODs individuales debido a su baja especificidad de sustrato *in vitro* y a la presencia de muchas isoenzimas. Las peroxidasas normalmente existen en las plantas como múltiples isoenzimas. Frecuentemente la actividad de peroxidasa medible se incrementa varias veces por arriba de los niveles del control en plantas infectadas, y en algunos casos este incremento es atribuible a incrementos en las actividades de isoenzimas específicas. En un menor número de casos, se ha visto que aparecen isoperoxidasas específicas de una enfermedad en tejidos infectados (Kawashima y Uritani, 1963; Yu y Hampton, 1964; Sako y Stahmann, 1972; Vance y col., 1976).

2.3.3.2. Flavonoides

El término flavonoides es un nombre genérico utilizado para identificar colectivamente a una gran variedad de compuestos de estructura química similar. Los flavonoides son compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las plantas. Son sintetizados a través de la ruta fenilpropanoide. Se estima que el número de flavonoides conocidos por la diversidad de su arquitectura molecular es de alrededor de 5,000 compuestos (Bors y col., 1996; Rice-Evans, 1996). Los flavonoides comparten una estructura química básica denominada núcleo flavan (Figura 6), a partir del cual se presentan diferencias en el grado de aromaticidad, el ordenamiento y el número de grupos hidroxilos sustitutos, así como la extensión y tipo de glicosilación de estos grupos. Con base en estas diferencias, los flavonoides se pueden clasificar en varios subgrupos, tales como flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanoles, isoflavonas, antocianidinas, entre otros (Haslam, 1998).

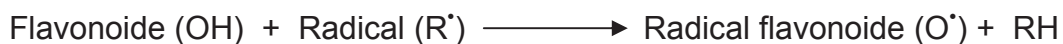
Los flavonoides son antioxidantes en virtud de las propiedades reductoras de sus grupos hidroxilo fenólicos, definidas por sus potenciales redox, en combinación con la estabilidad de los radicales flavonoides (Jovanovic y col., 1998). Repka y Fischerova (2000) destacaron la importancia de los flavonoides como antioxidantes en plantas. Ellos detectaron mayores niveles de peróxido de hidrógeno en pétalos de una mutante de petunia deficiente de flavonoides en comparación con los de la

petunia tipo silvestre. Las mutantes expresaron niveles elevados de peroxidasas, las cuales pudieron haber sustituido la función atrapadora de peróxido de hidrógeno de los flavonoides.

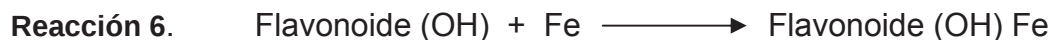
Las propiedades antioxidantes de los flavonoides se deben en primer lugar, a su capacidad de actuar como *atrapadores de radicales libres*; y en segundo lugar, a su habilidad para actuar como *quelantes de metales* (Bors y Stettmaier, 1997; Cadenas, 1998).

El mecanismo básico de la actividad atrapadora de radicales libres es a través de la transferencia de electrones que determina que el antioxidante se transforme en una molécula radical. Este mecanismo involucra una transición redox mediante la cual el flavonoide dona un electrón (o átomo de hidrógeno, equivalente a la donación de un electrón y un H^+ al radical libre ($R^\bullet$). Durante el transcurso de esta transferencia de electrones, el carácter radical (inestabilidad), es transferido al antioxidante, formándose un radical flavonoide (radical fenoxilo) (Reacción 5).

Reacción 5.



Las propiedades antioxidantes de los flavonoides dependen en parte de su habilidad para quelar metales como el hierro o el cobre, que intervienen en la reacción de Fenton, generadora del radical hidroxilo (Reacción 3). Así, al quelar los metales, los flavonoides los sustraen de las reacciones formadoras de radicales libres (Bors y Stettmaier, 1997; Cadenas, 1998) (Reacción 6).



Los mecanismos descritos explican algunos efectos de los flavonoides, tales como la inhibición de la peroxidación lipídica, la supresión de las reacciones generadoras de radicales libres y la inhibición de algunas enzimas.

Dentro del subgrupo de los flavanoles de tipo monomérico, se encuentran la (+)-catequina y su isómero, la (-)-epicatequina, que son las formas predominantemente sintetizadas en las plantas. Sus enantiómeros raramente se encuentran en la naturaleza (Kofink y col., 2007). Estos flavanoles presentan una estructura química prácticamente igual, con la única diferencia de la posición en el plano espacial del grupo hidroxilo (-OH) en el anillo C. En la (+)-catequina se encuentra hacia adelante, y en la (-)-epicatequina se encuentra hacia atrás del plano que forma la molécula (Valenzuela, 2007) (Figura 6).

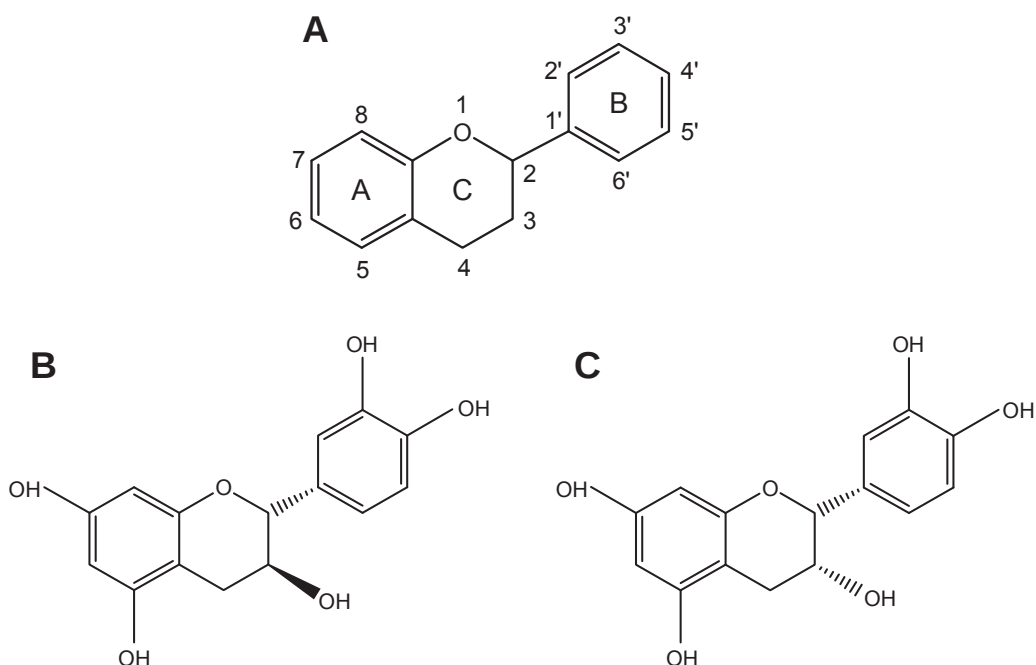


Figura 6. Estructura química básica de la molécula flavonoide, o núcleo flavan (A) y de las moléculas de (+)-catequina (2R, 3R) (B) y (-)-epicatequina (2R, 3S) (C).

Con respecto a la función de estos flavanoles en las plantas, al encontrarse en una interacción planta-patógeno, se ha reportado que la catequina, presente en las hojas de fresa, se acumula en respuesta a la inoculación con esporas no patogénicas del hongo *Alternaria alternata*. La catequina actúa como un factor inhibidor de la infección fúngica, al inhibir la formación de la hifa de infección a partir del apresorio

de *A. alternata*. Este hongo produce toxinas específicas de hospedero (HSTs) denominadas toxinas AF. En este sentido, la inoculación de un hospedero susceptible con esporas patogénicas, o con esporas no patogénicas suplementadas con la HST, AF-I, suprime la acumulación de la catequina. Lo anterior sugiere que la catequina puede actuar como un agente protector durante la resistencia inducida y que la toxina AF-I lo hace como un supresor fúngico de dicha resistencia, al inducir susceptibilidad a esporas no patógenicas de *A. alternata* (Yamamoto y col., 2000).

Por su parte, se ha reportado la presencia de epicatequina en el pericarpo de frutos de aguacate cv. Fuerte, en donde se sugiere que este flavanol participa en la resistencia de frutos inmaduros al ataque post-cosecha por *Colletotrichum gloeosporioides*. Algunos reportes sugieren que lo hace a través de la inhibición de algunas enzimas de maceración producidas por el patógeno, tales como una endopoligalacturonasa (Prusky y col., 1989) y una pectato liasa (Wattad y col., 1994). Recientemente, se ha sugerido que lo hace a través de la inhibición de una lipoxigenasa presente en el pericarpo del fruto (Karni y col., 1989; Guetsky y col., 2005). La epicatequina se encuentra en altas concentraciones (alrededor de 350 µg/g.p.f) en el pericarpo de los frutos inmaduros (Wattad y col., 1994), en donde regula la actividad de la lipoxigenasa, una enzima que se encarga de oxidar un compuesto antifúngico preformado denominado 1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxoheneicosa-12,15-dieno (dieno) que se encuentra en concentraciones fungitóxicas en los frutos inmaduros, por lo que, su presencia está correlacionada con la resistencia de los frutos al ataque del patógeno. Al madurar los frutos, disminuye la concentración de epicatequina, lo cual lleva a un incremento en la actividad lipoxigenasa, la cual metaboliza al dieno, volviendo a los frutos maduros susceptibles al ataque por *C. gloeosporioides* (Guetsky y col., 2005).

La infección de frutos de aguacate por *C. gloeosporioides* induce la producción de ERO, la cual varía en función del grado de maduración de los frutos, es decir, el tejido de frutos inmaduros o maduros difiere con respecto a la producción de ERO en respuesta al ataque del patógeno. Así, a diferencia de los frutos maduros

(susceptibles), los frutos inmaduros (resistentes) son fisiológicamente capaces de responder y producir altos niveles de ERO que pueden activar a la ruta fenilpropanoide, regular los niveles del dieno antifúngico, e inhibir el desarrollo del hongo, resultando en su quiescencia (Prusky y Keen, 1993; Beno-Moualem y Prusky, 2000).

Tomando en cuenta la importancia de la epicatequina en los frutos de aguacate con respecto a la resistencia de estos al ataque por *C. gloeosporioides*, resulta interesante saber que ocurre con este flavanol en el caso de la raíz del aguacate criollo infectada por *P. cinnamomi*.

2.3.4. LIGNIFICACIÓN

La resistencia de las plantas a los patógenos frecuentemente es resultado del establecimiento rápido de una localizada respuesta hipersensible (RH) por la planta en las regiones de intento de infección. Existen muchos componentes bioquímicos de la RH que actúan en conjunto para impedir la diseminación de un organismo invasor. Uno de ellos involucra cambios en los polímeros estructurales de la pared celular como es la deposición de lignina o proceso de lignificación (Dixon, 1986).

La lignina es un heteropolímero aromático sumamente complejo derivado principalmente de tres alcoholes hidroxicinamílicos que difieren en el grado de metoxilación del anillo aromático. Estos son los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico en sus formas de radical libre, denominados monolignoles, los cuales son sintetizados a través de la ruta fenilpropanoide para luego ser transportados a la pared celular (Boerjan y col., 2003). La lignina resulta de la polimerización oxidativa de estos monolignoles en la pared celular, los cuales dan lugar respectivamente a las unidades de *p*-hidroxifenil, guaiacil y siringil al ser incorporados al polímero. Las proporciones de estas tres unidades en la pared celular varían de acuerdo a la especie de planta y al tipo de tejido (Campbell y Sederoff, 1996).

Conforme se polimeriza la lignina, va formando enlaces covalentes con carbohidratos y proteínas (Lai y Sarkanen, 1971; Whitmore, 1978), lo cual origina paredes celulares altamente resistentes al daño mecánico y enzimático (Higuchi, 1985; Vance y col., 1980). La acumulación de lignina en el tejido vegetal no leñoso está comúnmente asociada con intentos de infección fúngica (Vance y col., 1980). Se ha hipotetizado que su deposición interfiere con la hidrólisis enzimática y penetración mecánica del tejido vegetal por patógenos fúngicos, así como con el movimiento de agua y moléculas difundibles entre la planta y el hongo (Ride, 1978). De este modo, la acumulación de lignina se ha correlacionado con la resistencia a la enfermedad en diversas interacciones planta-patógeno. Estas incluyen la del pepino con *Pythium aphanidermatum* (Chen y col., 2000) y la del trigo con *Fusarium graminearum* (Mohammadi y Kazemi, 2002).

Se ha propuesto que las peroxidasas de las plantas catalizan el último paso enzimático de la biosíntesis de lignina, que es la oxidación de alcoholes hidroxycinamílicos para producir sus formas de radical libre fenoxi (monolignoles) que son transitorios, y que luego se polimerizan en una variedad de configuraciones. Dicha oxidación se lleva a cabo a expensas de peróxido de hidrógeno, que sirve como aceptor de electrones (Higuchi, 1985; Whetten y col., 1998). También se cree que las peroxidasas son las responsables de la generación de peróxido de hidrógeno a través de la reducción del oxígeno molecular usando al NADH como donador de electrones (Halliwell, 1978; Bolwell y col., 1995; Bolwell, 1999; González y Rojas, 1999; Patykowski y Urbanek, 2003). Ambos eventos son extracelulares, y cualquiera puede servir como un elemento regulatorio para el control de la biosíntesis de lignina.

2.3.5. ANTIOXIDANTES PRODUCIDOS POR PATÓGENOS

Poco se sabe acerca de la interacción planta-patógeno desde la perspectiva del patógeno. Si las ERO juegan un papel en la defensa de las plantas, entonces la evolución de sistemas antioxidantes pueden armar a un patógeno con una mayor ventaja selectiva en la posible supresión de las defensas del hospedero (Zhang y

col., 2004). Existen reportes de que varios patógenos fúngicos secretan enzimas antioxidantes durante el establecimiento de la infección en sus hospederos. Estas enzimas se consideran como factores de virulencia que favorecen la supervivencia de los patógenos al inhibir el estrés oxidativo producido por las plantas (Xiu y col., 2001). Así, se sabe que *B. cinerea* (necrótrofo) secreta catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa durante la infección del tomate y frijol (Mayer y col., 2001; Schouten y col., 2002). Una candidata para enzima clave durante el inicio del proceso de infección de un hongo fitopatógeno puede ser la catalasa, debido a que la remoción del peróxido de hidrógeno producido por el hospedero, que es la principal fuente para la generación del radical hidroxilo (altamente reactivo y tóxico), reduce significativamente el estrés relacionado con las ERO en el hongo, proveyéndolo de tiempo suficiente para la inducción de otras enzimas clave para etapas posteriores del proceso de infección. En este sentido, se ha reportado que *Claviceps purpurea* (biótrofo) y *Blumeria graminis* (biótrofo obligado) secretan catalasas extracelulares durante la infección del centeno (Garre y col., 1998) y la cebada (Zhang y col., 2004), respectivamente. Hasta el momento, no existen reportes acerca de la secreción de este tipo de enzimas por parte de oomicetos fitopatógenos, en particular, de *P. cinnamomi*.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la respuesta oxidativa es una de las primeras respuestas de defensa de las plantas ante el ataque por patógenos, y que este fenómeno puede tener un efecto distinto dependiendo del tipo de patógeno en cuestión, resulta interesante estudiar a nivel bioquímico como es que participa el estrés oxidativo del aguacate criollo durante la infección por *P. cinnamomi*, un patógeno necrótrofo.

IV. HIPÓTESIS

La respuesta oxidativa del aguacate criollo ante la infección por *Phytophthora cinnamomi* es evadida por el patógeno.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta oxidativa en raíces de aguacate criollo infectadas por *P. cinnamomi*.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar por espectrofotometría la producción de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxidación de lípidos en raíces de aguacate infectadas con *P. cinnamomi* a diferentes tiempos.
2. Analizar por espectrofotometría la actividad de catalasa extracelular de *P. cinammomi in vitro*.
3. Analizar por espectrofotometría la actividad de peroxidasas totales en raíces de aguacate infectadas con *P. cinnamomi* a diferentes tiempos.
4. Determinar la concentración de lignina en raíces de aguacate infectadas con *P. cinnamomi* a diferentes tiempos.
5. Determinar la concentración de epicatequina en raíces de aguacate infectadas con *P. cinnamomi* a diferentes tiempos.

VI. MATERIALES Y MÉTODO

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

6.1. MATERIALES

6.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Plantas de aguacate (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) de 6 meses de edad, obtenidas de un vivero de la ciudad de Uruapan, Michoacán.

Cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. and Magn.) Briosi and Cav. y *Phytophthora cinnamomi* Rands., donadas respectivamente por el D.C. Abraham García Chávez y el D.C. Rafael Salgado Garciglia, ambos investigadores del IIQB de la UMSNH.

6.1.2. REACTIVOS

Agar dextrosa y papa de la marca BDBioxon (Edo. de México, México). Ácido 2-tiobarbitúrico, ácido tioglicólico, azul de lactofenol, epicatequina de té verde, fosfato de potasio, fosfato de sodio, guaiacol, hidróxido de sodio, peroxidasa y sal de sodio XTT de la marca Sigma (St. Louis, MI, USA). Cloruro de sodio de la marca GibcoBRL (Grand Island, N.Y, USA). Ácido tricloroacético y peróxido de hidrógeno al 30% de la marca Caledon Laboratories LDT (Georgetown, Ont., Canadá). Sulfato de amonio de la marca USB (Cleveland, Ohio, USA). Acetato de etilo y metanol de la marca J. T. Baker (Xalostoc, Edo. de México, México). Ácido clorhídrico y etanol absoluto de la marca Merck (Darmstadt, Hesse, Alemania). Nitrógeno líquido de la marca INFRA (Tlalnepantla, Edo. de México, México). Ridomil Gold 4E (Metalaxyl-M) de la marca Syngenta (Distrito Federal, México).

6.2. MÉTODO

6.2.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Las plántulas de aguacate criollo fueron inoculadas con *P. cinnamomi* e incubadas durante 0, 2 y 4 días para posteriormente llevar a cabo el análisis del tejido de raíz infectado. Se analizó la producción de especies reactivas de oxígeno: anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo como peroxidación de lípidos; así como la actividad de peroxidasas; y se determinó la concentración de lignina y de epicatequina en el tejido (Figura 7). En el caso de las plántulas control, se siguió la misma estrategia experimental, a excepción de la inoculación.

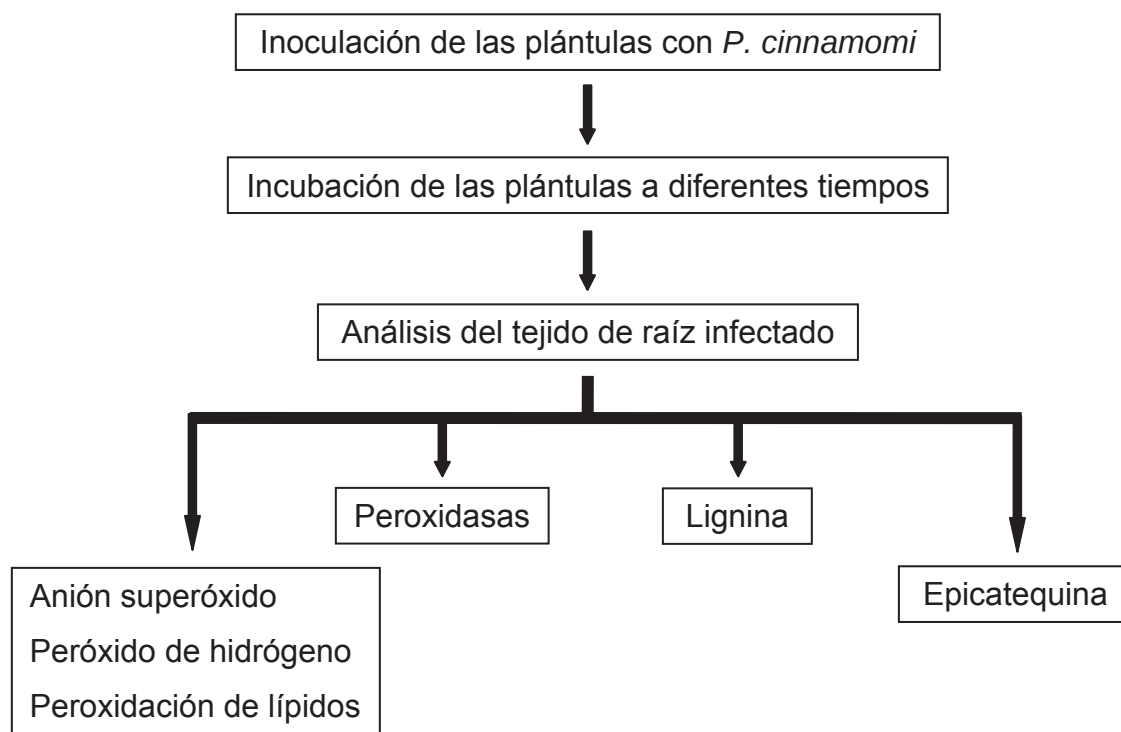


Figura 7. Estrategia general utilizada durante este trabajo.

6.2.2. INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS

A las raíces de las plántulas de aguacate se les retiró la mayor cantidad de suelo posible para luego colocar cada planta en una maceta con 400 g de suelo estéril (121°C durante 15 min) mezclado con un macerado de 10 discos de 8.5 cm de micelio de *P. cinnamomi*, y como controles, con 400 g de suelo estéril, o mezclado con un macerado de micelio de *Colletotrichum lindemuthianum*. El oomiceto se creció en cajas Petri con medio agar dextrosa y papa con jugo de verduras V8 (PDAV8). El hongo se creció en cajas Petri con medio agar dextrosa y papa (PDA). Las macetas se sumergieron en recipientes con agua suficiente para cubrir un tercio de la altura de la maceta para favorecer el crecimiento de *P. cinnamomi*. Las plántulas se incubaron durante un máximo de 4 días, que fue el tiempo necesario para observar el síntoma de marchitez característico de la enfermedad, con un tiempo intermedio de 2 días. Una vez transcurridos los tiempos de incubación, se tomaron fotografías de las plántulas con una cámara digital SONY Cybershot modelo DSC-T3 de 5.1 Megapíxeles (Japón), las cuales se presentaron como resultados. Finalmente, las plántulas se retiraron del suelo, sus raíces se lavaron con agua corriente, se secaron y se almacenaron a -80°C en muestras de 0.5 g para su posterior análisis. El experimento se realizó por triplicado.

6.2.3. TINCIÓN DE RAÍCES Y MICROSCOPIA

Una muestra de 0.5 g de tejido de raíz (previamente tratado a diferentes tiempos) se colocó en una caja petri con 20 ml de agua destilada. Una vez descongelada se le tomaron fotografías con una cámara réflex digital Nikon modelo D50 de 6.1 Megapíxeles con una lente AF-S DX Zoom-Nikkor 18-55 mm; así como con un microscopio estereoscópico Leica MZ6 (Heerbrugg, Suiza), para un mayor detalle. Posteriormente, se realizaron cortes de cada muestra lo más finamente posible con la ayuda de unas pinzas y una navaja de bisturí. Se colocaron 3 cortes en un portaobjetos con marco de parafilm y se les agregó azul de lactofenol al 3% hasta cubrirlos por completo. Se incubaron durante 10 min., luego de los cuales se

lavarón con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, se les agregó agua destilada y se cubrieron con un portaobjetos para realizar las observaciones pertinentes en un microscopio compuesto Zeiss Axiostar Plus (Göttingen, Alemania). Se tomaron las fotografías correspondientes con una cámara digital SONY Cybershot modelo DSC-S75 de 3.3 Megapíxeles (Japón), y se editaron con un paquete de software Zeiss Axiovision 4AC. Se presentaron fotografías representativas como resultados. El ensayo se realizó por triplicado.

6.2.4. MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

6.2.4.1. ANIÓN SUPERÓXIDO

La medición de anión superóxido se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Able y colaboradores (1998), en el cual se colocó 0.5 g de tejido de raíz (previamente tratado a diferentes tiempos) en 10 ml de una solución de la sal de tetrazolio XTT 0.5 mM y se incubó durante 10 min., luego de los cuales se tomó 1 ml de la solución y se midió su absorbencia a 470 nm (luz visible) en un espectrofotómetro Beckman DU 530 (Fullerton, CA, E.U.A.). Como blanco se usó la solución de XTT 0.5 mM. El fundamento del protocolo es la reducción del XTT (color amarillo) en presencia de anión superóxido, lo cual forma un formazan hidrosoluble color naranja. Los resultados de absorbencia se graficaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

6.2.4.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La medición de peróxido de hidrógeno se realizó de acuerdo al protocolo modificado de von Tiedemann (1997), en el cual se colocó 0.5 g de tejido de raíz (previamente tratado a diferentes tiempos) en 10 ml de agua destilada estéril y se incubó durante 10 min, luego de los cuales se tomó 1 ml del agua y se mezcló con 500 µl de una mezcla de reacción que contiene 0.05% de guaiacol (440 µl/L) y peroxidasa (350 µl/L, 2500 U/ml) disueltos en buffer de fosfato de sodio (NaH₂PO₄)

25 mM, a pH 7.0. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, en la oscuridad, para finalmente medir su absorbencia a 450 nm (luz visible) en un espectrofotómetro Beckman DU 530 (Fullerton, CA, E.U.A.). Como blanco se usó agua destilada estéril. El fundamento del protocolo es la reducción del peróxido de hidrógeno por la peroxidasa con la consecuente oxidación del guaiacol, lo cual forma un complejo color café. La concentración de peróxido de hidrógeno se obtuvo a partir de una concentración conocida obtenida de una curva patrón del mismo. Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

6.2.4.3. RADICAL HIDROXILO COMO PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La medición de la peroxidación de lípidos se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Popham y Novacky (1991), en el cual se pulverizó 0.5 g de tejido de raíz (previamente tratado a diferentes tiempos) en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se suspendió y homogeneizó en 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se centrifugó a 15,000 x g durante 20 min, luego de los cuales se tomaron 125 µl del sobrenadante y se mezclaron con 125 µl de TCA al 10% y 500 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.2% disuelto en TCA al 10%. La mezcla se hirvió durante 5 min y se dejó enfriar durante otros 5 min en hielo, para luego centrifugarla a 10,000 x g en una centrífuga Eppendorf modelo 5415 D (Westbury, NY, E.U.A.) durante 10 min. Finalmente, se midió su absorbencia a 532 y 600 nm (luz visible) en un espectrofotómetro Beckman DU 530 (Fullerton, CA, E.U.A.). Como blanco se usó la mezcla mencionada solo sustituyendo el sobrenadante por agua destilada estéril. El fundamento del protocolo es la reacción del TBA con el malondialdehído (MDA, indicador de peroxidación lipídica), para formar un complejo color rojo. La concentración de TBARS (especies reactivas al TBA) se obtuvo con la fórmula: $A/\epsilon l$, en donde A es la absorbencia de la muestra ($A_{532} - A_{600}$), ϵ es el coeficiente de extinción molar del MDA, 155 mM/cm y l es la longitud de la celda, 1 cm. Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

6.2.5. BIOENSAYOS EN MEDIO SÓLIDO

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron cajas petri con medio PDAV8 (para el caso de *P. cinnamomi*) o PDA (para el caso de *C. lindemuthianum*), a las cuales se les espatuló peróxido de hidrógeno a una concentración final de 300 μ M y 20 mM, como control positivo 50 μ l de agua destilada, y como control negativo el fungicida metalaxyl a una concentración de 0.5 g/l. Una vez espatuladas, se procedió a colocar un disco de micelio de 0.5 mm de diámetro en el centro de cada caja y se incubaron durante 7 días, tiempo necesario para que el oomiceto cubra por completo una caja petri bajo condiciones normales. Se midió el radio del micelio cada 24 hr y se reportó como crecimiento radial en cm. Luego de los 7 días, se tomaron fotografías de las cajas con una cámara digital SONY Cyber-shot modelo DSC-T3 de 5.1 Megapixeles (Japón), las cuales se presentaron como resultados. Los datos de la cinética de crecimiento se graficaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

6.2.6. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

6.2.6.1. CATALASA EXTRACELULAR DE *P. cinnamomi*

6.2.6.1.1. EXTRACCIÓN

La extracción de la enzima se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Barrett y González (1994). Se filtraron con papel Whatman no. 4, 50 ml de medio líquido dextrosa papa en los cuales se había puesto a crecer 5 discos (0.5 mm de diámetro) de micelio de *P. cinnamomi* o *C. lindemuthianum* durante 7 días en agitación constante (140 rpm) a 25°C, o como control negativo 50 ml de medio sin inóculo mantenido bajo las mismas condiciones. El filtrado se centrifugó a 2,000 rpm en una centrífuga IEC Centra modelo CL-2 (Needham Heights, MA, E.U.A.) durante

20 minutos, y al sobrenadante se le agregó poco a poco sulfato de amonio hasta alcanzar un 85% de saturación en agitación constante durante 2 horas. Posteriormente, se centrifugó a 4,300 rpm durante 10 minutos para finalmente recuperar la pastilla, resuspenderla en 100 µl de buffer de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0 y se utilizó para llevar a cabo el ensayo de actividad enzimática por espectrofotometría.

6.2.6.1.2. ACTIVIDAD POR ESPECTROFOTOMETRÍA

La actividad de catalasa se midió de acuerdo al protocolo establecido por De Gara y colaboradores (2000). Se preparó (por triplicado por muestra) 1 ml de mezcla de reacción con 660 µl de agua destilada estéril, 326 µl de buffer de fosfato de potasio (KH₂PO₄) 50 mM, pH 7.0, 4 µl de peróxido de hidrógeno al 0.118 M y 10 µl de extracto enzimático. Se midió la disminución de la absorbencia a 240 nm (luz UV) durante 3 min a intervalos de 30 seg en un espectrofotómetro Beckman DU 530 (Fullerton, CA, E.U.A.). Como blanco se utilizó el buffer de KH₂PO₄. Finalmente, se calculó la actividad específica con la fórmula:

$$\text{U/mg de proteína} = \frac{(\Delta A_{240}/\text{min})(1000)}{[(43.6)(\text{mg de proteína})]/\text{ml de mezcla de reacción}}$$

en donde U es una unidad de actividad enzimática que corresponde a la cantidad de catalasa que cataliza la descomposición de 1 µmol de peróxido de hidrógeno en 1 min a 25°C; y ΔA_{240} es la diferencia entre las lecturas de absorbencia inicial y final. Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

6.2.6.2. PEROXIDASAS TOTALES

6.2.6.2.1. EXTRACCIÓN

La extracción de la enzima se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Svalheim y Robertsen (1990). Se pulverizó 0.5 g de tejido de raíz (previamente tratado a diferentes tiempos) en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se colocó en un tubo eppendorf, se suspendió en 1 ml de buffer de fosfato de sodio (NaH_2PO_4) 10 mM y cloruro de sodio (NaCl) 1 M, a pH 6.0 y se homogeneizó durante 30 segundos en un vórtex Fisher Vortex Genie 2 modelo G-560 (Bohemia, NY, E.U.A.). Posteriormente, la muestra se agitó en frío durante 1 hora, luego de la cual se centrifugó a 12,700 rpm en una centrífuga Eppendorf modelo 5415 D (Westbury, NY, E.U.A.) durante 25 minutos a 4°C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante (extracto enzimático) y se utilizó para llevar a cabo el ensayo de actividad enzimática por espectrofotometría.

6.2.6.2.2. ACTIVIDAD POR ESPECTROFOTOMETRÍA

La actividad de peroxidasa se midió de acuerdo al protocolo establecido por Cipollini (1998). Se preparó (por triplicado por muestra) 1 ml de mezcla de reacción con 10 μl de extracto enzimático y 990 μl de una solución de guaiacol, que contiene guaiacol al 0.25% (v/v), buffer de NaH_2PO_4 10 mM, pH 6.0 al 0.25% y peróxido de hidrógeno al 0.125% (v/v). Se midió el incremento en la absorbencia a 470 nm (luz visible) durante 3 min a intervalos de 30 seg en un espectrofotómetro Beckman DU 530 (Fullerton, CA, E.U.A.). Como blanco se utilizó el buffer de NaH_2PO_4 . Finalmente, se calculó la actividad específica con la fórmula:

$$v = \frac{\Delta A_{470}}{\epsilon l \Delta t}$$

en donde ΔA_{470} es la diferencia entre las lecturas de absorbencia inicial y final; ϵ es el coeficiente de extinción molar de la peroxidasa, 26,600 M/cm; l es la longitud de la celda, 1 cm; y Δt es la diferencia entre los tiempos inicial y final, 3 min. Los resultados se graficaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

6.2.7. CUANTIFICACIÓN DE LIGNINA POR SU DERIVATIZACIÓN CON ÁCIDO TIOGLICÓLICO

La extracción de lignina se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Bruce y West (1989). Se pulverizó 0.5 g de tejido de raíz (previamente tratado a diferentes tiempos) en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se colocó en un tubo Falcon de 50 ml, se suspendió en 10 ml de metanol absoluto y se homogeneizó durante 1 minuto en un vórtex Fisher Vortex Genie 2 modelo G-560 (Bohemia, NY, E.U.A.). El homogenado se centrifugó a 3,000 rpm en una centrífuga IEC Centra modelo CL-2 (Needham Heights, MA, E.U.A.) durante 15 minutos, luego de los cuales se recuperó la pastilla (residuo insoluble en alcohol, RIA), se transfirió a un vaso de precipitados de vidrio y se colocó en un horno de secado Terlab modelo MAH 450M (Guadalajara, Jal., México) durante 24 h a 60°C. Pasado dicho tiempo, se pesaron 45 mg del RIA, se colocaron en un tubo de vidrio con tapa de rosca y se le agregaron 5 ml de HCl 2 N y 0.5 ml de ácido tioglicólico. El tubo bien cerrado se agitó durante 1 minuto en un vórtex y se colocó en agua hirviendo durante 4 h a 100°C. Luego de dejarlo enfriar, la muestra se transfirió a un tubo de centrífuga de polipropileno de 10 ml y se centrifugó a 30,000 x g (velocidad equivalente a 19,090 rpm utilizando el rotor JA-21) en una centrífuga de alta velocidad Beckman modelo J2-MC (CA, E.U.A.) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó una vez con 5 ml de agua destilada. Una vez lavada, se resuspendió en 5 ml de NaOH 0.5 N y tapando el tubo con parafilm, se agitó suavemente durante 18 h a 25°C para extraer el ácido lignotioglicólico (LTGA). Pasado dicho tiempo, la muestra se centrifugó a 30,000 x g durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de vidrio con tapa de

rosca y se le agregó 1 ml de HCl concentrado y se incubó durante 4 h a 4°C para precipitar el LTGA. Finalmente, la muestra se transfirió a un tubo de centrifuga de polipropileno y se centrifugó a 30,000 x g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla naranja-café se resuspendió en 10 ml de NaOH 0.5 N para leer su absorbencia a 280 nm (luz UV) en un espectrofotómetro Beckman DU 530 (Fullerton, CA, E.U.A.). Como blanco se utilizó NaOH 0.5 N. Los resultados se expresaron como las unidades de absorbencia del LTGA a 280 nm y se graficaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

6.2.8. CUANTIFICACIÓN DE EPICATEQUINA

La extracción de la epicatequina se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Guetsky y col. (2005). Se pulverizó 1 g de tejido de raíz (previamente tratado a diferentes tiempos) en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se colocó en un tubo Falcon de 50 ml, se suspendió en 2 volúmenes (10 ml) de etanol al 95% y se homogeneizó durante 30 segundos en un vórtex Fisher Vortex Genie 2 modelo G-560 (Bohemia, NY, E.U.A.), luego de los cuales se centrifugó a 2,500 rpm en una centrifuga IEC Centra modelo CL-2 (Needham Heights, MA, E.U.A.) durante 5 min y se recuperó el sobrenadante, el cual se evaporó en una plancha caliente a 60°C. Posteriormente, el extracto se resuspendió en 10 ml de NaCl 1 mM y se realizaron 2 extracciones con 50 ml de acetato de etilo cada una, se recuperó la fase orgánica (superior) y se dejó evaporar a sequedad total. Se realizaron lavados con acetato de etilo hasta concentrar la muestra en un tubo eppendorf, y una vez ahí, el extracto se resuspendió en 100 µl de acetato de etilo, de los cuales se tomaron 10 µl y se agregaron a 990 µl de etanol al 95% para medir su absorbencia a 279 nm (luz UV) en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 530 (Fullerton, CA, E.U.A.). Como blanco se utilizó etanol al 95%. La concentración de epicatequina se obtuvo a partir de una concentración conocida obtenida de una curva patrón de epicatequina comercial de té verde (Sigma, no. catálogo E 4018). Los resultados se expresaron como microgramos de epicatequina por gramo de raíz y se graficaron con media aritmética y desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

VII. RESULTADOS

7.1. ESTABLECIMIENTO DEL SISTEMA DE INFECCIÓN.

Las plántulas inoculadas con *P. cinnamomi* manifestaron la enfermedad 4 días después del tratamiento como un marchitamiento severo de toda la parte aérea, que es un síntoma característico de la muerte descendente del aguacate (Fig. 8). Se tomó un tiempo intermedio de 2 días post-inoculación (d.p.i.) para incluir en los análisis posteriores una etapa intermedia entre una plántula sana y una enferma (de 4 días).

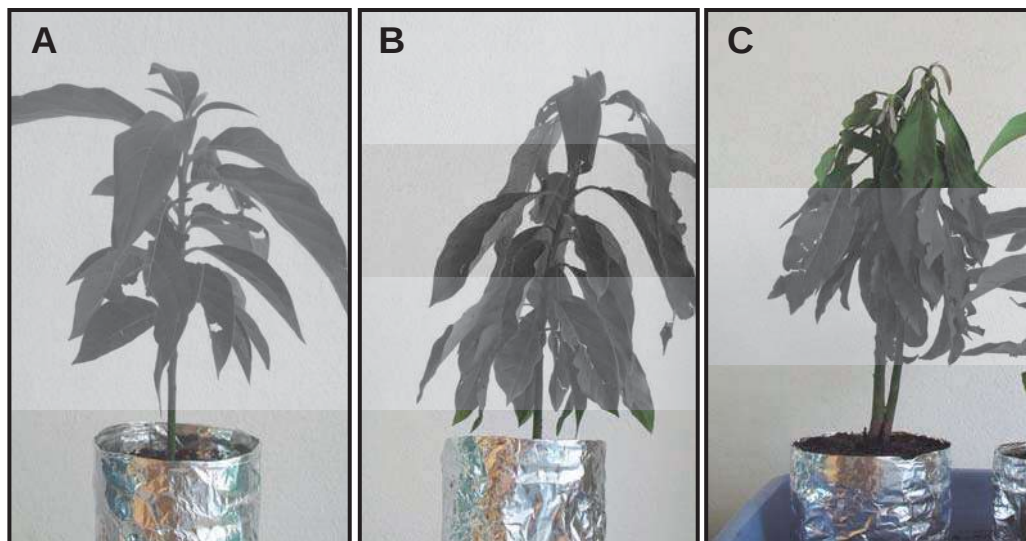


Figura 8. Plántulas de aguacate criollo inoculadas con *P. cinnamomi*. **A.** Control sin inóculo; **B.** 2 d.p.i.; **C.** 4 d.p.i.

Una vez que se estableció el sistema de infección en las plántulas, se observaron muestras de raíz de cada tratamiento para analizar el efecto de la infección sobre el tejido.

7.1.1. Análisis del tejido de raíz infectado con *P. cinnamomi*.

A los 4 días después del tratamiento, el tejido de raíz adquirió un color oscuro en comparación con el tejido control (sin inóculo) que presentó un color naranja-café claro (Fig. 9). El oscurecimiento de la raíz es uno de los síntomas mas característicos de un tejido infectado con *P. cinnamomi*, debido a la necrosis provocada por este microorganismo.

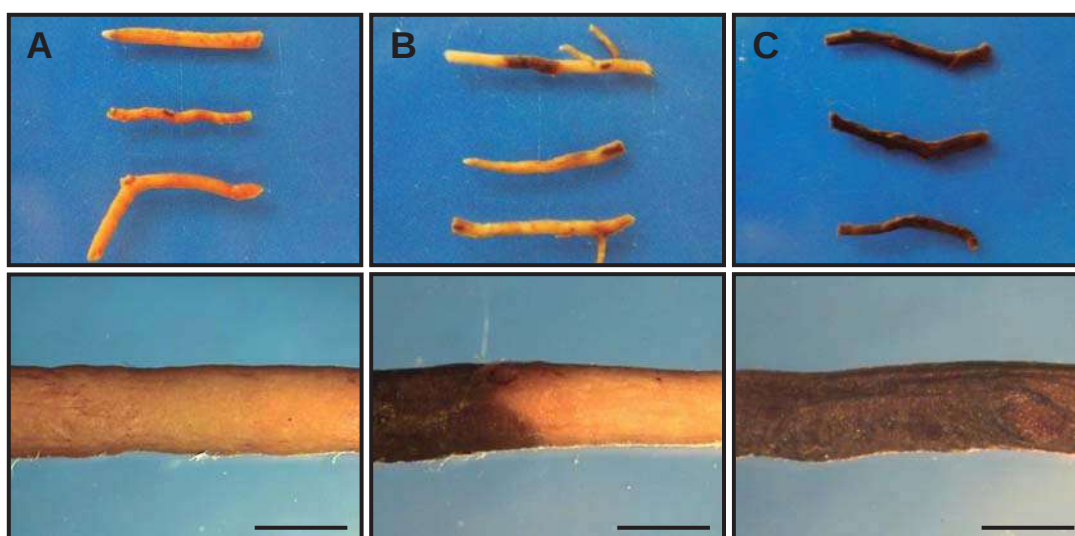


Figura 9. Raíces de aguacate infectadas con *P. cinnamomi*. **A.** Control sin inóculo; **B.** 2 d.p.i.; **C.** 4 d.p.i. La barra representa 2 mm.

Posteriormente se realizaron cortes del tejido de raíz de cada tratamiento y se observaron al microscopio con el fin de corroborar la presencia de *P. cinnamomi* en el tejido.

7.1.2. Análisis microscópico del tejido de raíz infectado con *P. cinnamomi*.

Luego de 4 días de tratamiento, el tejido de raíz presentó un abundante crecimiento de micelio (Figura 10D), a diferencia del tejido de una plántula control.

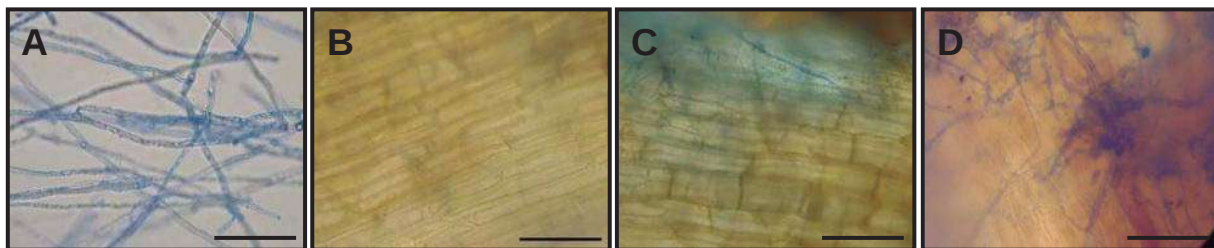


Figura 10. Tejido de raíz de aguacate infectada con *P. cinnamomi*. **A.** Micelio de *P. cinnamomi*; **B.** Control sin inóculo; **C.** 2 d.p.i.; **D.** 4 d.p.i. Tinción con azul de lactofenol. La barra representa 20 μm .

Así, el marchitamiento severo de la parte aérea, el oscurecimiento de la raíz y la colonización del tejido por el micelio nos permitió relacionar los síntomas de la enfermedad con la infección por *P. cinnamomi*. Después de la caracterización de la enfermedad se inició con el análisis de la respuesta oxidativa del aguacate criollo ante la infección por el oomiceto.

7.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

Se analizó la producción de ERO (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo como peroxidación de lípidos) en respuesta a la infección por *P. cinnamomi* en el tejido de raíz previamente tratado. Se observó que la producción de las tres ERO se incrementó con respecto a sus controles, alcanzando un máximo de acumulación a los 4 días post-inoculación (Fig. 11).

El contenido del anión superóxido, medido como la absorbencia del formazan de XTT a 470 nm, aumentó de 0.07 unidades en la planta control, a 0.10 unidades a los 2 días post-inoculación (d.p.i.) y a 0.20 unidades a los 4 d.p.i. (Fig. 11A). Este incremento fué de casi 3 veces con respecto al control sin inóculo (0 d.p.i.).

La concentración de peróxido de hidrógeno se incrementó desde un nivel basal de 87.5 μM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ de raíz, a 212.5 μM $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ de raíz a los 2 d.p.i. y 325 μM

H₂O₂/g de raíz a los 4 d.p.i. (Fig. 11B), lo cual corresponde a alrededor de 4 veces más con respecto al control de 0 d.p.i.

Finalmente, el tratamiento incrementó aproximadamente tres veces el nivel de peroxidación de lípidos en relación al control sin inóculo, de 2.1 nM TBARS/g de raíz a 6.6 nM TBARS/g de raíz, a los 4 d.p.i. (Fig. 11C).

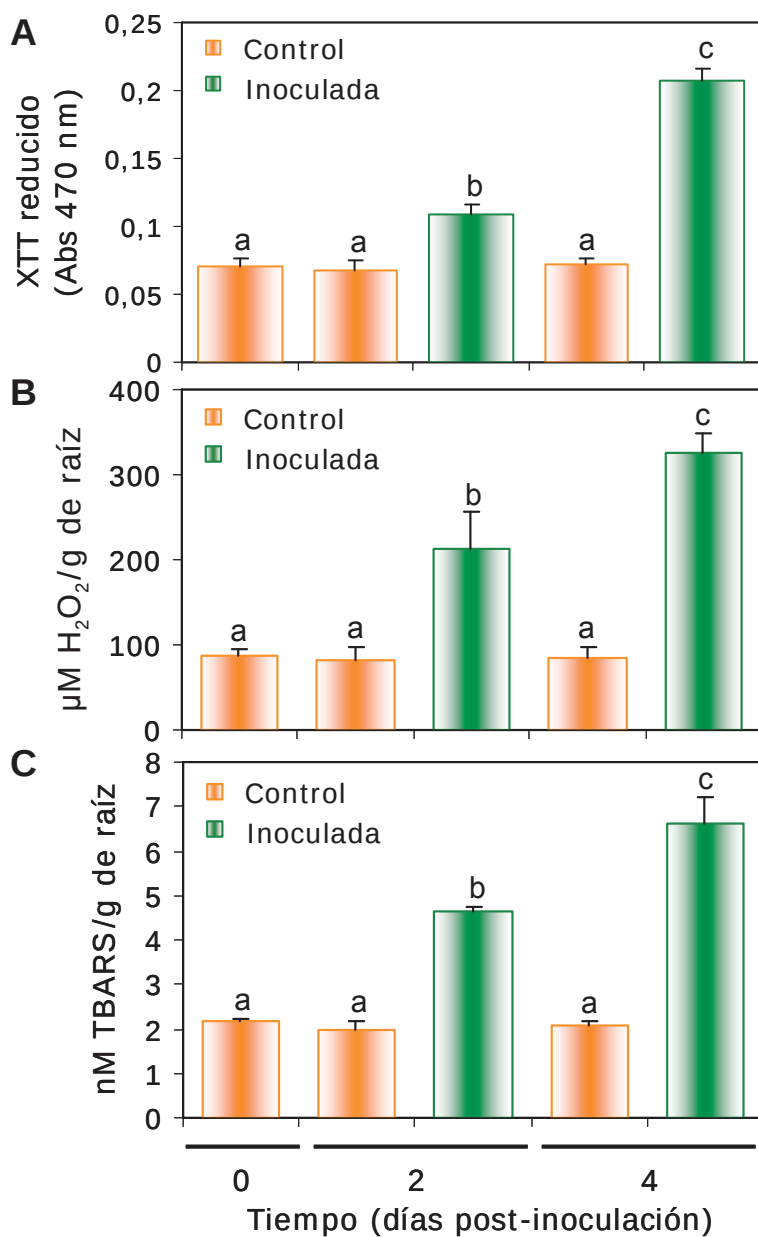


Figura 11. Producción de ERO en plántulas de aguacate criollo infectadas con *P. cinnamomi*. **A.** Anión superóxido; **B.** Peróxido de hidrógeno; y **C.** Peroxidación de lípidos. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con $n=3$. Tukey; α 0.05. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Este resultado nos sugiere que los mecanismos de defensa de la plántula se están activando, ya que ésta responde a la presencia del oomiceto acumulando ERO. Sin embargo, también es posible que *P. cinnamomi* produzca ERO como un factor de patogenicidad, así que para descartar la posibilidad de que el oomiceto por sí mismo estuviera contribuyendo a la cantidad del peróxido de hidrógeno cuantificado en una plántula infectada, se realizó un análisis de la presencia de ésta ERO en el micelio. No se detectó peróxido de hidrógeno en el micelio, lo cual sugiere que el peróxido de hidrógeno cuantificado proviene de la plántula y que se acumula como resultado de la interacción con *P. cinnamomi* (Fig. 12).

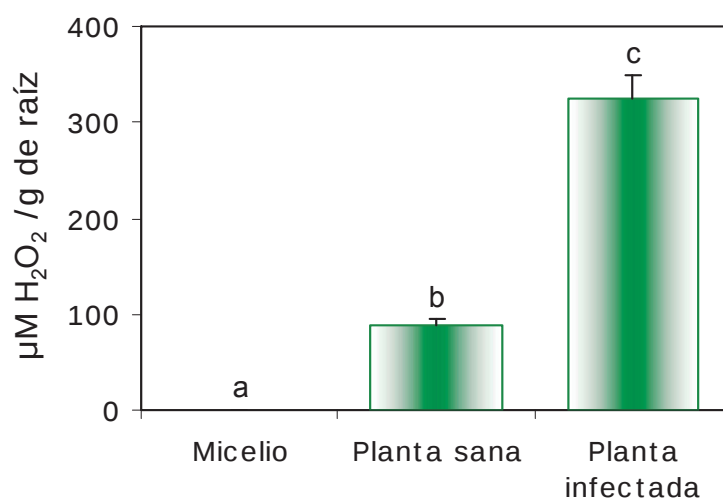


Figura 12. Producción de peróxido de hidrógeno en raíces de aguacate criollo infectadas con *P. cinnamomi*. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con $n=3$. Tukey; α 0.05. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Posteriormente, se analizó si la cantidad de peróxido de hidrógeno encontrada en las plántulas infectadas durante 4 días, que fue de alrededor de 300 μM , tenía algún efecto sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*, para lo cual se realizó un ensayo *in vitro* en el que se puso a crecer al oomiceto en presencia de dicha concentración de peróxido de hidrógeno, y de una concentración de 20 mM (considerada alta), la cual ha sido reportada que inhibe por completo el crecimiento *in vitro* de *S. sclerotiorum* (Walz y col., 2008), o lo reduce en *B. cinerea* (Schouten y col., 2002).

El tratamiento con 300 μM de peróxido de hidrógeno no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*. En la Figura 13a se muestra la cinética de crecimiento del oomiceto desde el primero (recuadro de la figura) hasta los 7 días, en donde se observa que no existe diferencia significativa entre el tratamiento con 300 μM de peróxido de hidrógeno y el control con agua. En cambio, el tratamiento con el fungicida metalaxyl inhibió por completo el crecimiento de *P. cinnamomi*; mientras que una concentración de 20 mM de peróxido de hidrógeno disminuyó su crecimiento en aproximadamente un 30% con respecto al control con agua. En la Figura 13b se muestran fotografías representativas del efecto de cada tratamiento sobre el crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi*.

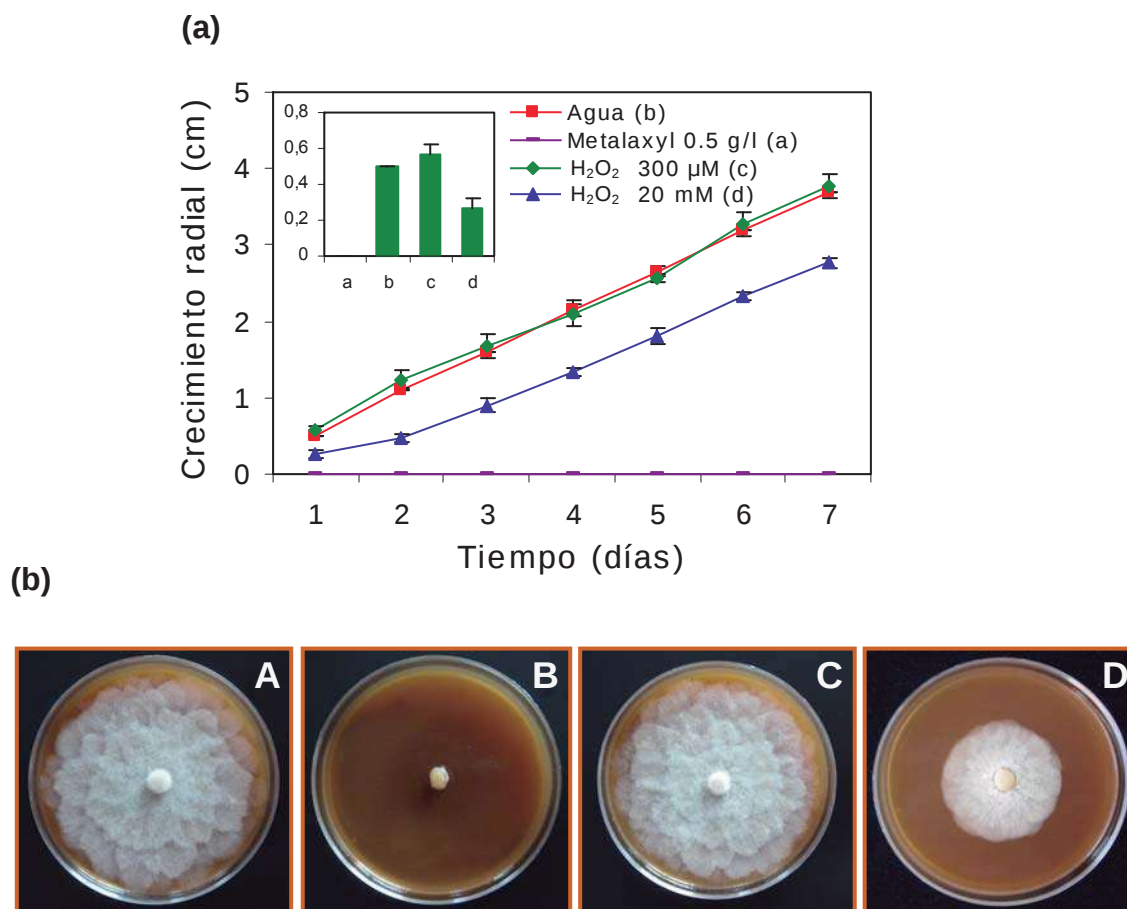


Figura 13. (a) Cinética de crecimiento de *P. cinnamomi* hasta los 7 días en presencia de peróxido de hidrógeno. El recuadro representa el crecimiento al día 1. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con $n=3$. **(b)** Crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi* en presencia de peróxido de hidrógeno. **A.** Agua; **B.** Metalaxyl; **C.** 300 μM H₂O₂; y **D.** 20 mM H₂O₂.

Por lo tanto, se concluye que a pesar de que el patógeno induce una acumulación de peróxido de hidrógeno en las raíces de las plántulas, la cantidad que éstas acumulan no afecta su crecimiento, al menos en un sistema *in vitro*.

Con el fin de comparar la producción de peróxido de hidrógeno en una plántula infectada por *P. cinnamomi*, con una plántula inoculada con un no patógeno de aguacate, se inocularon plántulas con el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, y se midió la cantidad de peróxido de hidrógeno presente en la raíz de aguacate criollo inoculada durante 4 días.

El peróxido de hidrógeno también se acumula en respuesta a *C. lindemuthianum* (Fig. 14). Al cabo de 4 días de inoculación, la plántula presentó una concentración de 322 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{g}$ de raíz, mientras que la plántula sana presentó un nivel basal de 87.5 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{g}$ de raíz, por lo que, el incremento fue de alrededor de 3 veces con respecto a la plántula control. La concentración de peróxido de hidrógeno de la plántula inoculada con *C. lindemuthianum* fue muy parecida a la encontrada en una plántula infectada con *P. cinnamomi* (325 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{g}$ de raíz).

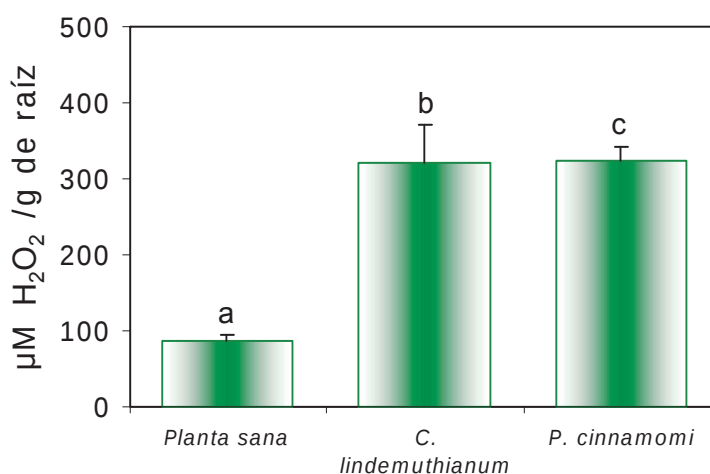


Figura 14. Producción de peróxido de hidrógeno en raíces de aguacate criollo tratadas con *C. lindemuthianum* o *P. cinnamomi* durante 4 días. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con $n=3$. Tukey; α 0.05. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Sin embargo, al observar la apariencia de ambos grupos de plántulas, se aprecia que (Fig. 15) mientras que las infectadas con *P. cinnamomi* muestran síntomas evidentes de enfermedad, las inoculadas con *C. lindemuthianum* no presentan ningún síntoma aparente de infección. Por lo tanto, aunque ambos microorganismos, un patógeno y un no patógeno de aguacate, inducen la acumulación de peróxido de hidrógeno, ésta acumulación puede tener un efecto distinto en cuanto al éxito del proceso de infección en cada caso, contribuyendo o no a la resistencia de las plántulas, no por su acumulación *per se* sino por su participación en diversos mecanismos relacionados con la defensa de las plántulas, que en un caso (el del patógeno) resultan no ser suficientes para la plántula, mientras que otro caso (el del no patógeno), resultan ser suficientes para evitar la infección.

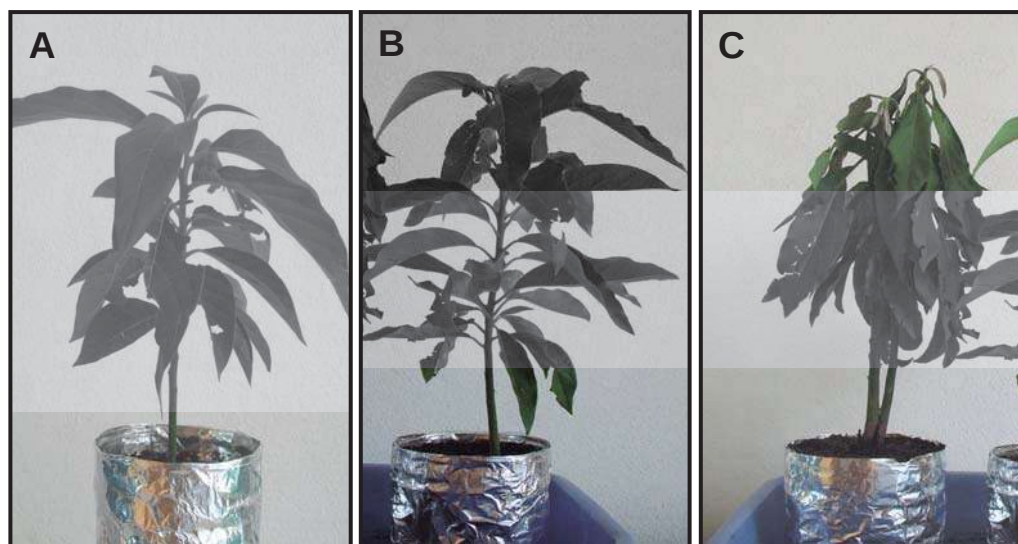


Figura 15. Plántulas inoculadas con un patógeno y un no patógeno de aguacate criollo. **A.** Plántula control sin inóculo. **B.** Plántula inoculada con *C. lindemuthianum*. **C.** Plántula inoculada con *P. cinnamomi*. Las fotografías se tomaron 4 días después de la inoculación.

Posteriormente se analizó el efecto del peróxido de hidrógeno cuantificado en una plántula inoculada con *C. lindemuthianum* durante 4 días, sobre el crecimiento de este hongo, para lo cual se realizó un ensayo *in vitro* en donde se puso a crecer el

hongo en presencia de 300 μM y 20 mM (considerada una alta concentración) de peróxido de hidrógeno. El resultado se comparó con el de *P. cinnamomi* al día 7 de crecimiento (Fig. 16).

El tratamiento con 300 μM de peróxido de hidrógeno no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de *C. lindemuthianum*, al igual que sucedió con *P. cinnamomi* ya que no hay diferencia significativa en su crecimiento con respecto al control con agua. Solo una concentración alta de 20 mM disminuyó su crecimiento en un 30% también con respecto al control con agua.

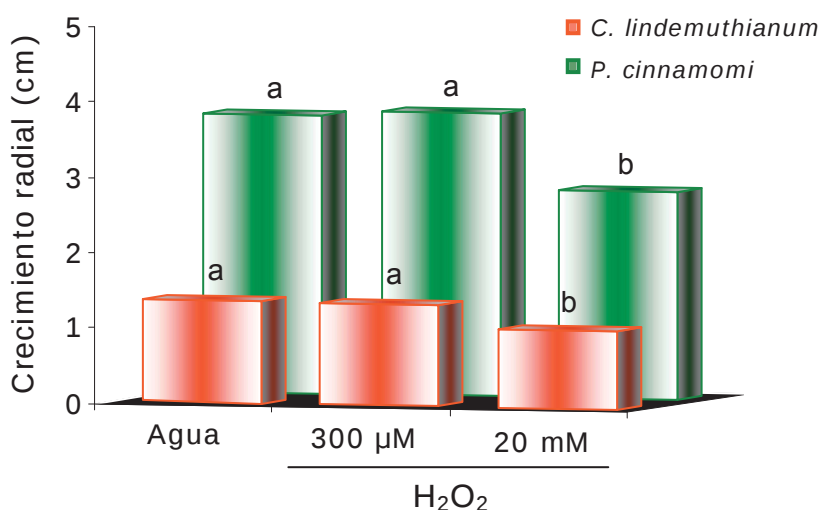


Figura 16. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento *in vitro* de *C. lindemuthianum* y *P. cinnamomi*. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con $n=3$. Tukey; α 0.05. Letras diferentes indican diferencia significativa.

El que la concentración de peróxido de hidrógeno acumulada en una plántula durante 4 días como resultado de la inoculación con estos microorganismos no tenga un efecto sobre su crecimiento *in vitro*, nos sugiere que probablemente estos microorganismos cuentan con un mecanismo que les permita contrarrestar el peróxido de hidrógeno producido por la plántula.

7.3. CATALASA EXTRACELULAR

Se ha reportado que algunos patógenos fúngicos como *Botrytis cinerea* secretan catalasa como un mecanismo de defensa para eliminar el peróxido de hidrógeno producido por la planta durante el proceso de infección (Mayer y col., 2001; Schouten y col., 2002), por lo que, a continuación se analizó la actividad de catalasa extracelular de *P. cinnamomi* y *C. lindemuthianum* crecidos *in vitro*.

El resultado mostró que ambos microorganismos son capaces de secretar catalasa (Fig. 17), aunque *P. cinnamomi* presentó una mayor actividad (187 Unidades/mg de proteína) que *C. lindemuthianum* (117 Unidades/mg de proteína).

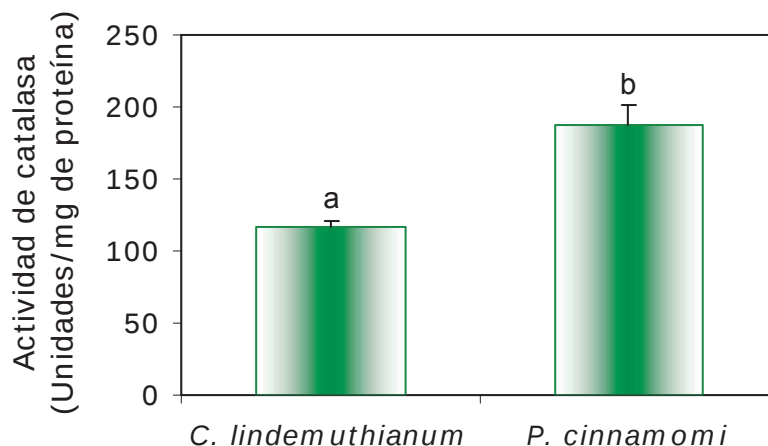


Figura 17. Actividad enzimática de catalasa extracelular de *P. cinnamomi* y *C. lindemuthianum*. Ambos microorganismos fueron crecidos durante 8 días en medio PDA líquido. La actividad fue medida por el consumo de peróxido de hidrógeno. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con $n=3$. Tukey; α 0.05. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Esta puede ser la razón por la que estos microorganismos son capaces de crecer en presencia de ciertos niveles de peróxido de hidrógeno.

7.4. PEROXIDASAS TOTALES

Otra de las funciones del peróxido de hidrógeno es servir como sustrato para algunas peroxidasas que participan en el reforzamiento de la pared celular al catalizar el último paso enzimático de la biosíntesis de lignina durante el ataque de patógenos. Con base en esto, se analizó la actividad de peroxidasas totales para determinar si parte del peróxido de hidrógeno acumulado en las plántulas podría estar siendo utilizado por estas enzimas para el proceso de lignificación.

La actividad de peroxidasas totales en el tejido de raíz se incrementó como resultado de la infección por *P. cinnamomi* (Fig. 18). Así, la plántula control de 0 d.p.i. presentó una actividad basal de 76 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, la cual se incrementó a los 2 d.p.i. a 106 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, alcanzando a los 4 d.p.i. una actividad de 133.3 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

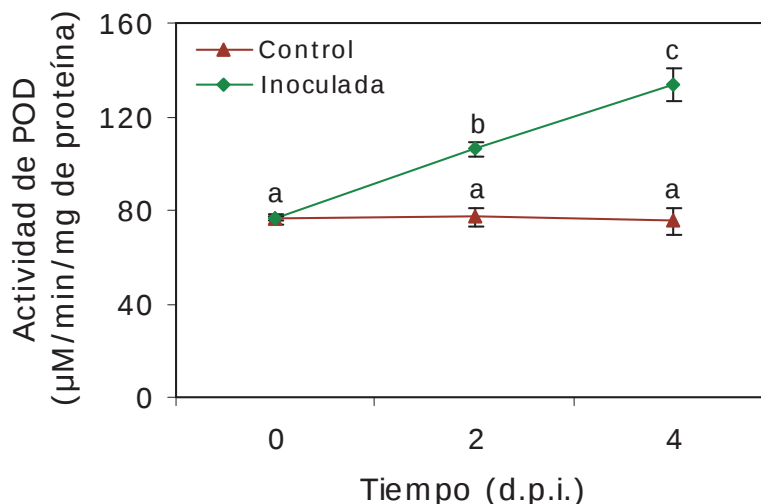


Figura 18. Actividad de peroxidasa en raíz de aguacate infectada con *P. cinnamomi*. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con $n=3$. Tukey; α 0.05. Letras diferentes indican diferencia significativa con respecto al control con agua.

Este resultado podría sugerir la participación de las peroxidasas en el proceso de lignificación, sin embargo, hacía falta cuantificar los niveles de lignina para sustentar esta posibilidad.

7.5. LIGNINA

A continuación se determinó la cantidad de lignina presente en la raíz de aguacate infectada con *P. cinnamomi*. El resultado mostró que la cantidad de lignina no cambia como resultado de la infección, ya que no se presentaron diferencias significativas entre la cantidad de lignina de la plántula control (1.4 unidades de absorbencia) y las plántulas infectadas durante 2 y 4 días (1.6 unidades de absorbencia en ambos casos) (Fig. 19).

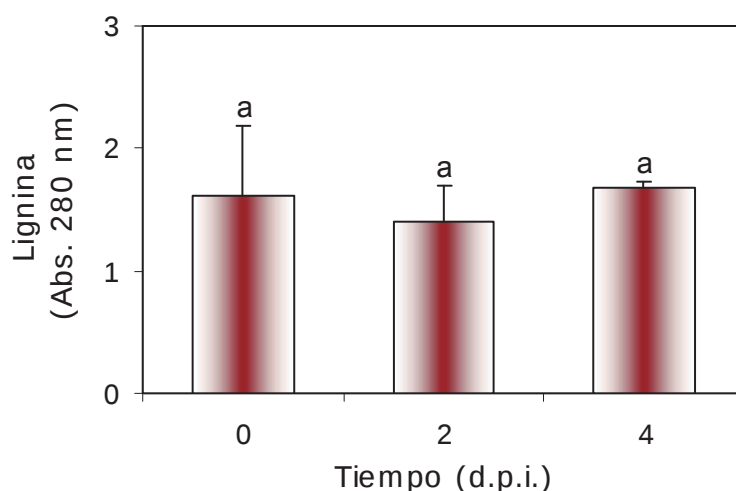


Figura 19. Cantidad de lignina en raíz de aguacate infectada con *P. cinnamomi* a diferentes tiempos. Medición por espectrofotometría a una λ 280 nm. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con $n=3$. Tukey; α 0.05. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Este resultado nos permite entonces sugerir que el incremento en la actividad de las peroxidasas totales no se debe a su participación en el proceso de lignificación, ya que la cantidad de dicho polímero no cambió como resultado de la infección.

7.6. EPICATEQUINA

Por otra parte, se ha reportado que la epicatequina participa en la resistencia de los frutos de aguacate al ataque post-cosecha por *Colletotrichum gloeosporioides*. Tomando en cuenta esto, se prosiguió con la determinación de la concentración de epicatequina en la raíz de aguacate criollo infectada por *P. cinnamomi*.

La infección por *P. cinnamomi* provocó una disminución en la cantidad de epicatequina presente en la raíz (Fig. 20), la cual pasó de una concentración basal en la plántula control de 264.2 $\mu\text{g/g}$ de raíz, a 169.8 $\mu\text{g/g}$ de raíz a los 2 d.p.i. y finalmente a 84.7 $\mu\text{g/g}$ de raíz a los 4 d.p.i.

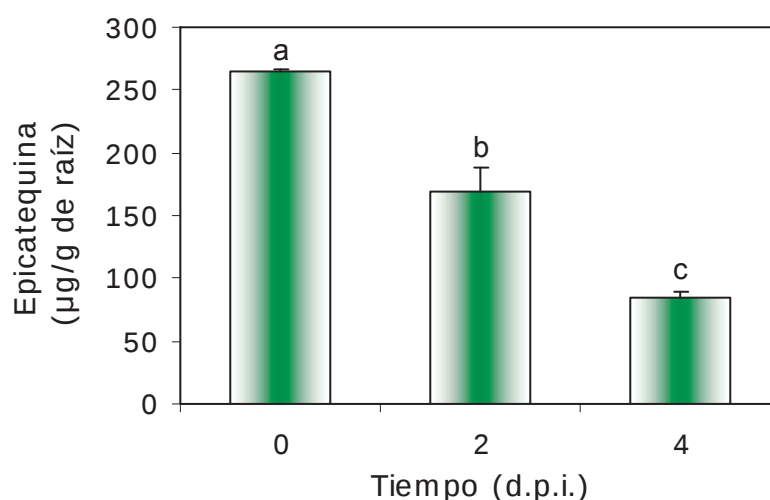


Figura 20. Concentración de epicatequina en raíz de aguacate infectada por *P. cinnamomi*. Medición por espectrofotometría a una λ 279 nm. Los datos representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes con $n=3$. Tukey; α 0.05. Letras diferentes indican diferencia significativa.

Considerando que una de las propuestas acerca de la participación de la epicatequina en la resistencia de los frutos de aguacate al ataque por *C. gloeosporioides* es a través de la inhibición de algunas enzimas provenientes de este patógeno, entonces la disminución en la concentración de epicatequina en la raíz de aguacate infectado con *P. cinnamomi*, podría implicar que este patógeno no se enfrente con esta barrera durante el proceso de infección de su hospedero.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo la inoculación de plántulas de aguacate criollo con micelio de *P. cinnamomi* provocó síntomas de infección tanto en la parte aérea como en las raíces de las plántulas utilizadas. Al respecto Van der Merwe y col. (1990) mencionan, que las inoculaciones con micelio pueden ser tan efectivas en el desarrollo de infecciones que las causadas por zoosporas de *P. cinnamomi*, lo cual coincide con lo observado en nuestro sistema. A los 4 días después de la inoculación, las plántulas manifestaron un marchitamiento severo en toda la parte aérea (Fig. 8), el cual es un síntoma característico de la muerte descendente del aguacate causada por *P. cinnamomi*, por lo que éste se estableció como el tiempo máximo de incubación. Se incluyó un tiempo de 2 días post-inoculación (d.p.i.) que representó una etapa intermedia entre una plántula sana y una enferma, en la cual aparecieron las primeras lesiones necróticas en el tejido de la raíz, lo cual coincide con lo reportado por Phillips y col. en 1987, quienes mencionan que la inoculación de raíces de aguacate cultivar Duke 7 con el mismo patógeno resultó en la aparición de lesiones en un periodo de 24 a 48 horas después de la inoculación. En el presente trabajo, como un efecto de la infección por *P. cinnamomi* durante 4 días, una importante proporción del tejido de las raíces absorbentes adquirió un color oscuro debido a la necrosis provocada por el patógeno (Fig. 9). Al respecto, Phillips y colaboradores (1987) reportan que a diferencia de las células del tejido de raíz sana, las del tejido necrosado presentan una acumulación de taninos y fenoles, característica que se discutirá más adelante. Por último, el análisis microscópico del tejido de raíz infectado mostró un abundante crecimiento de micelio dentro de él, lo cual corroboró la presencia del oomiceto (Fig. 10). De este modo, el marchitamiento severo en la parte aérea, el oscurecimiento de las raíces absorbentes y la colonización del tejido por el micelio, nos permitió relacionar los síntomas de la enfermedad con la infección por *P. cinnamomi*.

Con respecto al análisis de la respuesta oxidativa del aguacate criollo ante la infección por *P. cinnamomi*, la inoculación de las plántulas indujo un incremento en la

producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) cuantificadas en la raíz, que fueron el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo como peroxidación de lípidos (Fig. 11). Esto sugiere la activación de los mecanismos de defensa de las plántulas, ya que el tejido responde a la presencia del oomiceto acumulando ERO. Esta respuesta denominada explosión oxidativa ha sido ampliamente reportada en otros sistemas y constituye uno de los primeros eventos que ocurren en las plantas en respuesta al ataque de patógenos (Baker y Orlandi, 1995; Levine y col., 1994). En este sentido, Beno-Moualem y Prusky (2000) reportaron que la infección de frutos de aguacate cv. Fuerte por *C. gloeosporioides* induce la producción de ERO, en particular, anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Del mismo modo, la infección del tabaco por *Sclerotinia sclerotiorum* provocó un incremento en los niveles de ERO (Walz y col., 2008).

Además de las ERO por sí mismas, se ha sugerido que muchos de los productos oxigenados de los ácidos grasos participan en la señalización en plantas (Farmer, 1994). Estudios en radículas e hipocotilos de frijol soya indican que los productos de la peroxidación lipídica actúan como un detonador de la producción de la fitoalexina gliceolina (Degousée y col., 1994). Se ha sugerido que los patógenos necrótrofos usan las fuerzas oxidativas para atacar, invadir y destruir los tejidos vegetales. En este sentido, se ha reportado que la peroxidación de lípidos se incrementa en etapas tempranas del desarrollo de la infección causada por *Drechslera avenae* y *D. siccans* en la avena (von Gönner y Schlösser, 1993). Esto coincide con el incremento en la peroxidación de lípidos como resultado de la infección del aguacate por *P. cinnamomi* en este trabajo (Figura 11C).

Actualmente es ampliamente aceptado que el peróxido de hidrógeno está involucrado en un gran número de procesos en las plantas, que incluyen cascadas de señalización (Neill y col., 2002), respuestas a patógenos (Orozco-Cárdenas y col., 2001; Kachroo y col., 2003), muerte celular programada (Levine y col., 1994), entre otros. Sin embargo, a pesar de su importancia, existen muy pocos estudios acerca de los niveles de ésta ERO presentes en las plantas bajo condiciones normales, y los

que existen, varían en varios órdenes de magnitud, aún en una misma especie bajo condiciones similares (Cheeseman, 2006). Al respecto, Møller y colaboradores (2007) reportan que la concentración de peróxido de hidrógeno en los tejidos vegetales se encuentra en un rango de micromolar a milimolar bajo, dependiendo del compartimento. En el presente trabajo, la concentración de peróxido de hidrógeno en una plántula sana fue de $87.5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{g.p.f.}$ de raíz (Fig. 11B), la cual es cercana a la reportada en las hojas del pasto azul de Kentucky (*Poa pratensis*) con $60 \mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{g.p.f.}$ (He y col., 2005).

A los dos días post-inoculación, la raíz de aguacate criollo presentó una acumulación de peróxido de hidrógeno de poco más de 2 veces con respecto a una raíz sana. Esto coincide en tiempo con lo reportado en discos de hoja de frijol infectado con *Botrytis cinerea*, en los que no se detectó peróxido de hidrógeno sino hasta 48 horas después de la inoculación, cuando la infección ya se extendía rápidamente (Bestwick y col., 1997).

Una fuente de ERO podría estar representada por radicales de oxígeno derivados del patógeno mismo, *P. cinnamomi*. Algunos patógenos son capaces de producir ERO a través de varios mecanismos (von Tiedemann, 1997; Deighton y col., 1999; Mayer y col., 2001). Se ha reportado que *Botrytis cinerea* produce anión superóxido en las puntas de las hifas, así como peróxido de hidrógeno luego de haber penetrado los tejidos de su hospedero (Schouten y col., 2002; Tenberge y col., 2002; Govrin y Levine, 2000). Del mismo modo, Able y colaboradores (2003) reportaron la producción de ERO (anión superóxido) por los patógenos necrótrofos *Pyrenophora teres* y *Rhynchosporium secalis* como factores de patogenicidad, en ausencia de su planta hospedera, la cebada. Así mismo, se ha reportado que *Botrytis cinerea* produce peróxido de hidrógeno durante la infección del tomate (van der Vlugt-Bergmans y col., 1997). Recientemente, se describió un gen que codifica para una glucosa oxidasa en *B. cinerea*, el cual se induce por estrés oxidativo. También se aisló un gen de *Aspergillus nidulans* que codifica para una NADPH-oxidasa involucrada en la generación de ERO (Lara-Ortiz y col., 2003; Rolke y col., 2004). Sin

embargo, a diferencia de estos reportes, en el presente trabajo, no se detectó la producción de peróxido de hidrógeno en *P. cinnamomi* en ausencia de su hospedero (Fig. 12), lo cual nos sugiere entonces que el peróxido de hidrógeno cuantificado en las plántulas inoculadas proviene de las plántulas y que se acumula como resultado de su interacción con el oomiceto. No se descarta la posibilidad de que la técnica empleada para la cuantificación del peróxido de hidrógeno no haya sido lo suficientemente fina para detectar su producción en el patógeno, ya que es empleada para tejidos vegetales. Sin embargo, hasta ahora, a nuestro conocimiento, no se aislado ni caracterizado ninguna enzima productora de ERO en *P. cinnamomi*.

Aunque la infección por *P. cinnamomi* en raíces de aguacate indujo una acumulación de peróxido de hidrógeno, el desarrollo del patógeno aparentemente no se vió influenciado *in vivo*. Para sustentar ésta observación se analizó el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi*. El tratamiento con 300 μ M de peróxido de hidrógeno, que fue la cantidad cuantificada en las plántulas inoculadas durante 4 días, no tuvo efecto sobre su crecimiento (Fig. 13), siendo éste muy similar al del control con agua, por lo que, aunque el *P. cinnamomi* induce la acumulación de peróxido de hidrógeno en las raíces de las plántulas, la cantidad que éstas acumulan no afecta su crecimiento, al menos en un sistema *in vitro*. Por su parte, la concentración de 20 mM de peróxido de hidrógeno tuvo un efecto de disminución sobre el crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi* en un 30% con respecto al control con agua, lo cual coincide con lo reportado para otro patógeno necrótrofo, *Botrytis cinerea*, que es capaz de tolerar niveles de hasta 100 mM de peróxido de hidrógeno *in vitro* (Shouten y col., 2002). En cambio, en el necrótrofo *Sclerotinia sclerotiorum*, ésta misma concentración (20 mM) de peróxido de hidrógeno inhibe por completo su crecimiento *in vitro* (Walz y col., 2008).

Tomando la producción de peróxido de hidrógeno como un indicador de la producción de ERO en general, y con el fin de comparar su producción en las raíces de aguacate criollo inoculadas con un no patógeno de aguacate, que fue *C. lindemuthianum*, se encontró que éste hongo también indujo la acumulación de

peróxido de hidrógeno en una cantidad muy similar a la inducida por *P. cinnamomi* a los 4 días post-inoculación (Fig. 14). Al observar la apariencia de ambos grupos de plántulas (Fig. 15), fue evidente que a diferencia de las plántulas inoculadas con *P. cinnamomi*, las plántulas inoculadas con *C. lindemuthianum* no presentaron ningún síntoma aparente de infección, por lo que, la acumulación de peróxido de hidrógeno es un indicador de que la planta está respondiendo al intento de invasión de *C. lindemuthianum*, y que dicha acumulación puede ser un factor importante para impedir su establecimiento. Por lo tanto, aunque ambos microorganismos, un patógeno y un no patógeno de aguacate, inducen la acumulación de peróxido de hidrógeno, ésta acumulación puede tener un efecto distinto en cuanto al éxito del proceso de infección en cada caso, contribuyendo o no a la resistencia de las plántulas, no por su acumulación *per se* sino por su participación en diversos mecanismos relacionados con la defensa de las plántulas, que en un caso (el del patógeno) resultan no ser suficientes para la plántula, mientras que otro caso (el del no patógeno), resultan ser suficientes para evitar la infección.

En cuanto al efecto de la cantidad de peróxido de hidrógeno cuantificada en las plántulas inoculadas durante 4 días (300 μ M) sobre el crecimiento *in vitro* de *C. lindemuthianum*, se encontró que éste tampoco tuvo un efecto sobre su crecimiento, lo cual sugiere que tanto *P. cinnamomi* como *C. lindemuthianum* cuentan con algún mecanismo que les permite crecer en presencia de ciertos niveles de peróxido de hidrógeno. Tomando en cuenta que las catalasas se han asociado a la resistencia de algunos fitopatógenos al peróxido de hidrógeno producido por las plantas en respuesta a su ataque (Levine y col., 1994; Beltrán-García y col., 2006), se midió la actividad de catalasa extracelular en ambos microorganismos, crecidos *in vitro*, encontrando que los dos son capaces de secretar la enzima, lo cual puede explicar el hecho de que pueden crecer en presencia de ciertos niveles de peróxido de hidrógeno. Este resultado apoya la participación de las catalasas en contrarrestar los niveles de peróxido de hidrógeno durante la interacción con las raíces de aguacate. Cabe destacar que *P. cinnamomi* presentó poco mas del 60% de actividad que *C. lindemuthianum*, por lo que, esto quizá le permita a *P. cinnamomi* contrarrestar de

manera mas eficiente al peróxido de hidrógeno y así lograr invadir los tejidos de su hospedero, lo cual no logra *C. lindemuthianum*. Este resultado de secreción de catalasas coincide con varios reportes que involucran a hongos fitopatógenos. En *Fusarium decemcellulare* se observó que un incremento en la actividad de catalasa se asocia a una resistencia al estrés oxidativo. Si el patógeno es capaz de prevenir el daño oxidativo por el peróxido de hidrógeno, es probable que sea mas resistente y por ende mas agresivo, logrando la colonización y el desarrollo de la enfermedad (Medentsev y col., 2002). Beltrán-García y colaboradores (2006) mencionan que los hongos fitopatógenos generalmente presentan varias catalasas en comparación con hongos que no lo son, sin embargo, no establecen si están asociadas con estados patogénicos o simplemente a estados de desarrollo. En este sentido, existen reportes que apoyan el primer caso. Así, *Claviceps purpurea* secreta catalasa tanto en cultivos *in vitro* como durante su interacción con el centeno (Garre y col., 1998); *Botrytis cinerea* lo hace durante su interacción con el tomate y el frijol (Mayer y col., 2001; Schouten y col., 2002); y *Blumeria graminis* lo hace durante su interacción con la cebada (Zhang y col., 2004).

Además de la explosión oxidativa, el peróxido de hidrógeno participa en el reforzamiento de la pared celular, específicamente, en el proceso de lignificación, en donde sirve como sustrato a algunas peroxidasas que catalizan el último paso enzimático de la biosíntesis de lignina. Al medir de actividad de peroxidasas totales en las raíces de aguacate criollo inoculadas con *P. cinnamomi*, se encontró que ésta se incrementó de una manera dependiente del tiempo de inoculación. Este resultado concuerda con lo reportado por Yedidia y colaboradores en 1999, en donde la inoculación de raíces de pepino con *Trichoderma harzianum*, hongo saprofitico que también induce las respuestas de defensa, indujo un incremento notable en la actividad de peroxidasas a las 48 horas despues de la inoculación. El incremento en la actividad de peroxidasas totales correlacionó con la acumulación de peróxido de hidrógeno en las raíces de aguacate infectadas, lo cual nos sugería su participación en el proceso de lignificación. Con frecuencia se reporta una relación cuantitativa entre la actividad de peroxidasas y la lignificación (McDougall y col., 1994; Barceló,

1995; Christensen y col., 1998), sin embargo, en este trabajo, al determinar la cantidad de lignina en las raíces inoculadas, se encontró que ésta no cambió como resultado de la infección por *P. cinnamomi*, con lo cual se concluye que el incremento en la actividad de peroxidasas totales no se debe a su participación en el proceso de lignificación, sino a otra razón. Tomando en cuenta que la medición de la actividad incluye a todo tipo de peroxidasas, y que la baja especificidad de sustrato *in vitro* así como la existencia de muchas isoenzimas dificulta el definir funciones específicas a peroxidasas individuales, una posible explicación del incremento en la actividad de peroxidasas totales es que algunas de ellas, conocidas como NADH oxidasas, que son peroxidasas que reducen el oxígeno molecular usando al NADH como donador de electrones para producir peróxido de hidrógeno (Bolwell y col., 1995; Bolwell, 1999), estén contribuyendo a la acumulación de dicha ERO como parte de las respuestas de defensa del aguacate ante la infección por *P. cinnamomi*.

Por otra parte, se ha reportado que la epicatequina, un antioxidante de tipo flavonoide, participa en la resistencia de los frutos de aguacate cv. Fuerte al ataque por *Colletotrichum gloeosporioides* (Guetsky y col., 2005). Tomando en cuenta esto, se determinó la concentración de epicatequina en las raíces de aguacate criollo infectadas con *P. cinnamomi*, encontrando que ésta disminuye como resultado de la infección. La raíz de una plántula sana presentó 264 µg/g.p.f., concentración que disminuyó a 84.7 µg/g.p.f. a los 4 días después de la inoculación (Fig. 20). Hasta nuestro conocimiento, éste es la primera vez que se reporta la concentración de epicatequina en la raíz de una planta durante su interacción con un patógeno. Al respecto, la mayor parte de los reportes existentes son en referencia a los frutos de aguacate, en particular, a su pericarpo, en donde se ha reportado que la concentración de epicatequina se encuentra en un rango de 400 a 2,000 µg/g.p.f. en frutos inmaduros y que disminuye a 12-15 µg/g.p.f. en frutos maduros que expresan síntomas de antracnosis causada por *C. gloeosporioides* (Prusky y col., 1985). Por su parte, Wattad y colaboradores (1994) reportan una concentración de 350 µg/g.p.f. en frutos inmaduros, que es la más baja que se ha reportado. En un estudio más reciente, Guetsky y colaboradores (2005) reportan una concentración de 998

$\mu\text{g/g.p.f.}$ en frutos inmaduros, la cual disminuye a $153 \mu\text{g/g.p.f.}$ en frutos maduros sanos, llegando hasta $1.5 \mu\text{g/g.p.f.}$ de epicatequina en frutos maduros enfermos por antracnosis. Aunque se desconoce la distribución de la epicatequina en la planta de aguacate, nuestro resultado, aunado a los reportes antes mencionados, hace evidente que este flavanol está presente en cantidades considerables tanto en los frutos como en las raíces de plantas sanas. En este sentido, Forrest y Bendall (1969) analizaron la distribución de polifenoles en la planta de té (*Camellia sinensis* L.), en donde reportaron que la epicatequina es la única catequina ubícua en la planta. Así mismo, Griffiths (1958) en su estudio de los flavonoides del árbol del cacao (*Theobroma cacao* L.), también reportó que solo la epicatequina y dos leucocianidinas persisten, en diversos grados, en todos los tejidos. Sobre la base de estos estudios de distribución, se ha postulado que los flavanoles tienen una importante función(es) que llevar a cabo en las plantas. Se ha sugerido que los flavanoles son los únicos flavonoides que pueden polimerizarse. Así, las formas monoméricas de la catequina y la epicatequina son capaces de polimerizarse para dar lugar a la formación de dímeros, trímeros, oligómeros y finalmente polímeros, conocidos como taninos condensados o proantocianidinas (Schofield y col., 2001; Dixon y col., 2005). Se ha reportado que estos polímeros se depositan en los tejidos muertos, sujetos a infección, en donde protegen a las células del comienzo de la necrosis (Dixon y col., 2005). Como se mencionó al inicio de la presente discusión, en un análisis histológico del tejido de raíz de aguacate cv. Duke 7 infectado por *P. cinnamomi*, llevado a cabo por Phillips y colaboradores (1987), se reporta la presencia de altos niveles de taninos y fenoles en las células del tejido infectado, a diferencia del tejido de raíz de las plantas control que no presentaba esta característica. En nuestro trabajo, el oscurecimiento del tejido de la raíz como resultado de la infección por *P. cinnamomi* podría ser en parte el resultado de la acumulación de estos compuestos en las células. Si así fuera, entonces el resultado de la disminución en la concentración de epicatequina en el tejido de raíz infectado podría deberse a que este flavanol está siendo utilizado para la formación de los taninos condensados.

Una de las propuestas acerca de la participación de la epicatequina en la resistencia de los frutos de aguacate al ataque por *C. gloeosporioides*, es a través de la inhibición de algunas enzimas provenientes del patógeno, tales como una endopoligalacturonasa (Prusky y col., 1989) y una pectato liasa (Wattad y col., 1994). Sin embargo, Guetsky y colaboradores (2005) reportaron que *C. gloeosporioides* es capaz de secretar una lacasa que metaboliza a la epicatequina, reduciendo su concentración en el tejido, lo cual contribuye a la patogenicidad del hongo en los frutos de aguacate. Las lacasas son oxidasas que se encuentran ampliamente distribuidas en los hongos y que están involucradas en la biotransformación de compuestos aromáticos (Messerschmidt, 1997; Edens y col., 1999; Kurisawa y col., 2003). Las lacasas fúngicas juegan un papel importante en la patogenicidad en las plantas al detoxificar compuestos antifúngicos y taninos en el hospedero (Marbach y col., 1984; Pezet y col., 1991; Sbaghi y col., 1996; Adrian y col., 1998). Considerando esto, la disminución en la concentración de epicatequina en la raíz de aguacate infectada con *P. cinnamomi*, implica una barrera menos que enfrentar para el patógeno durante el proceso de infección de su hospedero, y si esta disminución se debe a su polimerización en taninos, probablemente el patógeno tenga la capacidad de metabolizarlos, a través de la secreción de una enzima. Sin embargo, esta posibilidad queda como mera especulación ya que hasta ahora se desconoce si *P. cinnamomi* sea capaz de secretar una enzima con función similar a la de *C. gloeosporioides*.

En otro sentido, el decremento en la concentración de epicatequina correlaciona con el incremento en la producción de peróxido de hidrógeno. Considerando la función de la epicatequina como antioxidante, su disminución contribuye a la permanencia de niveles elevados del oxidante en el tejido infectado. Govrin y Levine (2000) reportaron que la producción de ERO, que antecede a la muerte celular hipersensible, facilita la infección de patógenos necrótrofos como *Botrytis cinerea* o *Sclerotinia sclerotiorum* en *Arabidopsis*. Ellos mostraron que la infiltración de hojas de *Arabidopsis* con una mezcla de glucosa oxidasa y glucosa, que produce peróxido de hidrógeno, antes de la inoculación con los patógenos, llevó

a una mayor colonización del tejido infiltrado en comparación con el tejido control no infiltrado. Así mismo, Able (2003) reportó que la infiltración de hojas de cebada con la enzima antioxidante catalasa, que disminuye el nivel de peróxido de hidrógeno, antes de la inoculación con *Rhynchosporium secalis* o *Pyrenophora teres* limitó la extensión de la muerte celular así como el crecimiento de los patógenos *in planta*. Aunque en el presente trabajo no se evaluó el efecto del peróxido de hidrógeno sobre el grado de formación de las lesiones *in planta*, los resultados tampoco descartan la posibilidad de que la permanencia de niveles elevados de peróxido de hidrógeno en las raíces infectadas podría facilitar la infección por el necrótrofo *P. cinnamomi*, al disparar la muerte celular hipersensible.

Además de la respuesta oxidativa inducida *per se* por la infección de *P. cinnamomi* en el aguacate criollo, se ha reportado que este patógeno secreta dos elicinas denominadas α - y β -cinnamomina (Pernollet y col., 1993; Perez y col., 1999). Se sabe que las elicinas son proteínas acareadoras de esteroides (Mikes y col., 1998; Boissy y col., 1999), secretadas por oomicetos del género *Phytophthora* (Ricci y col., 1989), que sirven como estimuladores de las respuestas de defensa del hospedero. Se ha reportado que inducen la necrosis en hojas de tabaco (Rustérucci y col., 1996), así como la producción de ERO en células en suspensión de tabaco (Bourque y col., 1998). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes en donde se aborde la participación específica de las elicinas de *P. cinnamomi* en el proceso de infección *in planta*, lo cual abre la posibilidad de estudiar la participación de estas proteínas durante la interacción *P. cinnamomi* – *Persea americana* (aguacate) en un futuro.

IX. CONCLUSIÓN

La respuesta oxidativa es evadida por *Phytophthora cinnamomi* durante la infección del aguacate criollo.

X. LITERATURA CITADA

- Abeles, F. B., L. J. Dunn, P. Morgens, A. Callahan, R. E. Dinterman y J. Schmidt.** 1988. Induction of 33-kDa and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 87:609-615.
- Able, A. J.** 2003. Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma.* 221:137-143.
- Able, A. J., D. I. Guest y M. W. Sutherland.** 1998. Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. *Plant Physiol.* 117:491-499.
- Adam, A., T. Farkas, G. Somlyai, M. Hevesi y Z. Kiraly.** 1989. Consequence of O_2^- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34:13-26.
- Adrian, M., H. Rajaei, P. Jeandet, J. Veneau y R. Bessis.** 1998. Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. *Phytopathol.* 88:472-476.
- Allan, A. C. y R. Fluhr.** 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9:1559-1572.
- Alscher, G. R. y J. L. Hess.** 1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Alvarez, M. E., R. I. Pennel, P. Meijer, A. Ishikawa, R. A. Dixon y C. Lamb.** 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell.* 92:773-784.
- Amaya, I., M. A. Botella, M. Calle, M. I. Medina, A. Heredia, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, M. A. Quesada y V. Valpuesta.** 1999. Improved germination under osmotic stress or tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.* 457:80-84.
- Anónimo.** 2006. Management of *Phytophthora cinnamomi* for Biodiversity Conservation in Australia. Invasive species report. Part 2 - National Best Practice Guidelines/Appendix 1. Department of the Environment and Heritage.

-
-
- 5 pp. Disponible en URL:
<http://www.environment.gov.au/biodiversity/invasive/publications/p-cinnamomi/pubs/appendix1.pdf> (Accesada en Julio de 2008).
- Apel, K. y H. Hirt.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Attard, A., M. Gourgues, E. Galiana, F. Panabieres, M. Ponchet y H. Keller.** 2008. Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accetuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. nicotianae* Breda de Haan). *J. Plant Physiol.* 165:83-94.
- Baker, C. J. y E. W. Orlandi.** 1995. Active oxygen in plant/pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:299-321.
- Baker, C. J. y E. W. Orlandi.** 1999. Active oxygen and pathogenesis in plants. *Plant microbe Interactions.* Pp. 81-119.
- Barceló, A. R.** 1995. Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma.* 186:41-44.
- Barrett, D. M. y C. Gonzalez.** 1994. Activity of softening enzymes during cherry maturation. *J. Food Sci.* 59(3):574-577.
- Beltrán-García, M. J., T. Ogura-Fujii, G. Manzo-Sánchez y C. Arias-Castro.** 2006. Catalasas de hongos fitopatógenos: ¿Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas?. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 24:50-58.
- Beno-Moualem, D. y D. Prusky.** 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathol.* 90(5):553-559.
- Ben-Ya'acov, A.** 2002. Portainjertos de Palto. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Seminario Internacional: Selección y Uso de Portainjertos y Nuevas Variedades de Palto. Quillota, 3 de Diciembre.
- Bernards, M. A., W. D. Fleming, D. B. Llewellyn, R. Priefer, X. Yang, A. Sabatino y G. L. Plourde.** 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol.* 121:135-146.

-
-
- Bestwick, C.S., I. Brown, M. H. R. Bennett y J. W. Mansfield.** 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Cell*. 9:209-221.
- Boerjan, W., J. Ralph y M. Baucher.** 2003. Lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Biol.* 54:519-546.
- Boissy, G., M. O'Donohue, O. Gaudemer, V. Perez, J.-C. Pernollet y S. Brunie.** 1999. The 2.1Å structure of an elicitin – ergosterol complex: a recent addition to the sterol carrier protein family. *Protein Science*. 8:1191-1199.
- Bolwell, G. P.** 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:287-294.
- Bolwell, G. P., L. V. Bindschedler, K. A. Blee, V. S. Butt, D. R. Davies, S. L. Gardner, C. Gerrish y F. Minibayeva.** 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three – component system. *J. Exp. Bot.* 53:1367-1376.
- Bolwell, G. P. y P. Wojtaszek.** 1997. Mechanism for generation of reactive oxygen species in plant defense - a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51:347-366.
- Bolwell, G. P., V. S. Butt, D. R. Davies y A. Zimmerlin.** 1995. The origin of oxidative burst in plants. *Free Radic. Res.* 23:517-532.
- Bors, W. C. y K. Stettmaier.** 1997. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*. 6:399-402.
- Bors, W. C., W. Heller, C. Michel y K. Stettmaier.** 1996. Flavonoids and polyphenols: Chemistry and biology. En: *Handbook of Antioxidants*. Eds. E. Cadenas and L. Packer. Marcel Dekker Inc. New York. Pp 409-466.
- Bourque, S., M. Ponchet, M.-N. Binet, P. Ricci, A. Pugin y A. Lebrun-García.** 1998. Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiol.* 118:1317-1326.
- Bradley, D. J., P. Kjellbom y C. J. Lamb.** 1992. Elicitor and wound induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell*. 70:21-30.
-
-

-
-
- Bruce, R. J. y C. A. West.** 1989. Elicitation of biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.* 91:889-897.
- Buchanan, B., W. Gruissem y R. L. Jones.** 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, EUA. Pp. 1133-1134, 1189-1191.
- Cadenas, E.** 1998. Mechanism of antioxidant activity. *Biofactors.* 6:391-397.
- Cahill, D. M. y A. R. Hardham.** 1994. Exploitation of zoospore taxis in the development of a novel dipstick immunoassay for the specific detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathol.* 84:193-200.
- Calderón, M. C.** 2006. Monografía de la cadena agroalimentaria de aguacate en el estado de Puebla. Disponible en: URL: <http://www.sdr.gob.mx/beta1/contenidos/CadenasAgropecuarias/docs/439148.235.138.1326-07-2007 MONOGRAFIA%20DE%20AGUACATE.pdf> (Accesada en Agosto de 2008).
- Campa, A.** 1991. Biological roles of plant peroxidases: known and potencial functions. En: J. Evers, K. Evers, M. B. Grisham, eds. *Peroxidase in Chemistry and Biology.* Vol 2. CRS Press. Boca Raton, Florida. Pp. 26-49.
- Campbell, M. M. y R. R. Sederoff.** 1996. Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol.* 110:3-13.
- Chamnongpol, S., H. Willekens, W. Möder, C. Langebartels, H. Sandermann, M. van Montagu, D. Inzé y W. van Camp.** 1998. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:5818-5823.
- Cheeseman, J. M.** 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under normal conditions. *J. Exp. Bot.* 57(10):2435-2444.
- Chen, C. Q., R. R. Belanger, N. Benhamou y T. C. Paulitz.** 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56:13-23.
-
-

-
-
- Chittoor, J. M., J. E. Leach y F. F. White.** 1999. En: Pathogenesis – related proteins in plants. Datta, S. K. y S. Muthukrishnan. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp. 171-193.
- Christensen, J. H., G. Bauw, K. G. Welinder, M. van Montagu y W. Boerjan.** 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol.* 118:125-135.
- Cipollini, F. D.** 1998. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. *Am. J. Bot.* 85:1586-1591.
- Coffey, M. D.** 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. En: Plant diseases of fruit crops. Kumar, J., H. S. Chaube, U. S. Singh y A. N. Mukhopadhyay. Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, N. J. 456 pp.
- COMA (Comisión Michoacana del Aguacate).** 2005.
- Cova, S. R.** 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. México. Pp. 81-83.
- Dawson, J. H.** 1988. Probing structure-function relations in hemecontaining oxygenases and peroxidases. *Science.* 240:433-439.
- De Gara, L., C. Paciolla, M. C. De Tullio, M. Motto y O. Arrigoni.** 2000. Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiol. Plant.* 109:7-13.
- Degousée, N., C. Triantaphylidés y J.-L. Montillet.** 1994. Involvement of oxidative processes in the signalling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* 104:945-952.
- Deighton, N., I. Muckenschnabel, B. A. Goodman y B. Williamson.** 1999. Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*. *Plant Journal*, 20:485-492.
- Divon, H. H. y R. Fluhr.** 2007. Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 266:65-74.
- Dixon, R. A.** 1986. The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 61:239-291.
-
-

-
-
- Dixon, R. A., D.-Y. Xie y S. B. Sharma.** 2005. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?. *New Phytologist*. 165:9-28.
- Doke, N.** 1983. Generation of superoxide anions by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of the hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23:359-367.
- Doke, N. e Y. Ohashi.** 1988. Involvement of an O_2^- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32:163-175.
- Dunford, B. H.** 1999. Heme peroxidases. New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto. John Wiley and Sons.
- Edens, W. A., T. Q. Goins, D. Dooley y J. M. Henson.** 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3071-3074.
- Egea, C., A. S. Ahmed, M. Candela y M. E. Candela.** 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cultures by *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 158:151-158.
- Elstner, E. F. y A. Heupel.** 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta*. 130:175-180.
- Erwin, D. C. y O. K. Ribeiro.** 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul, MN. 562 pp.
- Esterbauer, H., H. Zollner y R. J. Schaur.** 1990. Aldehydes formed by lipid peroxidation: Mechanisms of formation, occurrence and determination. En: *Membrane Lipid Oxidation*. Vol. 1. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp. 239-283.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).** 2006. Disponible en: URL: <http://faostat.fao.org>
- Farmer, E. E.** 1994. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol. Biol.* 26:1423-1437.
- Forrest, G. I. y D. S. Bendall.** 1969. The distribution of polyphenols in the tea plant (*Camellia sinensis* L.) *Biochem. J.* 113:741-755.
-
-

-
-
- Foyer, C. H. y G. Noctor.** 2005. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 17(7):1866-1875.
- Fry, S. C.** 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:165-186.
- Gallegos, E. R.** 1983. Algunos aspectos del aguacate y su producción en Michoacán. Universidad Autónoma Chapingo. Grupo Editorial Gaceta, S.A. Chapingo, Estado de México. 317 pp.
- Garre, V., K. Tenberge y R. Eising.** 1998. Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection of rye: Putative role in pathogenicity and suppression of host defense. *Phytopathol.* 88(8):744-753.
- González, L. F. y M. C. Rojas.** 1999. Role of wall peroxidases in oat growth inhibition by DIMBOA. *Phytochem.* 50:931-937.
- Götesson, A., J. S. Marshall, D. A. Jones y A. R. Hardham.** 2002. Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:907-921.
- Govrin, E. M. y A. Levine.** 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*. 10:751-757.
- Gow, N. A. R., B. M. Morris y B. Reid.** 1992. The electrophysiology of root-zoospore interactions. En: *Perspective in Plant Cell Recognition* (Callow, J. A. y J. R. Green eds). Cambridge: Cambridge University Press. Pp. 173-192.
- Grant, J. J. y G. J. Loake.** 2000. Role of reactive oxygen intermediates y cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124:21-29.
- Griffiths, L. A.** 1958. Phenolic acids and flavonoids of *Theobroma cacao* L. Separation and identification by paper chromatography. *Biochem. J.* 70:120-125.
- Gross, G. G., C. Janse y E. F. Elstner.** 1977. Involvement of malate, monophenols, and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta*. 136:271-276.
-
-

-
-
- Guetsky, R., I. Kobiler, X. Wang, N. Perlman, N. Gollop, G. Avila-Quezada, I. Hadar y D. Prusky.** 2005. Metabolism of the epicatechin by laccase of *Colletotrichum gloeosporoides* and its effect on pathogenicity on avocado fruits. *Biochem. Cell Biol.* 95:1341-1348.
- Halliwell, B.** 1978. Lignin synthesis: The generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta.* 140:81-88.
- Halliwell, B. y J. M. C. Gutteridge.** 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Third edition. Oxford University Press. New York, USA. 21 pp.
- Hammond-Kosak, K. E. y J. D. Jones.** 1996. Resistance gene dependent plant defense responses. *Plant Cell.* 8(10):1773-1791.
- Hardham, A. R.** 2001. The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. *Aust. Plant Pathol.* 30:91-98.
- Hardham, A. R.** 2005. *Phytophthora cinnamomi.* *Mol. Plant Pathol.* 6:689-604.
- Haslam, P.** 1998. *Practical polyphenols: From structure to molecular recognition and physiological action.* Cambridge: Cambridge University Press. 412 pp.
- He, Y. L., Y. L. Liu, W. X. Cao, M. F. Huai, B. G., Xu y B. G. Huang.** 2005. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. *Crop Science.* 45:988-995.
- Higuchi, T.** 1985. Biosynthesis of lignin. En: Higuchi, T. Ed. *Biosíntesis and Biodegradation of Wood Components.* Academia Press. New York, USA. Pp. 141-160.
- Hippeli, S., I. Heiser y E. F. Elstner.** 1999. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: new insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37:167-178.
- Hiraga, S., K. Sasaki, H. Ito, Y. Oaki y H. Matsui.** 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42:462-468.
- Hückelhoven, R.** 2007. Cell-Wall Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:101-127.
-
-

-
-
- Hückelhoven, R. y K.-H. Kogel.** 2003. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance?. *Planta*. 216:891-902.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias).** 2006. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Campo Experimental Uruapan. Disponible en: URL: <http://www.inifap.gob.mx>
- Jorge, P. E. y C. A. P. Medina.** 2000. Pudrición Radicular o Muerte Descendente (*Phytophthora cinnamomi* Rands.) en plantaciones de aguacate (*Persea americana* Mill.). Hoja Divulgativa N° 4. REDFRUT. República Dominicana. Pp.1-4.
- Jovanovic, S. V., S. Steenken, M. Simic y Y. Hara.** 1998. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. En: *Flavonoids in Health and Disease*. Eds. Rice-Evans, C. y L. Packer. Marcel Dekker Inc. New York. Pp. 137-161.
- Kachroo, A., Z. He, R. Paktar, Q. Zhu, J. Zhong, D. Li, P. Ronald, C. Lamb y B. Chattoo.** 2003. Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic Research*. 12:577-586.
- Karni, L., D. Prusky, I. Kobiler, E. Bar-Shira y D. Kobiler.** 1989. Involvement of epicatechin in the regulation of lipoxygenase activity during activation of quiescent *Colletotrichum gloeosporioides* infections of ripening avocado fruits. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35:367-374.
- Keppler, L. D., C. J. Baker y M. M. Atkinson.** 1989. Active oxygen production during a bacteria induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. *Phytopathol.* 79:974-978.
- Knight, R. J.** 2002. History, distribution and uses. En: *Whiley, A. W., B. Schaffer y B. N. Wolstenholme. Avocado: Botany, production and uses.* CABI Publishing. Pp. 1-14.
- Kofink, M., M. Papagiannopoulos y R. Galensa.** 2007. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. *Eur. Food Res. Technol.* 225:569-577.
-
-

-
-
- Kumar, J., R. Hückelhoven, U. Beckhove, S. Nagarajan y K-H. Kogel.** 2001. A compromised *Mlo* pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathol.* 91:127-133.
- Kurisawa, M., J. E. Chung, H. Uyama y S. Kobayashi.** 2003. Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromol. Biosci.* 3:758-764.
- Kuzniak, E. y H. Urbanek.** 2000. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiol. Plantarum.* 22:195-203.
- Lagrimini, L. M.** 1999. The role of auxin metabolism. Abstract, Symposium on Plant Peroxidases. Ohio. Pp.17-22.
- Lai, Y. Z. y K. V. Sarkanen.** 1971. Isolation and structural studies. En: Sarkanen. K. V. Ed. *Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions.* Wiley-Interscience. New York. Pp. 165-240.
- Lamb, C. J., M. A. Lawton, M. Dron y R. A. Dixon.** 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack. *Cell.* 56:215-224.
- Lamb, C. J. y R. A. Dixon.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:251-275.
- Lara-Ortiz, T., H. Riveros-Rosas y J. Aguirre.** 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 50:1247-1255.
- Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon y C. Lamb.** 1994. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* 79:583-593.
- Lin, C. C. y C. H. Kao.** 2001. Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. *Plant and Soil.* 230:135-143.
- Low, P. S. y J. R. Merida.** 1996. The oxidative burst in plant defence: function and signal transduction. *Physiol. Plant.* 96:532-542.
- Mäder, M.** 1992. Compartmentation of peroxidase isoenzymes in plant cells. En: C. Penel, T. Gaspar, H. Greppin, eds. *Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and*
-
-

-
-
- Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects.
University of Geneva, Geneva. Pp. 37-46.
- Mäder, M., J. Ungemach y P. Schloss.** 1980. The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta* 147:467-470.
- Mäder, M. y V. Amberg-Fisher.** 1982. Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. I. Oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide and formation of hydrogen peroxide by cell wall peroxidase. *Plant Physiol.* 70:1128-1131.
- Marbach, I., E. Harel y A. M. Mayer.** 1984. Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochem.* 23:2713-2717.
- Mathews, C. K. y K. E. van Holde.** 2000. *Bioquímica*. 2ª edición. Mc. Graw Hill Interamericana. España. Pp. 608-609.
- Mathieu, Y., M.-A. Rouet-Mayer, H. Barbier-Brygoo y C. Lauriere.** 2002. Activation by fatty acids of the production of active oxygen species by tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.* 40:313-324.
- Mayer, A. M., R. C. Staples y N. L. Gil-ad.** 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochem.* 58:33-41.
- McDougall, G. J., D. Steward e I. M. Morrison.** 1994. Cell wall-bound oxidases from tobacco (*Nicotiana tabacum*) xylem participate in lignin formation. *Planta.* 194:9-14.
- Medentsev, A. G., A. Arinbasarova y V. K. Aimenko.** 2002. Adaptation of the phytopathogenic fungus *Fusarium decemcellulare* to oxidative stress. *Mikrobiologiya.* 70:34-38.
- Mehdy, M. C.** 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105:467-472.
- Mellersh, D. G., I. V. Foulds, V. J. Higgins y M. C. Heath.** 2002. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant J.* 29:257-268.
- Mendgen, K. y M. Hahn.** 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* 7:352-356.
-
-

-
-
- Messerschmidt, A.** 1997. Multi-copper oxidases. World Scientific, Singapore.
- Mikes, V., M. L. Milat, M. Ponchet, F. Panabières, P. Ricci y J. P. Blein.** 1998. Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:133-139.
- Mohammadi, M. y H. Kazemi.** 2002. Changes in peroxidase and polyphenol activity in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Sci.* 162:491-498.
- Møller, I. M.** 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:561-591.
- Møller, I. M., P. E. Jensen y A. Hansson.** 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:459-481.
- Morris, B. M., B. Reid y N. A. R. Gow.** 1992. Electrotaxis of zoospores of *Phytophthora palmivora* at physiologically relevant field strengths. *Plant Cell Environ.* 15:645-653.
- Morris, B. M. y N. A. R. Gow.** 1993. Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. *Phytopathol.* 83:877-882.
- Morris, P. F. y E. W. B. Ward.** 1992. Chemoattraction of zoospores of the soybean pathogen, *Phytophthora sojae*, by isoflavones. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40:17-22.
- Morris, P. F., E. Bone y B. M. Tyler.** 1998. Chemotropic and contact responses of *phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiol.* 117:1171-1178.
- Neill, S. J., R. Desikan, A. Clarke, R. D. Hurst y J. T. Hancock.** 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53(372):1237-1247.
- Newett, S. D. E., H. J. Crane y C. F. Balerdi.** 2002. Cultivars and Rootstocks. In: Whiley, A. W., Schaffer, B. y Wolstenholme, B. N. *The Avocado: Botany, Production and Uses.* New York. Cabi. Pp. 169-1170.
- Normanly, J., J. P. Slovin y J. D. Cohen.** 1995. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol.* 107:323-329.
-
-

-
-
- Orozco-Cárdenas, M., J. Narváez-Vásquez y C. Ryan.** 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin y methyl jasmonate. *Plant Cell*. 13(1):179-191.
- Patykowski, J. y H. Urbanek.** 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* 151:153-161.
- Pegg, K. G., L. M. Coates, L. Korsten y R. M. Harding.** 2002. Foliar, fruit and soilborne diseases. En: Wiley, A. W., B. Schaffer y B. N. Wolstenholme. *Avocado: Botany, production and uses*. CABI Publishing. Pp. 299-338.
- Peng M. y J. Kuc.** 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathol.* 82:696–699.
- Pérez, V., J.-C. Huet, M. O'Donohue, C. Nespoulous y J.-C. Pernellet.** 1999. A novel elicitor necrotic site revealed by α -cinnamomin sequence and site-directed mutagenesis. *Phytochem.* 50:961-966.
- Perfect, E. S. y J. R. Green.** 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Mol Plant Pathol.* 2:101-108.
- Pernellet, J.-C., M. Sallantin, M. Sallé-Tourne y J.-C. Huet.** 1993. Elicitor isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42:53-67.
- Pezet, R., V. Pont y K. Hoangvan.** 1991. Evidence for oxidative detoxification of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:441-450.
- Phillips, D., B. R. Grant y G. Weste.** 1987. Histological changes in the roots of an avocado cultivar, Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathol.* 77(5):691-698.
- Popham, P. L. y A. Novacky.** 1991. Use of dimethyl sulfoxide to detect hydroxyl radical during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Plant Physiol.* 96:1157-1160.
-
-

-
-
- Prusky, D., I. Kobiler, B. Jacoby, J. J. Sims y S. L. Midland.** 1985. Effect of inhibitors of lipoxigenase activity and its possible relation to latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 27:269-279.
- Prusky, D., I. Kobiler y B. Jacoby.** 1989. Purification and characterization of an endopolygalacturonase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* after harvest. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35:121-133.
- Prusky, D. y N. T. Keen.** 1993. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruit decay. *Plant Dis.* 77:114-119.
- Ramón, J. R.** 1993. Radicales libres y antioxidantes en clínica humana. Ed. IDEPSA (Internacional de Ediciones y Publicaciones, S. A.). Madrid, España.
- Repka, V. e I. Fischerova.** 2000. Serologically-related anionic peroxidases from petunia and cucumber can substitute flavonoid antioxidants. *Biol. Plant.* 43:105-112.
- Ricci, P., P. Bonnet, J.-C. Huet, M. Sallantin, F. Beauvais-Cante, M. Bruneteau, V. Billard, G. Michel y J.-C. Pernollet.** 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* 183:555-563.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Millar y J. Paganga.** 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20:933-956.
- Ride, J. P.** 1978. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. *Ann. Appl. Biol.* 89:302-306.
- Roberts, E., T. Kutchan y P. E. Kolattukudy.** 1988. Cloning and sequencing of cDNA for a highly anionic peroxidase from potato and the induction of its mRNA in suberizing potato tubers and tomato fruits. *Plant Mol. Biol.* 11:15-26.
- Rolke, Y., S. Liu, T. Quidde, B. Williamson, A. Schouten, K. M. Weltring, V. Sievers, B. Tudzynski y P. Tudzynski.** 2004. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol. Plant Pathol.* 5:17-27.
-
-

-
-
- Royle, D. J. y C. J. Hickman.** 1964. Observations on *Phytophthora cinnamomi*. Canadian Journal of Botany. 42:311-318.
- Rustérucci, C., V. Stallaert, M.-L. Milat, A. Pugin, P. Ricci y J.-P. Blein.** 1996. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. Plant Physiol. 111:885-891.
- Ryan, C. A. y E. E. Farmer.** 1991. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:651-674.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).** 2007. Subdelegación de Planeación y Desarrollo Rural. Estado de Michoacán. Disponible en: URL: <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Salazar-García, S., L. Zamora-Cuevas y R. J. Vega-López.** 2004. Actualización sobre la Industria del Aguacate en Michoacán, México. California Avocado Society. Yearbook. 87:45-54.
- Sánchez-Pérez, J. de la L., J. J. Alcántar Rocillo, V. M. Coria Ávalos, J. Anguiano Contreras, I. Vidales Fernández, L. M. Tapia Vargas, J. L. Aguilera Montañez, G. Hernández Ruíz y J. A. Vidales Fernández.** 2001. Tecnología para la producción de aguacate en México. INIFAP, CIRPAC, C. E. Uruapan. Libro Técnico No. 1. Michoacán, México. 208 pp.
- Sbaghi, M., P. Jeandet, R. Bessis y P. Leroux.** 1996. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. Plant Pathol. 45:139-144.
- Scandalios, J. G.** 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Braz. J. Med. Biol. Res. 38(7): 995-1014.
- Schaffer, B. y A. W. Whaley.** 2002. Environmental Physiology. En: Whaley, A. W., Schaffer, B. y Wolstenholme, B. N. The Avocado: Botany, Production and Uses. Wallingford. Cabi. Publishing. Pp. 151-152.

-
-
- Schnabelrauch, L. S., M. Kieliszewski, B. L. Upham, H. Alizedeh, D. T. A. Lamport.** 1996. Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J.* 9:477-489.
- Schofield P., D. M. Mbugua y A. N. Pell.** 2001. Analysis of condensed tannin: a review. *Animal Feed Science and Technology.* 91:21-40.
- Schouten, A., K. B. Tenberge, J. Vermeer, J. Stewart, L. Wagemakers, B. Williamson y J. A. L. Van Kan.** 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 3(4):227-238.
- Shetty, N. P., R. Mehrabi, H. Lütken, A. Haldrup, G. H. J. Kema, D. B. Collinge y H. J. L. Jørgensen.** 2007. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist.* 174:637-647.
- Solomon, P. S., K. C. Tan y R. P. Oliver.** 2003. The nutrient supply of phytopathogenic fungi; a fertile field for study. *Mol. Plant Pathol.* 4:203-210.
- SUMA (Servicios Unidos en Materia Agrícola A. C.).** 2006. Reporte de resultados de la primera etapa del proyecto "Estimación probabilística de cosecha de aguacate Hass en la región productora de Michoacán". Uruapan, Michoacán, en Boletín El Aguacatero No. 51. Disponible en: URL: http://www.aproam.com/boletines/boletin_aguacatero.html
- Suppo, F. R.** 1992. El Aguacate. Ed. A.G.T. México. 167 pp.
- Svalheim, O y B. Robertsen.** 1990. Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. *Physiol. Plant.* 78:261-267.
- Téliz, O. D.** 2000. El aguacate y su manejo integrado. 18 edición. Edit. Mundi-Prensa. México. 219 pp.
- Téliz, O. D., A. Mora, C. Velázquez., R. García, G. Mora, P. Rodríguez, J. Ethchevers, S. Salazar y P. H. Tsao.** 1992. Integrated Management of *Phytophthora* root rot of avocado in Atlixco, Puebla, Mex. Proc. of Second World Avocado Congress. Pp. 79-87.

-
-
- Tenhaken, R., A. Levine, L. F. Brisson, R. A. Dixon y C. Lamb.** 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:4158-4163.
- Tenberge, K. B., M. Beckedorf, B. Hoppe, A. Schouten, M. Solf y M. van den Driesch.** 2002. *In situ* localisation of AOS in host-pathogen interactions. *Microscopical Microanalysis.* 8:250-251.
- Thordal-Christensen, H., Z. Zhang, Y. Wei y D. B. Collinge.** 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11:1187-1194.
- Tiedemann, A. V.** 1997. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50:151-166.
- Torres, M. A., J. D. G. Jones y J. L. Dangl.** 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141:373-378.
- Valenzuela, B. A.** 2007. El chocolate, un placer saludable. *Rev. Chil. Nutr.* Vol. 34(3):180-190.
- Vanacker, H., T. L. W. Carver y C. H. Foyer.** 2000. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol.* 123:1289-1300.
- Vance, C. P., T. K. Kirk y R. T. Sherwood.** 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18:259-288.
- van Breusegem, F., E. Vranova, E. J. F. Dat y D. Inze.** 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science.* 161:405-414.
- van der Merwe, M. de V., E. M. C. Maas and J. M. Kotzé.** 1990. Evaluation of field trees for resistance to *Phytophthora cinnamomi* by means of the detached root technique. *South African Avocado Grower's Assoc. Yrbk.* 13:63-64.
- van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., C. A. M. Wagemakers, D. C. T. Dees y J. A. L. Van Kan.** 1997. Catalase A from *Botrytis cinerea* is not expressed during infection on tomato leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50:1-15.
-
-

-
-
- van Kan, J. A. L.** 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*. 11:247-253.
- van West, P., B. M. Morris, B. Reid, A. A. Appiah, M. C. Osborne, T. A. Campbell, S. J. Shepherd y N. A. R. Gow.** 2002. Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. *MPMI*. 15(8):790-798.
- Vera-Estrella, R., E. Blumwald y V. J. Higgins.** 1992. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. *Plant Physiol*. 99:1208-1215.
- Vidales F., J. A. y J. J. R. Alcántar.** 1994. Control integrado de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi*) del aguacate (*Persea americana*) en Michoacán. Memorias VII Reunión Científica y Técnica Forestal y Agropecuaria. Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. INIFAP. 7 p.
- von Gönner, M. y E. Schlösser.** 1993. Oxidative stress in interactions between *Avena sativa* L. & *Drechslera* spp. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 42:221-234.
- von Tiedemann, A.** 1997. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 50:151-166.
- Vranová, E., D. Inzé y F. van Breusegem.** 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot*. 53(372):1227-1236.
- Walz, A., I. Zingen-Sell, S. Theisen y A. Kortekamp.** 2008. Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Plant Pathol*. 120:317-330.
- Wattad, C. A. Dinoor y D. Prusky.** 1994. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. *MPMI*. 7(2):293-297.
- Weste, G.** 1994. Impact of *Phytophthora* species on native vegetation of Australia and Papua, New Guinea. *Austr. Plant Pathol*. 23:190-209.
- Whetten, R. W., J. J. MacKay y R. R. Sederoff.** 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 49:585-609.
-
-

-
-
- Whitmore, F. W.** 1978. Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. *Phytochem.* 17:421-425.
- Wojtaszek, P.** 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322:681-692.
- Wu, G., B. J. Shortt, E. B. Lawrence, E. B. Elaine, K. C. Fitzsimmons, D. M. Shah.** 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell.* 7:1357-1368.
- Xiu, Q. X., P. L. Luo y S. Q. Pan.** 2001. Feedback regulation of an *Agrobacterium* catalase gene *katA* involved in *Agrobacterium*-plant interaction. *Mol. Microbiol.* 42:645-657.
- Yahia, K. E. M. y S. R. Baez.** 1992. Manejo postcosecha de frutos subtropicales. En: *Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas.* Limusa. Pp. 197-205.
- Yamamoto, M., S. Nakatsuka, H. Otani, K. Kohmoto y S. Nishimura.** 2000. (+)-Catechin acts as an Infection-Inhibiting Factor in strawberry leaf. *Phytopathol.* 90(6):595-600.
- Yang, Y.** 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11:1621-1626.
- Yedidia, I., N. Benhamou e I. Chet.** 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3):1061-1070.
- Zaki, A. I., G. A. Zentmyer, J. J. Sims y N. T. Keen.** 1983. Stimulation of sexual reproduction in the A2 mating type of *Phytophthora cinnamomi* by oteic acid and lipids from avocado roots. *Phytopathol.* 73(2):199-203.
- Zentmyer G. A.** 1961. Chemotaxis of zoospores for root exudates. *Science.* 133:1595-1596.
- Zentmyer G. A.** 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the disease it causes. Minnesota, APS Press. 96 pp.
- Zentmyer G. A.** 1985. Origin and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. *Calif. Avocado Soc. Yrbk.* 69:89-93.
-
-

-
-
- Zentmyer G. A. y D. J. Mitchell.** 1986. *Phytophthora* diseases of fruit trees in the tropics. Rev. Trop. Pl. Path. 2:287-309.
- Zentmyer G. A., J. Menge y H. Ohr.** 1994. *Phytophthora* root rot. In: Compendium of Tropical Fruit Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. Pp. 77-79.
- Zentmyer G. A. y S. M. Mircetich.** 1966. Saprophytism and persistence in soil by *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathol. 56(6):710-712.
- Zhang, Z., D. B. Collinge y H. Thordal-Christensen.** 1995. Germin-like oxalate oxidase a H₂O₂-producing enzyme accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant J. 8:139-145.
- Zhang, Z., C. Henderson y S. J. Gurr.** 2004. *Blumeria graminis* secretes an extracellular catalase during infection of barley: potential role in suppression of host defense. Mol. Plant Pathol. 5(6):537-547.

XI. APÉNDICES

APÉNDICE I. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1.1. Agar dextrosa papa (PDA), 1 l

1. Disolver 39 g de polvo PDA en 750 ml de agua destilada.
2. Ajustar a pH 7.2 y aforar con agua destilada a 1 l.
3. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

1.2. Agar dextrosa papa con jugo de verduras V8 (PDAV8), 1 l

1. Disolver 39 g de polvo PDA en 500 ml de jugo de verduras V8.
2. Ajustar a pH 7.2 y aforar con agua destilada a 1 l.
3. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

1.3. Dextrosa papa líquido (con o sin jugo de verduras V8), 1 l

1. Hervir 4 g de papa blanca sin cáscara finamente picada en 400 ml de agua destilada.
2. Machacar la papa cocida lo más posible.
3. Centrifugar a 10,000 rpm durante 15 minutos.
4. Recuperar el sobrenadante.
5. Agregar 20 g de dextrosa y agitar hasta disolver por completo.
6. Ajustar a pH 7.2 y aforar con agua destilada a 1 l para el caso del medio sin jugo V8 (para *C. lindemuthianum*), o agregar primero 500 ml de jugo V8 y después aforar a 1 l con agua destilada para el caso del medio con jugo V8 (para *P. cinnamomi*).
7. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

APÉNDICE II. TINCIÓN DE *P. cinnamomi*

2.1. Tinción de *P. cinnamomi*

1. Hacer cortes del tejido de raíz de aguacate previamente tratado, los más finamente posible, con una navaja de bisturí.
2. Colocar 4 cortes en un portaobjetos con marco de parafilm.
3. Agregar el azul de lactofenol al 3% hasta cubrir por completo los cortes e incubar durante 10 min.
4. Lavar hasta eliminar el exceso de colorante con agua destilada.
5. Agregar un poco de agua destilada a las muestras.
6. Colocar el cubreobjetos.
7. Observar al microscopio compuesto y tomar fotografías.

APÉNDICE III. MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

3.1. Anión superóxido

1. Colocar 0.5 g de tejido de raíz en 10 ml de XTT 0.5 mM.
2. Incubar durante 10 minutos.
3. Tomar 1 ml de la solución incubada con el tejido y medir su absorbencia a 470 nm, usando como blanco la solución de XTT 0.5 mM.

3.2. Peróxido de hidrógeno

1. Colocar 0.5 g de tejido en 10 ml de agua destilada estéril.
2. Incubar durante 10 minutos.
3. Tomar 500 µl del agua en la que se encuentra el tejido y mezclarlos con 500 µl de la mezcla de reacción (0.05% de guaiacol (440 µl/L), mas peroxidasa (350 µl/L, 2500 U/ml), disueltos en 25 mM de fosfato de sodio, pH 7.0.
4. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.

-
-
5. Medir absorbencia a 450 nm (luz visible), usando agua destilada estéril como blanco.
 6. La concentración del peróxido de hidrógeno se calcula en base a una concentración conocida obtenida de una curva patrón del mismo.

3.3. Radical hidroxilo como peroxidación de lípidos

1. Pulverizar 0.5 g de tejido en un mortero frío con nitrógeno líquido.
2. Resuspender el polvo obtenido en 1 ml de ácido tricloroacético al 10%.
3. Centrifugar a 15,000 g durante 20 minutos.
4. Tomar 125 µl del sobrenadante y mezclarlos con 125 µl de ácido tricloroacético al 10% y con 500 µl de ácido tiobarbitúrico al 0.2% disuelto en ácido tricloroacético al 10%. Volumen total de 750 µl.
5. Hervir la mezcla durante 5 minutos.
6. Dejar enfriar durante 5 minutos en hielo.
7. Centrifugar a 10,000 x g durante 10 minutos.
8. Medir absorbencia a 532 y a 600 nm, usando como blanco la mezcla mencionada en el punto 4 sustituyendo el sobrenadante por agua destilada estéril.

APÉNDICE IV. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

4.1. Catalasa extracelular de *P. cinnamomi*

4.1.1. Extracción

1. Filtrar con papel Whatman no. 4, 50 ml de medio líquido dextrosa papa en el cual se creció *P. cinnamomi* o *C. lindemuthianum* durante 8 días en agitación constante (140 rpm) a 25°C, o como control negativo 50 ml de medio sin inóculo mantenido bajo las mismas condiciones.
2. Centrifugar el filtrado a 2,000 rpm durante 20 minutos.
3. Agregar poco a poco sulfato de amonio al sobrenadante hasta alcanzar un 85% de saturación en agitación constante durante 2 horas.

-
-
4. Centrifugar a 20,000 x g durante 10 minutos.
 5. Recuperar la pastilla y resuspenderla en 100 μ l de buffer de KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0.
 6. Utilizar para llevar a cabo el ensayo de actividad enzimática por espectrofotometría.

4.1.2. Actividad por espectrofotometría

1. Preparar por triplicado por muestra 1 ml de mezcla de reacción con:

660 μ l de agua destilada estéril

326 μ l de buffer de KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0

4 μ l de peróxido de hidrógeno (directo del reactivo)

10 μ l de extracto enzimático

2. Homogeneizar en un vórtex durante 2 segundos.
3. Medir la disminución en la absorbencia a 240 nm durante 3 minutos a intervalos de 30 segundos, usando como blanco el buffer de KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0.

4.2. Peroxidasas totales

4.2.1. Extracción

1. Pulverizar 0.5 g de tejido en un mortero frío con nitrógeno líquido.
2. Resuspender el polvo obtenido en 1 ml de buffer de NaH_2PO_4 10 mM y NaCl 1 M, pH 6.0.
3. Homogeneizar en un vórtex durante 30 segundos.
4. Agitar en frío durante 1 hora.
5. Centrifugar a 12,700 rpm durante 25 minutos a 4°C.
6. Recuperar el sobrenadante.
7. Utilizar para llevar a cabo el ensayo de actividad enzimática por espectrofotometría.

4.2.2. Actividad por espectrofotometría

1. Preparar por triplicado por muestra 1 ml de mezcla de reacción con:

990 µl de la mezcla de guaiacol*

10 µl de extracto enzimático

*La mezcla de guaiacol contiene:

Guaiacol al 0.25 %

NaH₂PO₄ 10 mM, pH 6.0 al 0.25%

Peróxido de hidrógeno al 0.125%

2. Homogeneizar en un vórtex durante 2 segundos.
3. Medir el incremento en la absorbencia a 470 nm durante 3 minutos a intervalos de 30 segundos, usando como blanco buffer de NaH₂PO₄ 10 mM, pH 6.0.

APÉNDICE V. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LIGNINA

1. Pulverizar 0.5 g de tejido en un mortero frío con nitrógeno líquido.
2. Homogeneizar en 10 ml de metanol absoluto durante 1 minuto.
3. Centrifugar a 3,000 rpm durante 15 minutos.
4. Recuperar la pastilla (residuo insoluble en alcohol) y dejarla secar durante 24 h a 60°C.
5. Pesar 45 mg del residuo y colocarlos en un tubo de vidrio con tapa de rosca.
6. Agregar 5 ml de HCl 2 N y 0.5 ml de ácido tioglicólico.
7. Cerrar bien y agitar durante 1 minuto.
8. Colocar el agua hirviendo durante 4 h a 100°C.
9. Dejar enfriar.
10. Transferir la muestra a un tubo de centrifuga de polipropileno (Es muy importante **NO** usar de policarbonato).
11. Centrifugar a 30,000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla una vez con 5 ml de agua destilada.

-
-
13. Resuspender la pastilla en 5 ml de NaOH 0.5 N, tapar con parafilm y agitar suavemente durante 18 h a 25°C para extraer el ácido lignotioglicólico (LTGA).
 14. Centrifugar a 30,000 x g durante 10 minutos.
 15. Recuperar el sobrenadante en un tubo de vidrio con tapa de rosca.
 16. Agregar 1 ml de HCl concentrado e incubar durante 4 h a 4°C para precipitar el LTGA.
 17. Transferir la muestra a un tubo de centrifuga de polipropileno.
 18. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 minutos.
 19. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 10 ml de NaOH 0.5 N.
 20. Medir absorbencia a 280 nm, usando como blanco NaOH 0.5 N.

APÉNDICE VI. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE EPICATEQUINA

1. Pulverizar 1 g de tejido en un mortero frío con nitrógeno líquido.
2. Homogeneizar el polvo (que en volumen ocupa aprox. 5 ml de un tubo Falcon de 50 ml) con 2 volúmenes (10 ml) de etanol al 95%.
3. Agitar en vórtex durante 30 segundos.
4. Centrifugar a 2,500 rpm durante 5 minutos.
5. Recuperar el sobrenadante (± 7 ml).
6. Evaporar el sobrenadante en un termoblock a 60°C.
7. Disolver el extracto en 10 ml de NaCl 1mM.
8. Realizar dos extracciones con 50 ml de acetato de etilo cada una.
9. Recuperar la fase orgánica (superior).
10. Evaporar a sequedad total.
11. Realizar lavados con acetato de etilo hasta concentrar la muestra en un tubo eppendorf.
12. Resuspender el extracto en 100 μ l de acetato de etilo.
13. Tomar 10 μ l de los 100 μ l y agregarlos a 990 μ l de etanol al 95% para medir su absorbencia a 279 nm, usando como blanco etanol al 95%.
14. La concentración de ECQ se calcula en base a una concentración conocida obtenida de una curva patrón de ECQ comercial de té verde.