

RESPUESTA DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO DE CALABAZA ZUCCHINI BAJO ESTRÉS TÉRMICO POR APLICACIÓN DE OLIGOGLUCANOS

Abel Cerón-García, Irasema del Carmen Vargas-Arispuro, Gustavo Adolfo González-Águilar, María Auxiliadora Islas-Osuna y Miguel Ángel Martínez-Téllez

RESUMEN

Las plantas son vulnerables al estrés por temperatura provocado por el cambio climático. Bajo estrés por calor, el sistema antioxidante enzimático en plantas presenta inconsistencias para protegerlas de la oxidación, desencadenando una serie de procesos oxidativos mediados por especies reactivas de oxígeno, que afectan funciones metabólicas y fisiológicas. En climas cálidos, resulta indispensable promover la inducción del sistema antioxidante enzimático en plantas. En este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación exógena de oligoglucanos (OG), obtenidos por hidrólisis enzimática de paredes celulares de *Trichoderma harzianum*, en la actividad de superóxido dis-

mutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) del sistema antioxidante de calabaza zucchini (*Cucurbita pepo* L.) sometidos a condiciones de estrés a 45°C. Los OG se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y de intercambio aniónico. Una fracción purificada de OG de *T. harzianum* indujo incrementos significativos ($p \leq 0,05$) en la actividad de SOD, APX y CAT. Los OG de *T. harzianum* presentan potencialidad para reducir los efectos del estrés a 45°C en cotiledones de calabaza zucchini incrementando la actividad del sistema antioxidante enzimático.

Introducción

El cambio climático es un fenómeno a nivel mundial caracterizado por el incremento simultáneo de CO₂ y temperatura, lo que afecta considerablemente el metabolismo de las plantas, limitando su desarrollo y sobrevivencia (Rennenberg *et al.*, 2006). El estrés por calor en plantas se define como el aumento de temperatura por encima de un nivel tolerable y durante un periodo de tiempo suficiente para producir daños severos a nivel morfológico, fisiológico

y bioquímico (Wahid *et al.*, 2007; Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008). Las plantas cuentan con sistemas regulatorios para múltiples rutas bioquímicas y mecanismos defensivos que evitan, en lo posible, el daño celular por altas temperaturas (Apel y Hirt, 2004). A pesar de esto, bajo condiciones de estrés por calor, muchas enzimas clave de los procesos bioquímicos de producción de energía, respiración y síntesis de proteínas son afectadas negativamente (Suzuki y Mittler, 2006). En consecuencia, se producen especies reactivas

de oxígeno (ERO) como anión superóxido (O₂^{•-}), radical hidróxilo (HO[•]) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que en altas concentraciones resultan perjudiciales para ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, comprometiendo la funcionalidad celular y por lo tanto la productividad de la planta (Mittler, 2006).

Las plantas controlan la acumulación de las ERO mediante la acción del sistema antioxidante, compuesto en la parte enzimática por superóxido dismutasa (SOD, EC. 1.15.1.1), catalasa (CAT, EC.

1.11.1.6) y ascorbato peroxidasa (APX, EC. 1.11.1.7), y en la parte no-enzimática por glutatión, ascorbato, tocoferol y compuestos fenólicos (Halliwell, 2006). Sin embargo, el estrés por calor puede afectar las enzimas que componen el sistema antioxidante de las plantas (Tang *et al.*, 2006), por lo que éstas, crecidas en zonas donde las temperaturas alcanzan los 40°C o más, requieren del reforzamiento de este sistema defensivo para contrarrestar el estrés oxidativo.

El impacto económico debido a altas temperaturas, mani-

PALABRAS CLAVE / Cambio Climático / Especies Reactivas de Oxígeno / Estrés Calórico / Oligoglucanos / Sistema Antioxidante /

Recibido: 07/11/2010. Modificado: 19/06/2012. Aceptado: 22/06/2012.

Abel Cerón-García. Ingeniero en Alimentos, Universidad Autónoma Metropolitana, México. Maestro y Doctor en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), México. Investigador, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., México.

Irasema del Carmen Vargas-Arispuro. Ingeniera Química en Alimentos, Universidad de So-

nora (UniSon), México. Doctora en Ciencias (Química Agrícola), Universidad Politécnica de Valencia, España. Profesor Investigador, CIAD, México.

María Auxiliadora Islas-Osuna. Química, Instituto Tecnológico de Sonora, Sonora, México. Maestra en Ciencias, CIAD, México. Doctora en Ciencias (Biología Molecular y Celular), University of Arizona, EEUU. Profesora Investigadora, CIAD, México.

Gustavo Adolfo González-Aguilar. Ingeniero Químico en Alimentos, UniSon, México. Maestro en Ciencias, CIAD, México. Doctor en Ciencias (Tecnología de Alimentos), Universidad de Valencia, España. Profesor Investigador, CIAD, México.

Miguel Ángel Martínez-Téllez. Ingeniero Fruticultor, Universidad Autónoma de Chihuahua, México. Maestro en Ciencias, CIAD, México. Doctor en

Ciencias (Tecnología de Alimentos), Universidad Politécnica de Valencia, España. Profesor Investigador, CIAD, México. Dirección: Laboratorio de Fisiología Vegetal, CIAD. Carretera a la Victoria Km. 0.6, C.P. 83000, A.P. 1735, Hermosillo, Sonora, México. e-mail: norawa@ciad.mx.

RESPONSES OF THE ENZYMIC ANTIOXIDANT SYSTEM IN THERMAL STRESSED ZUCCHINI SQUASH SEEDLINGS BY OLIGOGLUCAN APPLICATION

Abel Cerón-García, Irasema del Carmen Vargas-Arispuro, Gustavo Adolfo González-Águilar, María Auxiliadora Islas-Osuna and Miguel Ángel Martínez-Téllez

SUMMARY

Plants are highly vulnerable to thermal stress due to global warming. Under heat stress, the plant enzymatic antioxidant system is affected, leading to the beginning of oxidative processes by reactive oxygen species that affect metabolic and physiological functions. In warm climates it is necessary to induce the plant enzymatic antioxidant system. In this paper, we evaluated the effect of the exogenous application of oligoglucans (OG) obtained by an enzymatic hydrolysis of *Trichoderma harzianum* cell-wall, on the enzymatic activities of superoxide

dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in heat-stressed (45°C) zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.) cotyledons. Fungal OGs were isolated sequentially using size-exclusion and anion-exchange chromatography. One of the OG isolated fractions induced a significant ($p \leq 0.05$) enhancement of SOD, APX and CAT enzymatic activities. *T. harzianum* OGs exhibited the ability to increase the activity of the enzymatic antioxidant system in heat-stressed zucchini cotyledons.

RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO DE ABOBRINHA SOB ESTRESE TÉRMICO POR APLICAÇÃO DE OLIGOGLICANOS

Abel Cerón-García, Irasema del Carmen Vargas-Arispuro, Gustavo Adolfo González-Águilar, María Auxiliadora Islas-Osuna e Miguel Ángel Martínez-Téllez

RESUMO

As plantas são vulneráveis ao estresse por temperatura provocado pela mudança climática. Sob estresse por calor, o sistema antioxidante enzimático em plantas apresenta inconsistências para protegê-las da oxidação, desencadeando uma série de processos oxidativos mediados por espécies reativas de oxigênio, que afetam funções metabólicas e fisiológicas. Em climas cálidos, resulta indispensável promover a indução do sistema antioxidante enzimático em plantas. Neste trabalho se avaliou o efeito da aplicação exógena de oligoglicanos (OG), obtidos por hidrólise enzimática de paredes celulares de *Trichoderma harzianum*, na atividade de superóxido dismutase

(SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) do sistema antioxidante de abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), submetidos a condições de estresse a 45°C. Os OG se purificaram mediante cromatografia de exclusão por tamanho e de intercâmbio aniônico. Uma fração purificada de OG de *T. harzianum* induziu incrementos significativos ($p \leq 0,05$) na atividade de SOD, APX e CAT. Os OG de *T. harzianum* apresentam potencialidade para reduzir os efeitos do estresse a 45°C em cotilédones de abobrinha incrementando a atividade do sistema antioxidante enzimático.

festadas como estrés por calor y sequía, generaron daños en la agricultura de los EEUU valorados en más de 4,2 billones USD (Mittler, 2006). Ello ha motivado investigaciones enfocadas a potenciar el sistema antioxidante en plantas, ya sea mediante manipulación genética (Tang *et al.*, 2006; Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008) o acondicionamiento térmico (Kreslavski *et al.*, 2008). No obstante, existe poca información de trabajos sobre el fortalecimiento del sistema antioxidante a través de la inducción exógena utilizando inductores de origen fúngico. Estos últimos han sido utilizados para fortalecer los sistemas defensivos contra diferentes tipos de estrés (Radwan *et al.*, 2006; Wahid *et al.*, 2007), destacando la utilización de oligoglucanos

(OG) derivados de la pared fúngica para fortalecer sistemas relacionados con el metabolismo de los fenilpropanoides (Nita-Lazar *et al.*, 2004) y de proteínas relacionadas con la patogénesis (Chivasa *et al.*, 2006; Shinya *et al.*, 2006).

Los OG han mostrado, en diversas especies de plantas, la capacidad para inducir la expresión de genes codificantes de enzimas del metabolismo primario y secundario, tales como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; EC. 1.2.1.12; Tanaka *et al.*, 1982; Laxalt *et al.*, 1996), la fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC. 4.3.1.5; Kombrink y Hahlbrock, 1986; Nita-Lazar *et al.*, 2004; Shinya *et al.*, 2006) y la enzima 4-coumarato-CoA ligasa (4CL; EC. 6.2.1.12; Kombrink y Hahlbrock, 1986;

Uhlmann y Ebel, 1993). Los OG obtenidos del alga verde *Ulva* spp. fueron capaces de incrementar los niveles de expresión de genes codificantes de SOD y APX en plantas de *Medicago truncatula* (Cluzet *et al.*, 2004). Por ello, en este trabajo se evaluó la inducción del sistema antioxidante enzimático por efecto de los OG obtenidos de paredes celulares de *Trichoderma harzianum*, midiendo la actividad de SOD, APX y CAT en cotilédones de calabaza zucchini bajo estrés a 45°C.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se obtuvieron plántulas de calabaza zucchini (*Cucurbita pepo* L.) cv. 'Raven' a partir

de semillas certificadas (Asgrow®, México) crecidas durante 10 días en cámara de crecimiento de plantas a 25°C, fotoperiodo de 16h luz / 8h oscuridad, intensidad lumínica de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y humedad relativa (HR) de 80%.

Establecimiento del estrés por calor

A quince plántulas de calabaza zucchini crecidas bajo las condiciones descritas en el párrafo anterior se les indujo estrés por calor, sometiéndolas a 45°C durante 2, 6, 12, 24 y 48h en ausencia de luz, en una cámara de crecimiento de plantas con HR >80%. Como testigo se utilizaron 15 plántulas que fueron mantenidas a 25°C y en las mismas condi-

ciones de HR y luz que las plantas estresadas a 45°C.

Marcadores biológicos de estrés térmico

Pérdida iónica relativa (PIR). La estabilidad de las membranas celulares se determinó mediante los valores de PIR, siguiendo el método propuesto por Friedman y Rot (2006). Se colectaron plántulas de calabaza con diferentes tiempos de estrés (2, 6, 12, 24 y 48h). Tres cotiledones (1g) fueron cortados de las plántulas, lavados con H₂O destilada y colocados en tubo de vidrio con tapa de rosca (16×150mm). A cada tubo se le adicionó D-manitol 0,3M (20ml) y se agitó durante 2h en un agitador de alícuotas Speci-Mix M26125 (Thermolyne, EEUU). Posteriormente, se midió la conductividad eléctrica inicial (Vi) en la solución, usando un conductímetro EC-METER 1481-61 (Cole-Palmer, EEUU). Inmediatamente, las muestras fueron sometidas a 121°C durante 30min y se dejaron enfriar hasta alcanzar los 25°C para medir la conductividad eléctrica final (Vf). El nivel de PIR se calculó con la ecuación

$$PIR = \left(\frac{V_i}{V_f} \right) \times 100\%$$

Producción de H₂O₂. Para determinar el efecto del estrés por calor (45°C) en cotiledones de calabaza zucchini, se cuantificó el H₂O₂ acumulado siguiendo el método propuesto por Cervilla *et al.* (2007). Tres cotiledones (1g) fueron retirados de las plántulas expuestas al estrés por calor durante 2, 6, 12, 24 y 48h e inmediatamente fueron triturados en mortero con 10ml de buffer de fosfato de potasio 50mM (pH 6,8) frío, conteniendo 1% de polivinil pirrolidona (PVP). La mezcla se homogenizó durante 30s y se centrifugó a 7500rpm (Sorval RC, EEUU) por 20min a 25°C. Al sobrenadante (1ml) se le añadió 0,3ml de solución 0,1% de dióxido de titanio en 20% H₂SO₄. La mezcla resultante fue homogenizada vigorosamente durante 1min y posteriormente centrifugada a 8100rpm (Sorval RC, EEUU)

durante 30min a 25°C. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 415nm en un espectrofotómetro Bio-Spec1601 (Shimadzu, Japón). La concentración de H₂O₂ formado por efecto del estrés térmico se calculó usando una curva estándar de H₂O₂ (1-10mM).

Recuperación del estrés en plántulas de calabaza

El material vegetal expuesto al estrés por calor durante 2, 6, 12, 24 y 48h (tres plántulas por cada punto de análisis) permaneció en una cámara de crecimiento de plantas a temperatura de aclimatación (25°C) durante tres días. Posteriormente se determinó el valor de PIR y la producción de H₂O₂ a cada grupo de plántulas, tal como se describió en la sección anterior. Al evaluar el grado de daño producido por el estrés a 45°C, se estableció un nivel máximo de recuperación al estrés de 50% de PIR (Inaba y Crandall, 1988) y 10mmol de H₂O₂ formado por g de peso fresco (PF; Levine *et al.*, 1994). Por ello, las plántulas estresadas durante un determinado tiempo que superaban estos valores máximos de recuperación, no fueron seleccionadas para los ensayos de inducción del sistema antioxidante, ya que sus células difícilmente se recuperarían del daño sufrido.

Obtención e hidrólisis de pared celular de T. harzianum

A partir de micelios de *T. harzianum* crecidos en caldo dextrosa-papa (Difco Co., EEUU) a 27°C por 20 días, se obtuvo la pared celular del hongo de acuerdo al método propuesto por Nita-Lazar *et al.* (2004). La pared recuperada fue secada a temperatura ambiente (25°C) y, posteriormente, molida finamente usando un mortero estéril. El hidrolizado de pared celular se obtuvo siguiendo el método propuesto por Okinaka *et al.* (1995) utilizando una mezcla de glucanasas y quitinasas (GlucanexTM, Sigma, México) a una concentración de 20mg·g⁻¹

de pared fúngica. La fracción soluble resultante fue denominada como mezcla de OG derivados enzimáticamente (ME).

Purificación de oligoglucanos activos

Los OG presentes en ME fueron fraccionados por cromatografía de exclusión por tamaño (CET), en un cromatógrafo de líquidos de baja presión (FPLC System, Pharmacia, Suecia). Se utilizó una columna (2,6×50cm) empacada con matriz de poliacrilamida (Biogel P-6) con límite de exclusión de 6kDa. La fase móvil consistió de H₂O destilada (250ml) a un flujo de 1ml·min⁻¹ y se colectaron fracciones de 2,5ml. A cada fracción obtenida se le cuantificaron los carbohidratos totales (Bailey, 1958). Para facilitar la evaluación biológica, las fracciones colectadas se juntaron en tres fracciones con el siguiente orden de elución: antes del volumen de vacío (F1), dentro del volumen de exclusión (F2) y después del volumen de exclusión (F3). La fracción de los OG que resultado activa fue sub-fraccionada por cromatografía de intercambio aniónico (CIA) en el sistema FPLC (Pharmacia, Suecia) mediante un intercambiador aniónico fuerte (Q-sefarsa, columna de 2,5×45cm). Las condiciones de elución fueron: gradiente lineal (0-0,3M) de formato de amonio 0,3M (pH 6,8) en NaCl 1M durante 2h, flujo de 2ml·min⁻¹ y se colectaron fracciones de 10ml. En cada sub-fracción colectada se cuantificaron los carbohidratos totales, expresados como equivalentes de hexosas (Bailey, 1958).

Las sub-fracciones obtenidas por CIA se agruparon en tres grupos. El primer grupo contiene las sub-fracciones que no interactuaron con la matriz, el segundo y tercer grupo contienen las sub-fracciones con interacción media y fuerte, respectivamente. Para la selección de los OG activos se estableció, como criterio de selección, que los diferentes OG promovieran los mayores incrementos de actividad en las enzimas del sistema antioxidante enzimático

en cotiledones de calabaza zucchini bajo estrés a 45°C.

Análisis de carbohidratos en los OG activos

Se determinaron los carbohidratos presentes en la fracción de OG que mostró el mayor efecto inductor de actividad enzimática del sistema antioxidante de cotiledones de calabaza. Para obtener los azúcares neutros, los OG activos fueron sometidos a hidrólisis ácida con HCl 1M a 121°C durante 2,5h. Los monosacáridos resultantes fueron analizados cuantitativamente por cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia acoplada a un detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) en un Sistema DIONEX DX-500 (Sunnyvale, CA, EEUU) equipado con una columna Carbo-Pac PA-1 (4×250mm). Se utilizó H₂O grado HPLC como eluyente a una velocidad de flujo de 1ml·min⁻¹ en modo isocrático y NaOH 30mM como eluyente post-columna. Los tiempos de elución y concentraciones de cada monosacárido se compararon con estándares puros (Sigma, México).

Aplicación de tratamientos en plantas

Los OG, con diferente grado de purificación, fueron aplicados por aspersión (500ppm, 1ml por plántula) a 15 plántulas estresadas a 45°C durante 12h. La aspersión se realizó al inicio y al final del periodo de estrés. Posteriormente, las plántulas fueron mantenidas durante 2h a temperatura ambiente (25°C) e inmediatamente los cotiledones fueron separados para ser congelados en N₂ líquido y almacenados a -40°C hasta evaluar la actividad SOD, APX y CAT. Plántulas de calabaza mantenidas a 25 y 45°C, sin aplicación de OG, fueron consideradas como los controles (-) y (+), respectivamente.

Evaluación enzimática de SOD

La actividad SOD se determinó de acuerdo a lo propuesto

por Wu *et al.* (2008) basándose en la capacidad que presenta esta enzima para inhibir la reducción química del azul de nitro-tetrazolio (NBT) inducida por luz. Tres cotiledones de calabaza (1g), fueron homogenizados en un mortero junto con 2ml de buffer de fosfato de potasio 50mM (pH 7,5), que contenía EDTA 1mM y 5% de PVP. El homogenizado fue centrifugado a 9100rpm (Sorval RC, EEUU) por 15min a 4°C. El sobrenadante recuperado, denominado como extracto proteico, se usó para determinar la actividad SOD. La mezcla de ensayo (1ml) contenía buffer de fosfato de sodio 0,1M (pH 7,8); L-metionina 0,01M; 0,025% de Tritón X-100; EDTA 0,11mM; NBT 57µM; y 50µg de extracto proteico. La reacción de reducción del NBT se inició simultáneamente al adicionar riboflavina 1,3µM y al exponer los tubos de ensayo que contenían la mezcla bajo un haz de luz blanca (lámparas de 30W) durante 10min. La actividad de la enzima se determinó a 560nm en un espectrofotómetro Bio-Spec 1601 (Shimadzu, Japón). La unidad de actividad SOD fue definida como la cantidad de enzima que inhibe en 50% la reducción química del NBT inducida por luz.

Evaluación enzimática de APX

La actividad de APX fue determinada evaluando los cambios de absorbancia a 290nm durante 3min a 25°C, de acuerdo al método propuesto por Nakano y Asada (1987). Cotiledones de calabaza (1g) se homogenizaron en un mortero junto con 10ml de buffer de fosfato de potasio 50mM (pH 7,8) que contenía ácido L-ascórbico 5mM, EDTA 1mM y 1% de polivinil polipirrolidona (PVPP). El homogenizado fue centrifugado a 11150rpm (Sorval RC, EEUU) durante 20min a 4°C y el sobrenadante recuperado se usó para evaluar la actividad APX. La mezcla de ensayo (0,5ml) contenía buffer de fosfato de potasio 50mM (pH 7,0); ácido L-ascórbico 5mM; H₂O₂ 0,1M; y 50µl del

extracto proteico. La actividad APX fue calculada en base al coeficiente de extinción molar del ascorbato ($\epsilon = 2,8\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y reportada como milimoles de ascorbato oxidado por $\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Evaluación enzimática de CAT

La actividad CAT fue evaluada siguiendo la cinética de consumo del H₂O₂ a 240nm durante 3min a 30°C, de acuerdo al método establecido por Aebi (1984). Cotiledones de calabaza (1g) fueron homogenizados en un mortero junto con 10ml de buffer de fosfato de potasio 50mM (pH 7,8) que contenía 0,5% de Tritón X-100; EDTA 0,5mM y 1% de PVPP. El homogenizado fue centrifugado a 11150rpm (Sorval RC, EEUU) durante 20min a 4°C. El sobrenadante recuperado fue usado para evaluar la actividad de CAT. La mezcla de ensayo (0,5ml) contenía buffer de fosfatos 50mM (pH 7,0); H₂O₂ 50mM y 25µl del extracto proteico. La actividad CAT fue calculada en base al coeficiente de extinción molar del H₂O₂ ($\epsilon = 28\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y reportada como milimoles de H₂O₂ reducido por $\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Determinación del contenido de proteína soluble

En cada uno de los extractos proteicos se determinó el contenido de proteína soluble usando el reactivo Bio-Rad Protein AssayTM (Bio-Rad, EEUU) a partir de una curva estándar de albumina sérica de bovino (Bradford, 1976).

Análisis estadísticos

Los cambios en la actividad SOD, APX y CAT, así como en el contenido de carbohidratos de los OG activos, se determinaron por triplicado. Los datos obtenidos se analizaron

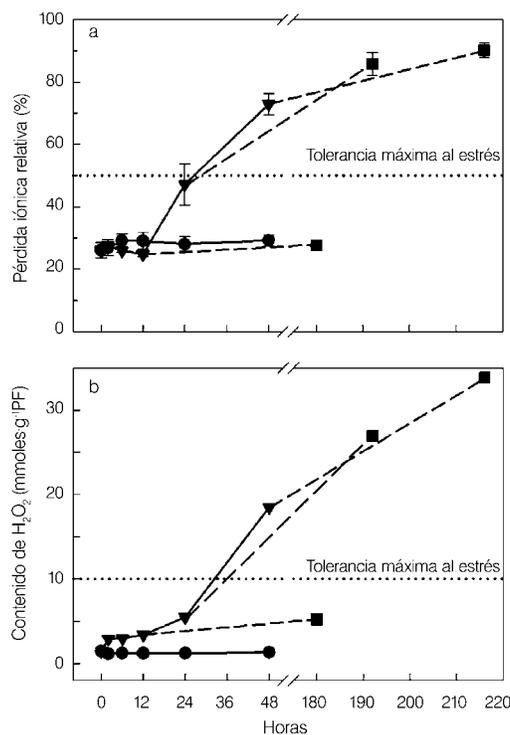


Figura 1. Pérdida iónica relativa (a) y contenido de H₂O₂ (b) en plántulas de calabaza zucchini bajo estrés a 45°C; ●: control a 25°C, ▼: plántulas con estrés a 45°C, ■: plántulas recuperadas del estrés durante 3 días a 25°C.

mediante un ANOVA de una vía en el programa estadístico NCSS. En caso de encontrar diferencias significativas, se aplicó una prueba de diferencias de medias por el método de Duncan ($p \leq 0,05$).

Resultados y Discusión

Efecto del estrés térmico en plántulas de calabaza

En este trabajo se indujo el estrés por calor en plántulas de calabaza zucchini, manteniéndolas a 45°C durante 2, 6, 12, 24 y 48h. Las plántulas estresadas mostraron un incremento en la pérdida iónica relativa de un valor basal de ~25%, que permaneció sin cambios en un periodo de 0-12h, mientras que las plántulas estresadas por 24 y 48h presentaron valores de PIR de 47 y 73%, respectivamente (Figura 1a). Las plántulas en las que la exposición a 45°C fue <12h, tuvieron una recuperación del estrés de acuerdo al criterio elegido por Inaba y Crandall (1988), quienes establecen, como tolerancia

máxima al estrés, valores de PIR <50%. Las plántulas con mayor tiempo de exposición al calor presentaron valores de PIR >50%, no logrando recuperarse después del estrés aplicado (Figura 1a), lo que significa que la exposición a 45°C ocasionó daños celulares irreversibles, ya que las altas temperaturas afectan la integridad de las membranas plasmáticas, incrementando la fluidez y promoviendo su desintegración (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Este daño favorece la pérdida de K⁺ y Ca²⁺, afecta las proteínas de membrana e inactiva receptores, enzimas y canales iónicos (Halliwell, 2006).

La formación de H₂O₂ en las plántulas estresadas incremento en relación al tiempo de exposición al calor (Figura 1b), presentando valores desde 1,4-3,4mmol·g⁻¹ PF desde el inicio de la evaluación y hasta 12h de exposición al calor; a las 24h se registraron 5,5mmol·g⁻¹ PF y a las 48h el H₂O₂ se alcanzó niveles de 18,5mmol·g⁻¹ PF, superando el límite de tolerancia máxima al estrés de 10mmol de H₂O₂ por g PF establecido por Levine *et al.*, (1994). La recuperación del estrés por calor solo fue posible en plántulas con tiempos de exposición <12h, ya que al ser transferidas a temperatura de 25°C mostraron valores de 5,24mmol de H₂O₂ por g PF, mientras que a 24 y 48h los niveles de H₂O₂ formado después de la transferencia fueron de 27 y 34mmol por g PF, respectivamente (Figura 1b). Incrementos similares de H₂O₂ fueron reportados en plantas de papa bajo estrés a 42°C durante 10h (Tang *et al.*, 2006) y en plántulas de mostaza y tabaco con estrés de 40°C durante 4h (Dat *et al.*, 2000), lo que puede significar que la exposición de plantas a temperaturas >42°C produce daños irreversibles en las membranas, por lo que la

exposición de plantas a temperatura de 45°C requieren del reforzamiento del sistema antioxidante enzimático para la protección de las membranas plasmáticas (Apel y Hirt, 2004). La evaluación del sistema antioxidante enzimático de las plántulas de calabaza zucchini a las condiciones de estrés por calor durante 12h mostró que la actividad enzimática de SOD se incrementó ligeramente (Figura 2a), no siendo significativo ($p \leq 0,05$) el incremento. Este ligero incremento concuerda con la acumulación de H_2O_2 que presentaron los cotiledones de calabaza zucchini estresados, la que no superó el límite de tolerancia cuando las plántulas se expusieron a no más de 12h de estrés por calor (Figura 1b). En consecuencia, se pudo haber presentado un pequeño incremento en los niveles de O_2^* , que es el sustrato de la enzima SOD. Debido a lo anterior, la actividad SOD en los cotiledones de calabaza estresados por calor no fue mucho mayor que la condición control (Figura 2a). En concordancia con estos resultados, Sato *et al.* (2001) reportaron que plántulas de arroz sometidas a estrés (42°C durante 24h) no presentaron incrementos significativos en la actividad SOD, aun cuando se considera que la primera línea de defensa en células vegetales ante condiciones de estrés es comandada por la actividad SOD (Alscher *et al.*, 2002). Sin embargo, una completa protección celular no depende únicamente de la actividad SOD, sino del incremento en conjunto del resto de enzimas del sistema antioxidante (Apel y Hirt, 2004), donde la acción catalítica de APX y CAT es indispensable para la rápida eliminación del exceso de H_2O_2 generado por efecto del estrés calórico (Dat *et al.*, 2000).

En el presente modelo vegetal la cuantificación de APX y CAT en los cotiledones estresados a 45°C durante 12h mostró un incremento del 28% en la actividad de APX (Figura 2b) y un decremento del 54% en la actividad de CAT (Figura 2c), respecto al control (25°C). Apel

y Hirt (2004) reportan que cuando ocurre un desbalance en la actividad de las enzimas detoxificantes de las ERO debido a una condición estresante, diversas especies de plantas inducen mecanismos compensatorios en el sistema antioxidante (aumento de actividad APX y disminución de la actividad CAT, o viceversa), tal como ocurrió en este trabajo (Figura 2). Se ha reportado que la actividad CAT en diversas especies de plantas presenta sensibilidad diferencial al estrés por temperaturas extremas (Hertwig *et al.*, 1992). A pesar de esta situación, en plántulas de calabaza los cotiledones estresados mostraron un incremento en la actividad APX que compensa la reducción en la actividad CAT. Este mismo efecto coincide con lo reportado por Sato *et al.* (2001) en plántulas de arroz estresadas a 42°C durante 24h.

Los resultados de esta evaluación permitieron establecer como modelo a las plántulas de calabaza zucchini expuestas a 45°C durante 12h, en las cuales fue posible inducir el estrés por calor requerido para que el sistema antioxidante del modelo de estudio estuviera afectado ligeramente y no fuera dañado irreversiblemente.

Aislamiento y caracterización de los OG activos

La fracción soluble (ME) resultante del proceso de la hidrólisis enzimática de la pared celular de *T. harzianum* incrementó la actividad de las enzimas SOD y APX y mantuvo la actividad CAT en los cotiledones de calabaza zucchini sometidos a estrés a 45°C durante 12h (Figura 2), por lo que se inició un aislamiento biodirigido de los OG activos. El primer fraccionamiento de la ME se realizó por CET, obteniéndose

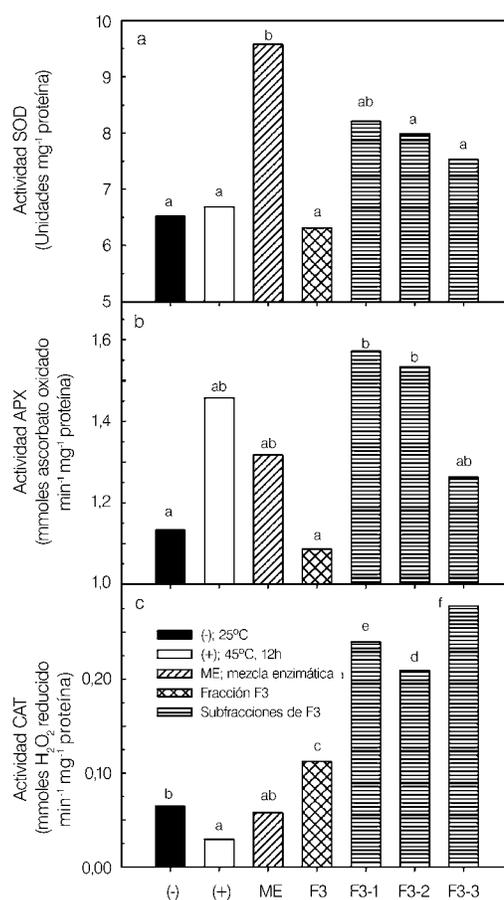


Figura 2. Efecto de los oligoglucanos de *T. harzianum* sobre el sistema antioxidante enzimático en cotiledones de calabaza zucchini con estrés por calor (45°C, 12h). Actividad enzimática de SOD (a), APX (b) y CAT (c). Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

se 95 fracciones; de estas fracciones se formaron tres grupos que representaban los componentes de pared celular con masa molecular mayor (F1), igual (F2) y menor (F3) a 6kDa, respectivamente (Figura 3a). El grupo de fracciones que integraron F3 incrementó únicamente la actividad de CAT en un 280% (Figura 2c), mientras que el efecto sobre la actividad SOD y APX no fue significativo ($p \leq 0,05$). Aún con este resultado, se procedió a sub-fraccionar F3 por CIA, obteniéndose 45 sub-fracciones que fueron agrupadas, en base a su orden de elución (Figura 3b), en tres grupos (F3-1, F3-2 y F3-3). De estos grupos de sub-fracciones, F3-1 (Figura 3b) mostró tener la mayor capacidad para promover incrementos de actividad en el sistema antioxidante enzimático del presen-

te modelo de estudio (Figura 2).

La caracterización y cuantificación de los carbohidratos presentes en los OG activos se realizó por HPAEC-PAD. Este análisis mostró para la sub-fracción F3-1 una composición de cinco monosacáridos, que en orden cuantitativo fueron glucosa, arabinosa, xilosa, galactosa y manosa (Tabla I). La predominancia cuantitativa de glucosa en los OG de *T. harzianum* es coincidente con lo cuantificado en OG derivados de paredes celulares de *Phytophthora megasperma* var. *sojae* (Ayers *et al.*, 1976), *Pyricularia oryzae* (Yamaguchi *et al.*, 2000) y *Alternaria alternata* (Shinya *et al.*, 2006), donde la glucosa es el monosacárido más abundante.

Las variaciones en el contenido de carbohidratos en los OG obtenidos de paredes celulares de distintos hongos se relacionan con el método de hidrólisis empleado y el estado de desarrollo del hongo (Ruiz-Herrera y Sentandreu, 1989), más que a las variaciones de composición en la pared celular, ya que los hongos presentan diferencias en la composición y estructura de carbohidratos, inclusive dentro de un mismo género (Latgé, 2007). Por lo tanto, la composición y contenido de carbohidratos en los OG tiene influencia directa en el efecto biológico producido sobre las plantas, ya que el proceso de reconocimiento de estas moléculas de señalización está fuertemente relacionado con la composición química y arreglo estructural del OG (Fliegmann *et al.*, 2005).

Actividad biológica de OG en el sistema antioxidante enzimático

En los cotiledones de calabaza zucchini se observó un

TABLA I
CARBOHIDRATOS IDENTIFICADOS
EN OLIGOGLUCANOS ACTIVOS DE *T. Harzianum*

Monosacárido [†]	Tiempo de retención [†] (min)	Sub-fracción CIA (%) F3-1
Arabinosa	14,58	17,78 c
Galactosa	18,54	13,99 b
Glucosa	22,19	49,26 d
Xilosa	26,80	17,57 c
Manosa	31,16	3,40 a

Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (Duncan, $p \leq 0,05$).
[†] La identidad y tiempo de retención fue determinado por HPAEC-PAD.

efecto significativo ($p \leq 0,05$) en el incremento de la actividad de SOD por el tratamiento de inducción con ME, incrementando la actividad de SOD en 43% mientras que solo las sub-fracciones de los OG obtenidas por CIA incrementaron esta respuesta entre 13 y 23% (Figura 2a). Lo anterior indica que el efecto inductor en la actividad SOD debido a los OG es mayor cuando estos inductores son aplicados en una mezcla compleja que contenga OG de diversas características estructurales, que aplicando mezclas con OG de un peso molecular o carga eléctrica definida (Figura 3). El aumento transitorio de la actividad SOD debida al efecto inductor de los diferentes OG evaluados proporciona a los cotiledones de calabaza estresados una protección parcial en contra de las ERO como el anión superóxido que deteriora las membranas plasmáticas (Allakhverdiev *et al.*, 2008).

En el modelo de estudio evaluado, la mezcla de los OG no presento un incremento en la actividad APX superior al observado después de exponer las plántulas por 12h a 45°C, ya que esta condición por si misma incrementa esta actividad enzimática. También se apreció un decremento de actividad APX al tratar los cotiledones estresados con los OG de la fracción F3 (Figura 2b). Este efecto mínimo en el incremento de la actividad APX es similar a lo reportado en plantas de pepino (Song *et al.*, 2005) y papa (Park *et al.*, 2004), así como en plántulas de arroz

(Sato *et al.*, 2001) expuestas a condiciones similares de estrés por calor (42°C durante 24h y 40°C durante 4h, respectivamente). Así mismo, se observó que los OG de *T. harzianum* purificados por CIA afectaron ligeramente la actividad APX, incrementándola entre 5 y 8% respecto al valor detectado en los cotiledones de plántulas bajo estrés a 45°C (Figura 2b).

A pesar de que APX y CAT presentan afinidad para degradar el H₂O₂, ambas enzimas se localizan en organelos celulares diferentes. Además, APX requiere del poder reductor del ascorbato (Dat *et al.*, 2000), por lo cual puede estar limitada su acción detoxificante bajo las condiciones de estrés evaluado. Se ha reportado la reducción en los niveles de ascorbato en diversas especies vegetales debida a condiciones de estrés por calor (Nishikawa *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2008), lo que se podría relacionar con el efecto mínimo en el incremento de la actividad APX en cotiledones de calabaza zucchini encontrado en este trabajo (Figura 2b).

Respecto a las respuestas producidas en la actividad CAT por los OG en plántulas estresadas, se apreció un incremento gradual en la inducción de dicha actividad, siendo que su reducción debida al estrés por calor fue restablecida por efecto de los OG (Figura 2c). La aplicación de los OG en forma de ME y la fracción purificada F3 incrementaron la actividad CAT en 96 y 280%, respectivamente, mientras que los mayores in-

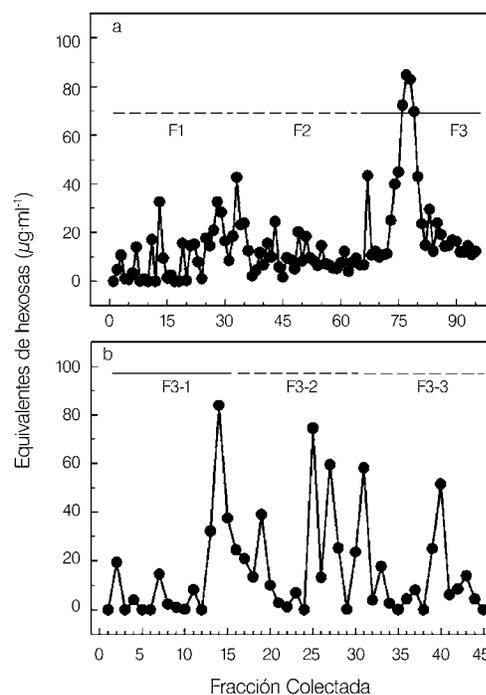


Figura 3. Purificación de los oligoglucanos activos derivados de la pared celular de *T. harzianum*. Fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaño (a) y sub-fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico (b); —: fracción analizada; ---: fracción descartada.

crementos en la actividad CAT fueron para las sub-fracciones F3-3, F3-1 y F3-2 con incrementos de 845, 710 y 608%, respectivamente, en comparación al control bajo estrés por calor (Figura 2c). Estos incrementos en la actividad de CAT compensan la actividad de APX en cotiledones de calabaza zucchini, que resultó afectada mínimamente por los OG evaluados en este trabajo.

Comparando la función de la enzima APX en la eliminación de H₂O₂, CAT no requiere de poder reductor para su funcionamiento (Dat *et al.*, 2000). Además, esta enzima posee una elevada velocidad de reacción que le permite eliminar grandes cantidades de H₂O₂ a pesar de la baja afinidad por el peróxido (Willekens *et al.*, 1997). La velocidad de reacción de una enzima se vuelve esencial cuando una planta se encuentra sometida a condiciones ambientales donde la sobreproducción de las ERO ocurre rápidamente, tal como se presentó en las plántulas de calabaza zucchini evaluadas en este trabajo y, en general, en

diversos cultivos que sufren los efectos directos del cambio climático. El incremento inducido por los OG en SOD, APX y CAT en las plántulas con estrés por calor (Figura 2), muestra la especificidad de los OG como moléculas de señalización, particularmente estimulando incrementos en la actividad enzimática de CAT del sistema antioxidante de *Cucurbita pepo* L. Debido a las características estructurales que puede presentar este grupo de sub-fracciones, cabe la hipótesis que en el modelo de estudio analizado ocurrió el reconocimiento de estos

inductores por parte de sus receptores específicos y, en consecuencia, un mayor incremento de la actividad enzimática del sistema antioxidante.

Conclusiones

La aplicación exógena de una sub-fracción de oligoglucanos (F3-1) derivados enzimáticamente de la pared celular de *Trichoderma harzianum* incrementa en más de 700% el nivel de actividad enzimática de catalasa en cotiledones de calabaza zucchini bajo estrés por calor a 45°C durante 12h. La elevada inducción de la actividad catalasa compensa el efecto transitorio conseguido por las sub-fracciones de oligoglucanos en la actividad ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa. Esto permite un reforzamiento del sistema antioxidante enzimático en cotiledones de calabaza bajo condiciones de estrés por altas temperaturas, facilitando a su vez una mejor respuesta de la planta ante situaciones ambientales adversas generada por el incesante cambio climático.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Socorro Vallejo-Cohen el apoyo técnico brindado en el aislamiento, identificación y propagación de *T. harzianum*, y a Francisco Soto-Córdova la contribución para detectar y cuantificar carbohidratos. Ambos colaboradores son técnicos titulares del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

REFERENCIAS

- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Meth. Enzymol.* 105: 121-126.
- Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 98: 541-550.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1331-1341.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Ayers AJ, Valent B, Ebel J, Alberstein P (1976) Host-pathogen interactions. XI. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. *Plant Physiol.* 57: 766-774.
- Bailey RW (1958) The reaction of pentoses with anthone. *Biochem. J.* 68: 669-672.
- Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Sharma KK (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep.* 27: 411-424.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cervilla L, Blasco B, Ríos J, Romero L, Ruiz J (2007) Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Ann. Bot.* 100: 747-756.
- Chivasa S, Hamilton JM, Pringle RS, Ndimba BK, Simon WJ, Lindsey K, Slabas AR (2006) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures. *J. Exp. Bot.* 57: 1553-1562.
- Cluzet S, Torregrosa C, Jacquet C, Lafitte C, Fournier J, Mercier L, Salamagne S, Briand X, Esquerre-Tugaye M, Dumas B (2004) Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant Cell Env.* 27: 917-928.
- Dat J, Vandenebelee S, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 779-795.
- Fliegmann J, Montel E, Djulic A, Cottaz S, Driguez H, Ebel MG (2005) Catalytic properties of the bifunctional soybean beta-glucan-binding protein, a member of family 81 glycoside hydrolases. *FEBS Lett.* 579: 6647-6652.
- Friedman H, Rot I (2006) Characterization of chilling injury in *Heliotropium arborescens* and *Lantana camara* cuttings. *Postharv. Biol. Technol.* 40: 244-249.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology in fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141: 312-322.
- Hertwig B, Streb P, Feierabend J (1992) Light dependence of CAT synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.* 100: 1547-1553.
- Inaba M, Crandall PG (1988) Electrolyte leakage as an indicator of high-temperature injury to harvested mature green tomatoes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 113: 96-99.
- Kombrink E, Hahlbrock K (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi: timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. *Plant Physiol.* 81: 216-221.
- Kreslavski V, Tatarinzev N, Shabnova N, Semenova G, Kosobryukhov A (2008) Characterization of the nature of photosynthetic recovery of wheat seedlings from short-term dark heat exposures and analysis of the mode of acclimation to different light intensities. *J. Plant Physiol.* 165: 1592-1600.
- Latgé JP (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* 66: 279-290.
- Laxalt AM, Cassia RO, Sanllorenti PM, Madrid EA, Andreu BD, Daleo GR, Conde RD, Lamatina L (1996) Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Mol. Biol.* 30: 961-972.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 11: 15-19.
- Nakano Y, Asada K (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* 28: 131-140.
- Nishikawa F, Kato M, Hyodo H, Ikoma Y, Sugiura M, Yano M (2003) Ascorbate metabolism in harvested broccoli. *J. Exp. Bot.* 54: 2439-2448.
- Nita-Lazar M, Heyraud A, Gey C, Braccini I, Lienart Y (2004) Novel oligosaccharides isolated from *Fusarium oxysporum* L. rapidly induce PAL activity in *Rubus* cells. *Acta Biochim. Pol.* 51: 625-634.
- Okinaka Y, Mimori K, Takeo K, Kitamura S, Takeuchi Y, Yamaoka N, Yoshikawa MA (1995) A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. *Plant Physiol.* 109: 839-845.
- Park SY, Ryu SH, Jang IC, Kwon SY, Kim JG, Kwak SS (2004) Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweet potato and its expression in response to stress. *Mol. Genet. Genom.* 271: 339-346.
- Radwan DEM, Fayed KA, Mahmoud SY, Hamad A, Lu G (2006) Salicylic acid alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by zucchini yellow mosaic virus infection in *Cucurbita pepo* leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69: 172-181.
- Rennenberg H, Loreto F, Polle A, Brilli F, Fares S, Beniwal RS, Gessler A (2006) Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biol.* 8: 556-571.
- Ruiz-Herrera J, Sentandreu R (1989) Fungal cell wall synthesis and assembly. *Curr. Top. Med. Mycol.* 3: 168-217.
- Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, Matsuba S, Saruyama H, Tanida M (2001) Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *J. Exp. Bot.* 52: 145-151.
- Shao HB, Chu LY, Lu ZH, Kang CM (2008) Primary oxidant scavenging and redox signaling in higher plants. *Int. J. Biol. Sci.* 4: 8-14.
- Shinya T, Menard R, Kozono I, Matsuoka H, Shibuya N, Kauffmann S, Matsuoka K, Saito M (2006) Novel β -1,3-, 1,6-oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco. *FEBS J.* 273: 2421-2431.
- Song XS, Hu WH, Mao WH, Ogwen JO, Zhou YH, Yu JQ (2005) Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 1082-1088.
- Suzuki N, Mittler R (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* 126: 45-51.
- Tanaka K, Otsubo T, Kondo N (1982) Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin-cycle SH enzymes in SO₂-fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 23: 1009-1018.
- Tang L, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Choi JS, Cho KY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS (2006) Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Rep.* 25: 1380-1386.
- Uhlmann A, Ebel J (1993). Molecular cloning and expression of 4-coumarate: coenzyme A ligase, an enzyme involved in the resistance response of soybean (*Glycine max* L.) against pathogen attack. *Plant Phys.* 102:1147-1156.
- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007) Heat tolerance in plants: An overview. *Env. Bot.* 61: 199-223.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816.
- Wu T, Cao J, Zhang Y (2008) Comparison of antioxidant activities and endogenous hormone levels between bush and vine-type tropical pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchense). *Sci. Hort.* 116: 27-33.
- Yamaguchi T, Yamada A, Hong N, Ogawa T, Ishii T, Shibuya N (2000) Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β -Glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell* 12: 817-826.