

UCH-FC.
MAD-B
C346
C.J

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO PARA INDUCTORES (ELICITORES)
EN LA RESPUESTA DEFENSIVA DE PLANTULAS DE *Citrus limon*
A LA INOCULACION POR HONGOS

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al grado de Magister en
Ciencias Biológicas

por

PATRICIA CASTAÑEDA PEZO

Enero 1994

Directora de Tesis: Dra. Luz María Pérez.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

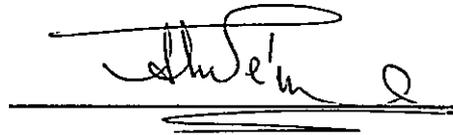
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

PATRICIA GEORGINA CASTAÑEDA PEZO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Botánica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 13 de Abril de 1994.....

Directora de Tesis

Doctora Luz María Pérez



Comisión Informante de Tesis

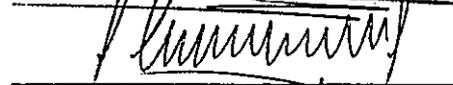
Doctor Eduardo Agosin



Doctora Liliana Cardemil



Doctor Luis Corcuera



Doctor Fernando Zambrano



A DAVID

A NATALIA

A CLAUDIA



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica General, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, y fué financiada por el proyecto FONDECYT 91/0886.

La realización de esta tesis fue posible gracias a la ayuda, compañerismo y amistad de numerosas personas, a quienes deseo expresar mis mas sinceros agradecimientos:

- a la Dra. Luz María Pérez, por su valiosa y continua asesoría en las diversas etapas de este trabajo de tesis, por enseñar no sólo como se hace ciencia sino también a luchar por principios éticos que deberían ser siempre los pilares de esta actividad y por enseñarnos a hacer de la ciencia algo humano, solidario y grato.

- a todas las profesoras del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Sra Aida Traverso, Dra. María Antonieta Valenzuela, Dra. Liliana Challet, Dra. Ana María Kettlun, Dra. Daniela Seelenfreund, Sra. Marta Mancilla y la Sra. Lucía Collados; por su grata acogida y amistad brindada en todo momento.



- a todos mis compañeros de laboratorio: Lilian Abugouch, Giugliana Campos, Beatriz Cantero, Mario Chiong, Eduardo López, Ximena Moncada, Ximena Opitz, Héctor "Tito" Pérez, Patricia Pozo, Humberto Prieto, Alex Quaas y Francisco Romero, por su amistad, compañerismo, solidaridad y "buena onda", tanto de los que ya egresaron como de los que aún permanecen. Quienes llegaron a conocer a este grupo pudieron confirmar, una vez más, que la diversidad es buena, por algo fue creada.

- a Daniela Seelenfreund, Nora Fanta y Angela Roco, por nuestra amistad...

- a León Bravo por su ayuda en la impresión y realización de los gráficos de esta tesis.

- a la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación por el apoyo brindado para la realización de este Magister; en especial a la Directora del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, Sra. Ximena Espinoza.

- a todos aquellos que de una u otra forma hicieron posible la realización de esta tesis.



INDICE GENERAL

Indice.....	i
Indice de Figuras.....	vi
Abreviaturas.....	viii
Resumen.....	x
Summary.....	xiii
1. INTRODUCCION.....	1
2. MATERIALES Y METODOS.....	15
2. 1. Reactivos químicos.....	15
2. 2. Material Biológico.....	16
2. 2. 1. Obtención de plántulas de <i>Citrus</i> <i>limon</i>	16
2. 2. 2. Crecimiento de <i>Alternaria alternata</i> y obtención de conidias.....	16
2. 2. 3. Obtención de Inductores (elicitores)...	17
2. 2. 3. 1. Obtención de endopoligalacturonasa.....	17
2. 2. 3. 2. Obtención de oligómeros totales de pared fúngica.....	17
2. 2. 3. 3. Obtención de oligosacáridos totales de plántulas de limonero.....	18
2. 2. 3. 4. Obtención de oligómeros totales de PGA.....	19
2. 2. 4. Técnicas cromatográficas para la obtención de oligosacáridos y oligómeros en forma individual.....	19
2. 2. 4. 1. Obtención de oligosacáridos con distinto número de unidades (equi- valentes) de ácido galacturónico, por cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex A-25.....	19
2. 2. 4. 2. Obtención de oligómeros con distinto número de unidades (equivalentes) de ácido galacturónico, por cromatogra- fía de intercambio iónico en QAE Sephadex A-25.....	20



2. 2. 4. 3.	Determinación del tamaño molecular de los oligosacáridos de plántulas de limonero y de los oligómeros de PGA por filtración en gel en Sephadex G-25.....	21
2. 3.	Determinación de la actividad de inductores (elicitores) sobre la respuesta de hipersensibilidad en plántulas de <i>Citrus limon</i>	22
2. 3. 1.	Actividad inductora de conidias de <i>Alternaria alternata</i>	22
2. 3. 2.	Actividad inductora de endopoligalacturonasa.....	25
2. 3. 3.	Actividad inductora de oligómeros totales de pared de <i>Alternaria alternata</i> (O-FCW).....	26
2. 3. 4.	Actividad inductora de un oligosacárido de 19 unidades de ácido galacturónico obtenido de paredde plántulas de limonero (O-PCW ₁₉).....	28
2. 3. 5.	Actividad inductora de un oligosacárido de 16 unidades de ácido galacturónico obtenido de PGA (O-PGA ₁₆).....	29
2. 4.	Preparación de homogeneizados ¹⁶ de plántulas de limonero.....	31
2. 5.	Sistemas enzimáticos y ensayos de actividad.....	31
2. 5. 1.	Endopoligalacturonasa (PGasa).....	31
2. 5. 2.	Fenilalanina amonio liasa (PAL).....	31
2. 5. 3.	Controles no enzimáticos.....	32
2. 6.	Cuantificación de proteínas.....	32
2. 7.	Cuantificación de azúcares.....	32
2. 7. 1.	Azúcares reductores.....	32
2. 7. 2.	Acido galacturónico.....	33
2. 7. 3.	Polietilén glicol.....	33
2. 8.	Efecto de anticuerpos anticonidias sobre la inducción de la PAL en plántulas de limonero infectadas con <i>A. alternata</i>	33
2. 9.	Efecto de la concentración de oligómeros de pared fúngica sobre la inducción de la PAL.....	34

2. 10.	Efecto de compuestos diferentes a los elicitores fúngicos o de plántulas de limonero sobre la inducción de la PAL.....	34
2. 10. 1.	Efecto de CaCl_2 $10\mu\text{M}$ sobre la inducción de la PAL.....	34
2. 10. 1. 1.	Efecto de CaCl_2 sobre la actividad de la PAL.....	35
2. 10. 2.	Efecto de distintas concentraciones de CaCl_2 sobre la inducción de PAL....	35
2. 10. 3.	Efecto del ionóforo de calcio, A23187 $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ sobre la inducción de la PAL.....	35
2. 10. 3. 1.	Efecto del ionóforo de calcio A23187 sobre la actividad de la PAL.....	36
2. 10. 4.	Efecto de diferentes concentraciones del ionóforo de calcio A23187, sobre la inducción de la PAL.....	36
2. 10. 5.	Efecto de diferentes concentraciones de Verapamil sobre la inducción de la PAL.....	37
2. 10. 5. 1.	Efecto de Verapamil sobre la actividad de la PAL.....	37
2. 10. 6.	Efecto de diferentes concentraciones de EGTA sobre la inducción de la PAL	37
2. 10. 6. 1.	Efecto del EGTA sobre la actividad de la PAL.....	38
2. 10. 7.	Efecto de diferentes concentraciones de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL.....	38
2. 10. 7. 1.	Efecto de Norarmepavina sobre la actividad de la PAL.....	39
2. 10. 8.	Efecto conjunto de ion Ca^{2+} y de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL.....	39
2. 10. 9.	Efecto de diferentes concentraciones de BaCl_2 sobre la inducción de la PAL.....	40
2. 10. 9. 1.	Efecto del BaCl_2 sobre la actividad de la PAL.....	40
2. 10. 10.	Efecto de diferentes concentraciones de MgCl_2 sobre la inducción de la PAL.....	41
2. 10. 10. 1.	Efecto del MgCl_2 sobre la actividad de la PAL.....	41

3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
3. 1. Determinación de la actividad de inductores (elicitores) sobre la respuesta de hipersensibilidad en plántulas de <i>C. limon</i> intactas.....	42
3. 1. 1. Actividad inductora de conidias de <i>A. alternata</i>	42
3. 1. 2. Actividad inductora de endopoligalacturonasa (PGasa) de <i>A. alternata</i> ..	46
3. 1. 3. Actividad inductora de O-FCW, de O-PCW ₁₉ y de O-PGA ₁₆	48
3. 2. Determinación de la actividad de inductores (elicitores) sobre la respuesta de hipersensibilidad en plántulas de <i>C. limon</i> con daño mecánico.....	51
3. 2. 1. Actividad inductora de conidias de <i>A. alternata</i>	52
3. 2. 2. Actividad inductora de endopoligalacturonasa (PGasa).....	56
3. 2. 3. Actividad inductora de O-FCW, de O-PCW ₁₉ y de O-PGA ₁₆	59
3. 3. Efecto de la concentración de oligómeros de pared fúngica sobre la inducción de la PAL.....	67
3. 4. Efecto de compuestos diferentes a los elicitores fúngicos ó de plántulas de limonero sobre la inducción de la PAL.....	70
3. 4. 1. Efecto de CaCl ₂ 10 µM sobre la inducción de la PAL.....	70
3. 4. 2. Efecto de diferentes concentraciones de CaCl ₂ sobre la inducción de la PAL.....	73
3. 4. 3. Efecto de CaCl ₂ sobre la actividad de la PAL.....	76
3. 4. 4. Efecto del ionóforo de calcio A 23187 1 x 10 ⁻² µM sobre la inducción de la PAL.....	77
3. 4. 5. Efecto de diferentes concentraciones del ionóforo de calcio A 23187 sobre la inducción de la PAL.....	79
3. 4. 6. Efecto del ionóforo de calcio A 23187 sobre la actividad de la PAL.....	79

3. 4. 7.	Efecto de diferentes concentraciones de Verapamil sobre la inducción de la PAL.....	81
3. 4. 8.	Efecto de Verapamil 50 μ M sobre la actividad de la PAL.....	81
3. 4. 9.	Efecto de diferentes concentraciones de EGTA sobre la inducción de la PAL.	84
3. 4. 10.	Efecto de EGTA 3 mM sobre la actividad de la PAL.....	84
3. 4. 11.	Efecto de diferentes concentraciones de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL.....	87
3. 4. 12.	Efecto de Norarmepavina 50 μ M sobre la actividad de la PAL.....	89
3. 4. 13.	Efecto conjunto de ion Ca^{2+} y de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL.....	91
3. 4. 14.	Efecto de diferentes concentraciones de $BaCl_2$ sobre la inducción de la PAL.....	92
3. 4. 15.	Efecto de $BaCl_2$ 10 μ M sobre la actividad de la PAL.....	95
3. 4. 16.	Efecto de diferentes concentraciones de $MgCl_2$ sobre la inducción de la PAL.....	95
3. 4. 17.	Efecto de $MgCl_2$ sobre la actividad de la PAL.....	97
4.	CONCLUSIONES.....	98
5.	BIBLIOGRAFIA.....	102

INDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1.	Obtención del tejido dañado.....	23
Figura 3. 1.	Actividad inductora de conidias de <i>Alternaria alternata</i> en plántulas de <i>Citrus limon</i> intactas.....	43
Figura 3. 2.	Germinación de conidias de <i>Alternaria alternata</i> en presencia y ausencia de IgG.....	45
Figura 3. 3.	Actividad inductora de endopoligalacturonasa (PGasa) de <i>A. alternata</i> en plántulas de <i>Citrus limon</i> intactas.....	47
Figura 3. 4.	Actividad inductora de O-FCW, O-PCW ₁₉ y de O-PGA ₁₆ en plántulas intactas de <i>C. limon</i>	49
Figura 3. 5.	Respuesta de plántulas de <i>C. limon</i> al daño mecánico.....	53
Figura 3. 6.	Actividad inductora de conidias de <i>A. alternata</i> en plántulas de <i>C. limon</i> dañadas...	54
Figura 3. 7.	Actividad inductora de PGasa de <i>A. alternata</i> en plántulas dañadas.....	57
Figura 3. 8.	Actividad inductora de O-FCW, O-PCW ₁₉ y O-PGA ₁₆ en plántulas dañadas.....	60
Figura 3. 9.	Efecto de la concentración de O-FCW sobre la inducción de PAL.....	68
Figura 3.10.	Efecto de CaCl ₂ 10 µM sobre la inducción de la PAL.....	71
Figura 3.11.	Efecto de diferentes concentraciones de CaCl ₂	74
Figura 3.12.	Efecto del ionóforo de Calcio A23187 0,01 µM sobre la inducción de la PAL.....	78
Figura 3.13.	Efecto de diferentes concentraciones de A23187 sobre la inducción de la PAL.....	80

Figura 3.14.	Efecto de Verapamil 50 μM sobre la inducción de la PAL por O-FCW.....	82
Figura 3.15.	Efecto de diferentes concentraciones de Verapamil sobre la inducción de la PAL inducida por CaCl_2 1 μM	83
Figura 3.16.	Efecto de diferentes concentraciones de EGTA sobre la inducción de la PAL.....	85
Figura 3.17.	Concentración de Calcio libre después de adicionar diferentes concentraciones de EGTA a plántulas dañadas en presencia de CaCl_2 1 μM	86
Figura 3.18.	Efecto de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL por CaCl_2 1 μM	88
Figura 3.19.	Efecto de diferentes concentraciones de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL en presencia de CaCl_2 1 μM	90
Figura 3.20.	Efecto conjunto de CaCl_2 y de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL.....	93
Figura 3.21.	Efecto de diferentes concentraciones de BaCl_2 sobre la inducción de la PAL.....	94
Figura 3.22.	Efecto de diferentes concentraciones de MgCl_2 sobre la inducción de la PAL.....	96

ABREVIATURAS

APD	Agar Papadextrosa
DEAE	Dietilaminoetil
DP	grado de polimerización
EGTA	Etilen glicol-bis (β -aminoetil eter) N,N,N',N'-ácido tetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Campo gravitacional
IgG	Inmunoglobulina G
O-FCW	Oligómeros de pared fúngica
O-PCW	Oligosacáridos de pared celular vegetal
O-PCW ₁₉	Oligosacárido de pared celular vegetal que contiene 19 unidades de ácido galacturónico.
O-PGA	Oligosacáridos obtenidos a partir de PGA.
O-PGA ₁₆	Oligosacárido obtenido a partir de PGA que contiene 16 unidades de ácido galacturónico.
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PEG	Polietilén glicol
PGA	Acido poligalacturónico
PGasa	Endopoligalacturonasa
PGU	Acido poligulurónico
PMA	Acido polimanurónico
PMSF	Fluoruro de parametil sulfonilo

QAE	Quetil aminoetil
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano
U	Unidad enzimática

RESUMEN

Las plantas responden a través de diferentes mecanismos a las interacciones abióticas y bióticas, que se producen en su medio. Esta capacidad está asociada a la presencia de metabolitos secundarios en ellas. Una de las interacciones más importantes es la relación planta-hongo patógeno. Dentro de ésta, se pueden establecer dos tipos de interacciones: compatible e incompatible. La primera causa enfermedad en la planta mientras que la segunda se caracteriza por una resistencia frente al ataque fúngico. La resistencia que presenta el vegetal frente al ataque fúngico, es mediada por el reconocimiento de elicitores (inductores) por parte de la célula vegetal. Estas moléculas cuyo origen puede ser diverso, son las que en definitiva inducen la respuesta defensiva en la planta. En términos generales se conoce con relativa claridad qué tipo de moléculas son capaces de inducir la respuesta defensiva, como asimismo los productos finales de defensa que se expresan en el vegetal. Sin embargo, el esclarecimiento de las etapas que median esta respuesta plantea la necesidad de una mayor investigación en este campo. El presente trabajo estuvo

orientado a la identificación de la secuencia de eventos que se producen durante la interacción planta-hongo patógeno. Se analizó el efecto de algunos inductores en la capacidad y velocidad de respuesta por parte de la planta, y se determinó el papel del ion Ca^{2+} en el proceso de transducción de la señal.

Para esto se usó como modelo la interacción de carácter incompatible entre *Citrus limon* y *Alternaria alternata*. Se probaron diferentes inductores tales como: conidias, endopoligalacturonasa, oligosacáridos fúngicos y vegetales, y oligómeros de PGA. Los inductores fueron probados tanto en plántulas enteras como con daño mecánico. Los resultados muestran que existe una temporalidad en los eventos que ocurren en la interacción planta-hongo, siendo el daño de la pared de la planta un factor determinante en la capacidad de respuesta de ésta. De todos los inductores probados los mejores resultaron ser los propios oligosacáridos de la pared vegetal; los oligosacáridos fúngicos tienen también un efecto inductivo importante. De los metales probados (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Ba^{2+}), el ion calcio resultó ser el más importante, adelantando e incrementando la magnitud de la respuesta defensiva de la planta. Se determinó además, si la participación de calcio ocurre a

través de canales iónicos, utilizando para ello bloqueadores de canales tales como verapamil y norarmepavina. Los resultados indican que existe participación de estos canales en el mecanismo de transducción de la señal.

En general, los resultados de este trabajo de tesis permiten concluir la existencia de la siguiente secuencia de eventos para que la planta desarrolle la respuesta de hipersensibilidad: a) secreción de enzimas hidrolíticas por el microorganismo, b) destrucción la pared celular vegetal como consecuencia de la acción de las enzimas del hongo, c) liberación de oligosacáridos de la pared del vegetal, d) reconocimiento específico entre oligosacáridos del vegetal y la célula, y e) cambio en los niveles de Ca^{+2} intracelulares. Otras etapas intermedias deberán dilucidarse en estudios a futuro.

SUMMARY

Plants respond to abiotic and biotic interactions using different mechanisms. Their ability for the establishment of interactions with other organisms has been related to the presence of secondary metabolites. The study of the biochemical basis of these interactions, is presently an active field of research.

One of the most important interactions is that of plant-phytopathogenic fungus. Compatible and incompatible interactions can be found among them.

Compatible interactions lead to the development of the disease; whereas, incompatible interactions are characterized by the inhibition of pathogen growth, lack of plant disease symptoms and in most cases, development of necrosis of tissues surrounding infection site.

Resistance of a plant against fungal attack is produced as a consequence of elicitor recognition by the plant. Molecules called elicitors, both from plant or fungal origin, can induce the defense response in plants. Many molecules have been described as elicitors, most of them of unknown oligosaccharide structure. The exact mechanism of

recognition between the elicitor and the plant cell is also unknown.

The present work has been oriented to identify the sequence of events intervening during plant-pathogenic fungus interaction. The effect of some elicitors in the capacity and the speed to induce response by the plant was analyzed. Also, the role of Ca^{2+} was determined during the process of signal transduction.

In this research, we used as a model the incompatible interaction between *Citrus limon* and *Alternaria alternata*. Different elicitors were tested: conidia, endopolygalacturonase, fungal and plant oligosaccharides, and PGA oligomers. Elicitors were tested on entire and on mechanically wounded plants. The results show that exist a time factor affecting the occurrence of events during the interaction, being wall damage a determinant factor in the capacity of response. Within various elicitor used, plant wall oligosaccharides were the best inducers. Fungal oligosaccharides also had an important inducing effect. Among the cations used (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}), calcium was the most important. Calcium increased the magnitude of the response and also shortened the time period to obtain the maximal defense response. In addition, Verapamil and Norarmepavine were employed to test whether calcium was mobilized through

ion-channels. The inhibitory effect of both of them, showed that exists channel participation in the signal transduction mechanism.

In general, the results of this work allow us to conclude that a sequence of events must operate in order to permit the development of the plant hypersensitive response: a) secretion of hydrolytic enzymes by the microorganism, b) destruction of plant cell wall, as a consequence of the action of microbial enzymes, c) release of oligosaccharides from the plant cell wall and exposure of internal structures, d) specific recognition between plant oligosaccharides and cell, and e) changes in intracellular calcium levels. The participation of other intermediate steps in the induction of the defense response will require further studies.

1. INTRODUCCION

1. 1. ANTECEDENTES GENERALES.

Las plantas que crecen en su ambiente natural, están constantemente sujetas a las variaciones e interacciones que se producen en éste. Entre las probables variaciones se pueden mencionar: las sequías, las inundaciones, las temperaturas extremas, la excesiva salinidad de algunos suelos, la presencia de metales pesados y la irradiación de alta intensidad. Por otra parte, son afectados también por la predación, la competencia, y la infección por agentes patógenos (virus, bacterias y hongos), etc. (West, 1981; Harborne, 1988). Las plantas poseen rutas metabólicas que les permiten responder a ambientes cambiantes con la suficiente rapidez y eficacia (Agris, 1988). Recientemente se ha correlacionado la presencia de los numerosos metabolitos secundarios que existen en la planta con la capacidad de éstas de establecer interrelaciones con otros organismos, permitiendo así su sobrevivencia (Swain, 1977; Bell, 1981; Harborne, 1988).

En la interacción planta-patógeno, las plantas pueden responder de las siguientes formas: a) desarrollando una respuesta hipersensitiva para impedir la invasión por el

patógeno. Esta respuesta incluye necrosis de la zona de infección, junto con la producción de fitoalexinas, síntesis de inhibidores de proteinasas y de enzimas hidrolíticas (glucanasas, quitinasas). Asimismo, también puede producirse depósito de proteínas ricas en hidroxiprolina en la pared celular del vegetal, síntesis de lignina, síntesis de callosa, etc.; y b) desarrollando la enfermedad producida por el patógeno. De esta forma, estos tipos de respuesta se definen como incompatible y compatible, respectivamente. En la interacción compatible, la planta es sensible a la infección, ya que es incapaz de inducir los sistemas de defensa con la velocidad adecuada para impedir la invasión del patógeno. En cambio, en la interacción incompatible, la planta tiene la capacidad de responder rápidamente, inhibiendo o disminuyendo el crecimiento del patógeno. La característica más común de la interacción incompatible es la ruptura de membranas de las células del hospedero, respondiendo "hipersensitivamente". La rápida necrosis de esas células puede resultar en la ruptura de las vacuolas, produciéndose así la muerte de esas células por autólisis. La ruptura de las vacuolas también puede resultar en la liberación de enzimas que digieren componentes de las paredes celulares del patógeno, o son de alguna otra forma inhibitorias del crecimiento del patógeno (Ayers y cols.,

1976; Agrios, 1988).

Una de las vías de infección que utilizan los patógenos es el apoplasto, definido como una red continua de espacios formado por las paredes celulares y el xilema (Levitt, 1957). Este espacio juega, además, un importante papel en el mecanismo de invasión de muchos patógenos que lo utilizan como vía de transporte a distancia (Bowles, 1990). El apoplasto es ahora reconocido como el sitio en el cual se originan las señales para inducir respuestas defensivas (Albersheim, 1976). La agresión física induce una respuesta del tejido vegetal, la que involucra el reestablecimiento de la barrera física de difusión, reparación del daño, y estimulación de nuevo crecimiento y diferenciación. Estos procesos deben ser rápidos y coordinados, ya que las zonas de daño son puntos importantes de entrada de patógenos, particularmente de virus. Algunos productos relacionados con la defensa se acumulan solamente en forma localizada, mientras que otros se acumulan tanto en forma localizada como sistémica, lo que involucra generalmente una amplificación masiva en la respuesta (Bowles, 1990).

Hay suficiente evidencia para suponer que tanto las respuestas sistémica como localizada, involucran la expresión coordinada de genes, es decir, diferentes genes de defensa son activados simultáneamente dentro de la misma célula en

respuesta a un mismo tipo de estímulo (Hahlbrock y Scheel, 1989).

Respuesta sistémica.

La respuesta sistémica se ha denominada comúnmente SAR (respuesta sistémica adquirida) la que se produce en tejidos distantes al sitio de daño. Estos tejidos son capaces de inducir genes de resistencia (Kuc, 1982), de inducirlos en forma coordinada (Ward y cols., 1991), para la síntesis de inhibidores de proteinasas (Roby y cols., 1987). Este hecho ha llevado a muchos investigadores a preguntarse cómo se transmite la señal desde la zona de daño a los tejidos alejados de ella. Se ha sugerido que una señal química móvil podría conectar la zona de daño con los tejidos sanos (Ross, 1966). Se han propuesto como candidatos para ello al ácido salicílico (Hanke, 1992; Raskin, 1992), a la sistemina (Pearce y cols., 1991), al metil jasmonato (Farmer y Ryan, 1990; Farmer y Ryan, 1992), al etileno (Enyedi y cols., 1992), y al ácido abscísico (Peña-Cortés y cols., 1989).

En relación a las vías encargadas de movilizar a estos metabolitos, aún no existen evidencias que apoyen o descarten definitivamente las vías floemática, xilemática, y apoplástica (Roberts, 1992). Alternativamente, se ha sugerido que podría ser una señal eléctrica (depolarización de la membrana plasmática) la que transmitiera la señal iniciada en

la zona de daño, hasta zonas intactas. En este último caso, se han diseñado experimentos en plántulas de tomate dañadas, para distinguir entre una señal química transmitida por el floema y una señal propagada físicamente basada en la actividad eléctrica. Estos experimentos demuestran que la translocación en el floema puede ser completamente inhibida sin impedir que la señal eléctrica se propague, lo que sugiere que en la respuesta SAR podría estar operando más de un mecanismo o tipo de señal (Wildon y cols., 1992).

Respuesta localizada.

La respuesta localizada ha sido considerada como uno de los mecanismos más eficientes de defensa del tejido vegetal contra los patógenos (Agrios, 1988). Esta incluye, además de la necrosis de células circundantes del tejido atacado, la expresión de diferentes genes entre los cuáles podemos encontrar: a) los que codifican para un grupo de enzimas que forman parte de una vía metabólica específica, por ej. enzimas de la vía fenilpropanoide (Hahlbrock y Scheel, 1989); b) los que codifican para proteínas que no participan de vías metabólicas, como las correspondientes a proteínas estructurales, por ej. proteínas ricas en hidroxiprolina (Roby y cols., 1985), o enzimas que pueden degradar la pared de hongos y bacterias, por ej. quitinasas y glucanasas (Mauch y Staehelin, 1989), o enzimas que degradan

proteasas producidas por el microorganismo, por ej. inhibidores de proteinasas (Farmer y Ryan, 1992). Se ha descrito que ambos eventos pueden ocurrir por separado, o simultáneamente.

La activación de una vía metabólica, en respuesta al ataque por un patógeno, tiene como finalidad la formación de metabolitos secundarios que actúan como antimicrobianos (Lyon y Wood, 1975; Kuc y Rusch, 1985). Estos compuestos, a los que se ha denominado fitoalexinas, corresponden a metabolitos secundarios de bajo peso molecular, que se sintetizan solamente cuando la planta entra en contacto con microorganismos potencialmente patógenos (West, 1981). Se han descrito tres vías que se activarían para biosintetizar fitoalexinas en las plantas: la vía del acetato-malonato (que conduce a la formación de compuestos del tipo alcaloides), la vía del acetato-mevalonato (que conduce a la formación de isoprenoides), y la vía del ácido chiquímico que genera a los aminoácidos aromáticos. Entre éstos últimos, la fenilalanina (Phe) y la tirosina (Tyr) son considerados como los sustratos iniciales de la así llamada vía fenilpropanoide, que origina compuestos tan diversos como cumarinas, flavonoides, estilbenos y lignina (Kuc y Rusch, 1985). Las fitoalexinas pueden provenir de intermediarios producidos por cada una de estas vías por separado, o bien, incluir compuestos que se

generen a partir de la combinación de intermediarios provenientes de dos o más vías (Kuc y Rush, 1985). Adicionalmente, se ha descrito que la estructura química de las fitoalexinas que forma una determinada especie vegetal, está relacionada directamente con el tipo de metabolitos secundarios que naturalmente forma esa especie (West, 1981). Las enzimas necesarias para sintetizar este tipo de metabolitos, se encuentran presentes en niveles muy bajos o no detectables en tejidos sanos (Darwill y Albersheim, 1984).

Los sistemas vegetales estudiados en relación a la respuesta frente a microorganismos patógenos, han sido fundamentalmente aquellos que activan a la vía fenilpropanoide (Hahlbrock y Scheel, 1989), sin embargo, existen algunos ejemplos, como el caso de *Ricinus communis*, en el que se activa la vía isoprénica (Lee y West, 1981). Se ha denominado metabolismo general de fenilpropanoides a la secuencia de reacciones que convierten a la L-Phe en ésteres sustituidos de cinamil-coenzima A. Los productos de esta vía son precursores de muchos metabolitos secundarios involucrados en la resistencia a infecciones (Ebel, 1986).

La fenilalanina amonio liasa (PAL) es la enzima que cataliza la primera reacción de esta vía, y se ha demostrado que sus niveles aumentan en respuesta a diferentes tipos de inductores (elicitors) (Lamb, 1979; Kuhn y cols., 1984).

Además se ha demostrado que la actividad de la PAL aumenta justo antes de la producción de fitoalexinas (Kuc y Rush, 1985), coincidiendo con un aumento previo de los mRNA respectivos (Lois y cols., 1989; Walter y cols., 1988; Haberer y cols., 1989).

El término elicitor fue introducido por Keen y Bruegger (1977) para referirse a sustancias que inducen la síntesis de fitoalexinas en tejidos vegetales. Estos elicitores en realidad corresponden a inductores, los que pueden ser de origen biótico o abiótico. Los elicitores bióticos corresponden a sustancias con actividad inductora derivadas de microorganismos patógenos, o derivadas de vegetales (producto de la actividad de los microorganismos sobre el tejido de la planta). Los elicitores abióticos corresponden a agentes físicos y químicos, tales como sales de metales pesados, luz UV y blanca, frío, etileno y fungicidas, entre otros (West, 1981).

Aunque la molécula inductora y la respuesta final, es decir, la aparición de productos génicos de defensa, han sido caracterizados en pocos casos, aún no se sabe con certeza cuáles son las etapas que ocurren entre el proceso de reconocimiento del elicitor por la célula vegetal y la respuesta final de defensa. Estas etapas podrían incluir a sistemas enzimáticos en cascada, tal como se ha descrito para

el efecto de hormonas peptídicas en mamíferos (Conn y cols., 1987). Entre estas etapas, debería existir la participación de un segundo mensajero, el cual desencadenaría la cascada de eventos. En el caso de los tejidos vegetales se ha sugerido que tanto cAMP como el ion Ca^{2+} podrían cumplir dicha función (Kurosaki y cols., 1987), y que el efecto de ion calcio podría estar mediado por una ATPasa de membrana (DuPont y cols., 1990), o por la presencia de canales de calcio (Johannes y cols., 1991).

En relación a la presencia de receptores, se ha caracterizado el reconocimiento de elicitores de pared de *Phytophthora megasperma* por membranas aisladas de poroto de soya (Albersheim, 1976). Sin embargo, otro grupo de investigadores, trabajando con el mismo sistema vegetal pero usando un elicitor de *Verticillium dahliae*, describieron la posible formación de un complejo formado por el elicitor y un posible receptor, el cuál era internalizado por un proceso de endocitosis (Horn y cols., 1989). La información existente no permite afirmar cómo se podría iniciar la cascada de eventos que permite finalmente producir la respuesta defensiva de la planta frente al ataque por patógenos.

1. 2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS.

Las plantas de cítricos son atacadas en sus ambientes naturales, por hongos de la fumagina, definida como una asociación de hongos patógenos y saprófitos que se depositan sobre la superficie del vegetal, y cuya apariencia es la de un polvillo negro (Pérez y cols., 1991). El estudio de la capacidad de respuesta de diversas variedades de cítricos frente a la agresión por *Trichoderma harzianum* o por *Alternaria alternata*, demostró que *Citrus limon* es la especie que puede defenderse mejor del ataque fúngico (Quaas y cols., 1993). Estudios realizados con ambos hongos permitieron caracterizar a las celulasas y pectinasas que excretan (Aubá, 1988; Aubá y cols., 1993), determinando además la capacidad que tiene la PGasa de *A. alternata* para degradar pared celular de plántulas de limonero y generar oligosacáridos de distinto grado de polimerización, como una aproximación al fenómeno de infección del vegetal (Fanta y cols., 1992). La PGasa de *A. alternata* estaría representada al menos por tres isoformas, con distintos puntos isoeléctricos; las que poseen una MM igual o superior a 45 Kd. Todas ellas están altamente glicosiladas con glucosa y/o manosa (Bravo, 1992).

Estudios cinéticos de inducción de la vía fenilpropanoide en plántulas de limonero, demostraron que la

temporalidad de la respuesta del vegetal, depende del elicitor usado y de la integridad de la planta. Es así como conidias de *A. alternata* inducen a la PAL más tardíamente que la PGasa obtenida del mismo hongo, intervalo de tiempo que coincide con el período necesario para la fructificación del hongo y la producción de la enzima (Roco, 1990; Roco y cols., 1993). Además, se describió que solamente plántulas dañadas mecánicamente eran capaces de inducir a la PAL en respuesta a oligosacáridos. Estos, podrían corresponder a los verdaderos inductores (elicitores) de la respuesta del tejido vegetal, y podrían simular la infección por patógenos tal como ha sido propuesto para otras interacciones (Jin y West, 1984; Robertsen, 1986; Bruce y West, 1989). Además, la ausencia de respuesta de plántulas de limonero intactas al tratamiento con estos oligosacáridos, sugiere que para que exista una respuesta celular, debiera haber exposición de membrana plasmática o de zonas internas de la propia pared celular. La interacción del elicitor con un posible receptor, podría mediar la respuesta celular.

También se ha demostrado que la activación de la PAL en plántulas de limonero, se debe a la síntesis "de novo" de la enzima y no a una activación de enzima pre-existente (Roco, 1990). Resultados similares han sido informados para *Phaseolus vulgaris* (Edwards y cols., 1985) y para

Petroselinum crispum (Lois y cols., 1989).

Como consecuencia de la activación de la vía fenilpropanoide, cuantificada a través de la inducción de la PAL, se ha descrito la formación de dos metabolitos secundarios, los que se sintetizan como respuesta a la infección por *Trichoderma harzianum* (Pavani, 1992) o por *A. alternata* (Roco y cols., 1993): la 6,7-dimetoxicumarina o escoparona, y la 7-hidroxycumarina o umbeliferona.

Dada la necesidad de aportar más evidencias del mecanismo que opera tanto en el proceso de reconocimiento como de transducción de la señal al interior de la célula, es que en este trabajo de tesis se ha planteado la siguiente hipótesis y los objetivos que se detallan a continuación.

1. 3. HIPOTESIS.

Se postula la existencia de un mecanismo de reconocimiento específico del inductor (elicitador) para que exista una respuesta defensiva de la planta. En presencia del elicitador debiera desencadenarse una cascada de eventos que permita la transducción de la señal al interior de la célula vegetal. Si esta cascada existe, los putativos segundos mensajeros o sus análogos debieran poder simular a él o los inductores que gatillan esta respuesta.

1. 4. OBJETIVOS GENERALES.

- 1.- Establecer si existe un mecanismo de reconocimiento entre el elicitor de la respuesta defensiva y la célula vegetal.
- 2.- Determinar si otros compuestos pueden reemplazar a los elicitores en la inducción de la respuesta defensiva del vegetal.

1. 5. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1.- Analizar la respuesta de plántulas de limonero intactas, frente a la infección por conidias de *Alternaria alternata*; al tratamiento con sobrenadantes de medios de cultivo sumergidos del mismo hongo, realizados en presencia de pectina cítrica como fuente de carbono; y al tratamiento con oligosacáridos (fúngicos, vegetales y sintéticos).
- 2.- Analizar la respuesta de plántulas de limonero dañadas mecánicamente, frente al tratamiento con conidias, al tratamiento con sobrenadantes de medios de cultivo sumergidos del mismo hongo, realizados en presencia de pectina cítrica como fuente de carbono; y con oligosacáridos de origen fúngico, vegetal o sintético.

- 3.- Establecer la naturaleza del verdadero elicitor de la respuesta del vegetal.
- 4.- Establecer las características del reconocimiento entre el elicitor y la plántula de limonero.
- 5.- Establecer la participación de iones metálicos en la inducción de la respuesta defensiva de la planta.

2. MATERIALES Y METODOS

2. 1. Reactivos químicos.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las firmas mencionadas en cada caso:

- * Analar BDH Chemicals Ltd., Poole, Inglaterra: $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$.
- * Anasac, Chile: Captan^{MR} como fungicida general.
- * Carlo Erba, Milán, Italia: ác. bórico.
- * Difco, Detroit, Michigan, USA: caldo Sabouraud.
- * Fluka Chemika, A. G., Suiza: p-hidroxibifenilo, ác. galacturónico.
- * Gibco, Madison, USA: Agar.
- * Hopkin and William Ltd., Inglaterra: PEG-1.500, PEG-4.000, PEG-6000.
- * Manchery-Nagel, Alemania: papel filtro de 9 cm de diámetro.
- * Merck A. G., Alemania: ác. acético, acetona, CaCl_2 , CHCl_3 , HCl , H_2SO_4 , imidazol, KCl , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, metanol, molibdato de amonio, NaCl , Na_2SO_4 , Na_2SO_3 , Na_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ortoarseniato disódico, tartrato doble de Na y K, tetraborato de sodio.
- * Riedel De Häen A. G., Seelze-Hannover, Alemania: acetato de sodio, ác. peryódico, NaOH , BaCl_2 .
- * Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA: ácido

poligalacturónico (grado de polimerización 40-50), azul de Coomassie R-250, azul de dextrano, DEAE Sephadex A-25, EGTA, Ionóforo de Ca^{2+} A23187, β -mercaptoetanol, MgCl_2 , L-Phe, pectina, PMSF, QAE Sephadex A-25, Sephadex G-25, Verapamil.

La Norarmepavina fué cedida gentilmente por el Dr. Bruce Cassels.

2. 2. Material Biológico.

Se usaron plántulas y fragmentos de pared de *Citrus limon* y conidias, endopoligalacturonasa y fragmentos de pared celular de *Alternaria alternata*.

2. 2. 1. Obtención de plántulas de *Citrus limon*

Las plántulas se obtuvieron a partir de semillas extraídas de frutos de limón. Las semillas se esterilizaron, se hicieron germinar y crecieron en un ambiente controlado (28°C , ciclo luz oscuridad 16/8 y 1.000 lux) de acuerdo a lo descrito por Carvajal (1990). La edad de las plántulas con las cuales se trabajó fue de aproximadamente un mes.

2. 2. 2. Crecimiento de *Alternaria alternata* y obtención de conidias.

El hongo *A. alternata* se hizo crecer en medio sólido de Mandels (Mandels y cols., 1974) adicionado de pectina cítrica (3 g/L). La obtención de esporas se realizó de

acuerdo a lo descrito por Asociación Oficial de Químicos Analistas (A.O.A.C., 1980). La concentración de conidias en la solución de NaCl 0,85% se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer. Las conidias obtenidas por este procedimiento se utilizaron para infectar plántulas de *Citrus limon*, para la obtención de endopoligalacturonasa y de micelio fúngico.

2. 2. 3. Obtención de Inductores (elicitores)

2. 2. 3. 1. Obtención de endopoligalacturonasa.

Para la obtención de PGasa se inoculó medio líquido de Mandels (Mandels y cols., 1974) adicionado de pectina cítrica (3 g/L), con $1,45 \times 10^6$ conidias de *A. alternata* obtenidas según 2.1. El medio se incubó a 28°C con agitación orbital (100 rpm) tal como se ha descrito (Aubá, 1988). Al cuarto día de crecimiento, correspondiente al día de máxima excreción de PGasa, el medio de cultivo se filtró y se centrifugó a 10.000 x g para obtener en el sobrenadante la actividad de endopoligalacturonasa, y en la pella, al micelio fúngico (Aubá, 1988). El sobrenadante del medio de cultivo se concentró 20 veces por ultrafiltración a través de una membrana Amicon P-20, y de ahora en adelante nos referiremos a éste como PGasa.

2. 2. 3. 2. Obtención de oligómeros totales de pared fúngica.

El micelio fúngico obtenido según lo descrito en 2. 2. 3. 1. se homogeneizó tres veces en agua destilada en un

Potter-Eveljham durante 60 seg. Se centrifugó durante 10 min a 10.000 x gy la pella se homogeneizó en una mezcla de CHCl_3 : Metanol = 1 : 1 (v/v) y se volvió a centrifugar durante 10 min a 10.000 x g. La pella resultante se homogeneizó en acetona, se filtró a través de un embudo Büchner, y la fracción que quedó retenida en el filtro se secó al aire. Esto representa la fracción referida a la pared del micelio, de acuerdo a lo descrito (Anderson y cols., 1975). Esta preparación se hidrolizó térmicamente durante 20 min a 121°C en autoclave. La suspensión autoclavada se filtró, se centrifugó y se liofilizó. En el liofilizado se determinó la concentración de proteínas (sección 2. 6.) y la cantidad de azúcares reductores (sección 2. 7. 1.). La mezcla de oligómeros totales de pared fúngica se utilizó en los experimentos de inducción.

2. 2. 3. 3. Obtención de oligosacáridos totales de plántulas de limonero.

Los oligosacáridos se obtuvieron incubando 5 gr de plántulas de limonero enteras con 3.871 U totales de PGasa, a pH 4,8 y 30°C, durante 24 horas (Roco y cols., 1993). El medio de incubación correspondió a medio de Mandels líquido que contenía a la PGasa (sección 2. 2. 3. 1.). La mezcla de oligosacáridos totales se separó por cromatografía de

intercambio iónico en DEAE Sephadex A-25 (sección 2. 2. 4. 1.).

2. 2. 3. 4. Obtención de oligómeros totales de PGA.

Los oligómeros se obtuvieron de acuerdo al método de Robertsen (1986). Para ello, se autoclavó durante 20 min a 121° C, una solución de PGA preparada en acetato de sodio 50 mM pH 4,8 (1% p/v). La mezcla de oligómeros totales se separó por cromatografía de intercambio iónico en QAE Sephadex A-25 (sección 2. 2. 4. 2.).

2. 2. 4. Técnicas cromatográficas para la obtención de oligosacáridos y oligómeros en forma individual.

2. 2. 4. 1. Obtención de oligosacáridos con distinto número de unidades (equivalentes) de ácido galacturónico por cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex A-25.

La mezcla de oligosacáridos de pared de plántulas de limonero obtenida según la sección 2. 2. 3. 3., se absorbió en una columna (13 x 750 mm) rellena con DEAE Sephadex A-25 preparado según las instrucciones del fabricante (Pharmacia). La resina fué equilibrada en amortiguador Imidazol 10 mM pH 7,0, que contenía KCl 100 mM. Después de lavar con 2 volúmenes de columna del mismo amortiguador, los distintos oligosacáridos se eluyeron con 250 ml de una solución de KCl preparada en amortiguador Imidazol 10 mM pH 7,0, cuya

concentración varió en forma cóncava entre entre 100 y 300 mM, de acuerdo a lo descrito (Jin y West, 1984). Se colectaron fracciones de 5 ml, las que se analizaron de acuerdo a su contenido en azúcares reductores (sección 2. 7. 1.) y a ácido galacturónico (sección 2. 7. 2.). La muestra que contenía 19 unidades de 'ác. galacturónico (O-PCW₁₉), determinada según la sección 2. 2. 3. 7., se guardó para realizar experimentos de inducción de la respuesta defensiva de la planta.

2. 2. 4. 2. Obtención de oligómeros con distinto número de unidades (equivalentes) de ácido galacturónico por cromatografía de intercambio iónico en QAE Sephadex A-25.

La muestra de oligómeros totales de PGA obtenida según la sección 2. 2. 3. 4., se absorbió en una columna (13 x 750 mm) rellena con QAE Sephadex A-25 preparado según las instrucciones del fabricante (Pharmacia). La resina fué equilibrada en amortiguador Tris-HCl 60 mM pH 7,9. Después de lavar con 3 volúmenes de columna del mismo amortiguador, los distintos oligómeros se eluyeron con 250 ml de una solución de TRIS-HCl pH 7,9 cuya concentración varió en forma lineal entre entre 60 mM y 0,6 M, de acuerdo a lo descrito (Robertsen, 1986). Se colectaron fracciones equivalentes a 5 ml, las que se analizaron de acuerdo a su contenido en azúcares reductores (sección 2. 7. 1.) y a ácido galacturónico (sección 2. 7. 2.).

Los oligómeros que no eluyeron de la columna a una concentración 0,6 M de TRIS-HCl pH 7,9, fueron desplazados de su unión a la resina cambiando bruscamente la fuerza iónica desde 0,6 a 1,2 M Tris-HCl pH 7,9 y fueron analizados de igual forma. La muestra que contenía 16 unidades de ác. galacturónico (O-PGA₁₆), determinada según la sección 2. 2. 3. 7., se guardó para realizar experimentos de inducción de la respuesta defensiva de la planta.

2. 2. 4. 3. Determinación del tamaño molecular de los oligosacáridos de plántulas de limonero y de los oligómeros de PGA por filtración en gel en Sephadex G-25.

Se utilizó una columna de vidrio de 1,0 x 9,5 cm, la que se rellenó con Sephadex G-25. La resina se equilibró con amortiguador Imidazol 10 mM pH 7,0 que contenía KCl 100 mM. Cada fracción de las eluidas de las columnas de DEAE Sephadex A-25 (sección 2. 2. 4. 1.) y de la columna de QAE Sephadex A-25 (sección 2. 2. 4. 2.) se procesó en forma individual. Para ello cada una se aplicó a la columna de Sephadex G-25, la que se eluyó con el mismo amortiguador de equilibrio. Se colectaron fracciones equivalentes a 0,05 volúmenes de columna, las que se analizaron de acuerdo a su contenido en azúcares reductores (sección 2. 7. 1.) y a su contenido en ácido galacturónico (sección 2. 7. 2.). Las

fracciones que presentaron máximos de concentración de azúcares reductores se juntaron. El volumen de elución para cada fracción se comparó con el volumen de elución de PEG de diferente tamaño (PEG-1500, PEG-4000 y PEG-6000) usados para calibrar la columna. El volumen de exclusión se determinó usando azul de dextrano.

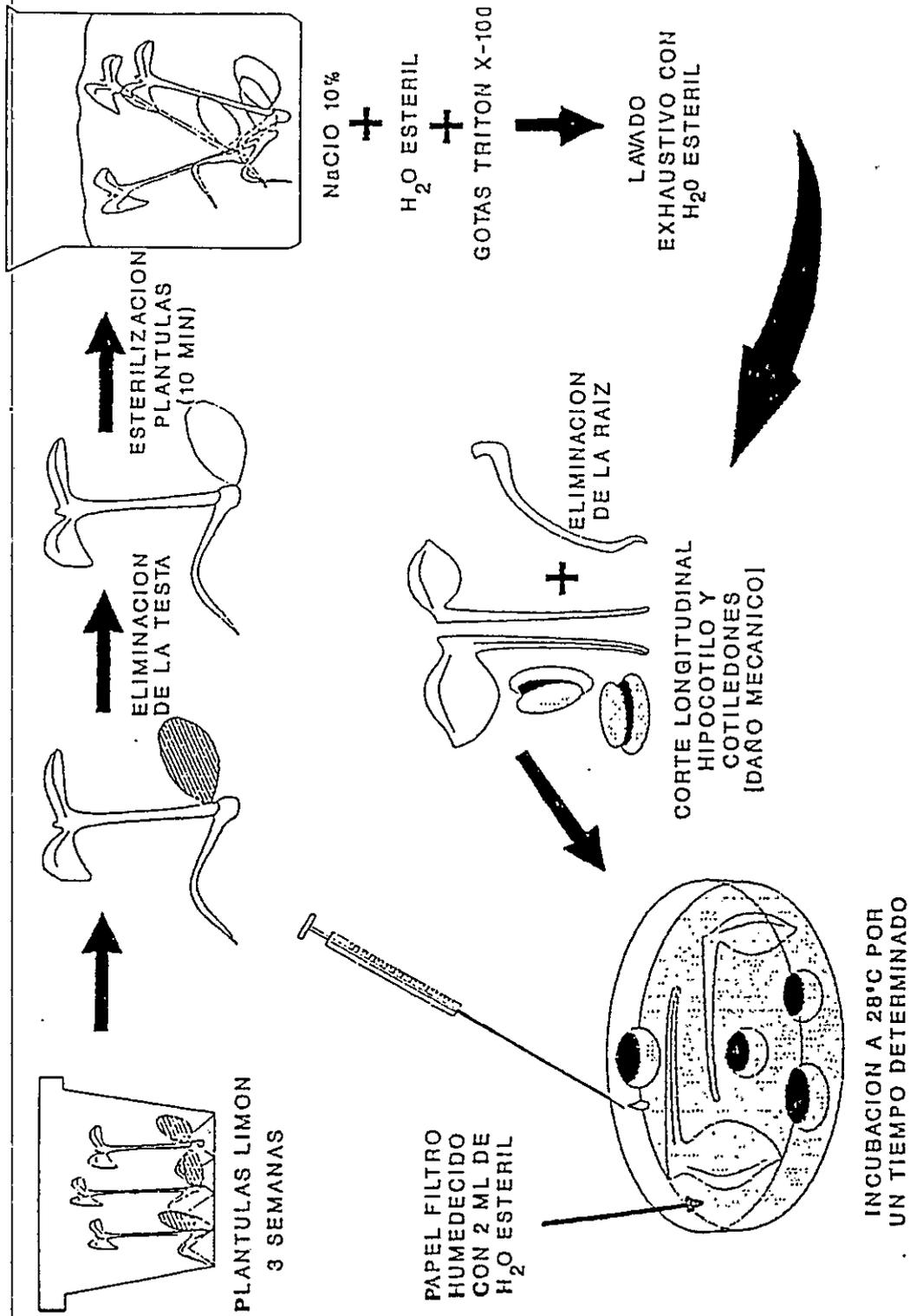
2. 3. Determinación de la actividad de inductores (elicitores) sobre la respuesta de hipersensibilidad en plántulas de *Citrus limon*.

La actividad inductora de diferentes elicitores se determinó cuantificando el aumento de actividad de PAL en plántulas de limonero. Para los experimentos se usó tanto plántulas enteras (sin daño), como plántulas dañadas mecánicamente en el laboratorio. El daño mecánico sobre la plántula se realizó a lo largo del eje hipocotilo-epicotilo y también en los cotiledones, con la ayuda de una hoja de bisturí, tal como se muestra en la Fig. 2. 1.

2. 3. 1. Actividad inductora de conidias de *Alternaria alternata*.

El efecto se estudió tanto en plántulas enteras como en aquellas con daño mecánico. Cada experimento se realizó con 1 gr de plántulas aproximadamente (5 plántulas). Estas se colocaron en placas Petri que contenían 10 ml de

Figura 2. 1.
Obtención del tejido dañado



medio Sabouraud y se inocularon con un total $1,45 \times 10^6$ conidias del hongo, preparadas en NaCl al 0,85%. Las placas se incubaron en estufa a 28°C. El aumento de actividad de PAL (sección 2. 5. 2.) se midió en homogeneizados de plántulas (sección 2. 4.) preparados a diferentes tiempos desde la infección.

Los controles se realizaron inoculando las placas Petri con el mismo volumen de NaCl al 0,85%. Cuando se usaron plántulas dañadas mecánicamente, se incluyó un control adicional correspondiente al efecto del daño mecánico per se (sección 2. 3.).

Cada punto experimental se cuantificó por duplicado, y cada experimento se realizó tres veces. Los resultados corresponden al promedio de todas las determinaciones realizadas, y se expresan como el cuociente entre la actividad de PAL en plántulas tratadas con conidias y plántulas controles. Para el caso de plántulas dañadas mecánicamente se calculó: a) el cuociente entre la actividad de PAL en la plántula dañada mecánicamente en relación a la misma actividad en la plántula intacta (control del efecto del daño mecánico) y b) el cuociente entre la actividad de PAL en plántulas dañadas mecánicamente y tratadas con conidias, y los valores calculados según a) para los mismos tiempos.

Adicionalmente se realizaron controles con conidias inactivadas térmicamente. Para ello las conidias activas obtenidas según la sección 2. 2. 2. se inactivaron autoclavándolas por un lapso de 40 min. Se consideró conidias inactivas a aquellas incapaces de formar micelio y esporular en medio Mandels Pectina, luego de transcurridos 7 días post-inoculación del medio. Los experimentos con conidias inactivadas térmicamente se realizaron en idénticas condiciones a las realizadas con conidias activas.

Los experimentos de rutina se realizaron incubando al tiempo en que se produjo la máxima respuesta de inducción de la PAL.

2. 3. 2. Actividad inductora de endopoligalacturonasa.

El efecto se estudió usando la enzima preparada a partir del hongo (sección 2. 2. 3. 1.), tanto en plántulas enteras como dañadas mecánicamente. Para ello las plántulas (1 gr) se pusieron en contacto directo con una solución de la enzima (10 mL), cuya actividad era de 0,2 U/ml, y se incubaron a 28 °C. El aumento de actividad de PAL (sección 2. 5. 2.) se midió en homogeneizados de plántulas (sección 2. 4.) preparados a diferentes tiempos desde el inicio del tratamiento. Cada punto se cuantificó en duplicado, y cada experimento se repitió tres veces.

Los controles se realizaron sustituyendo a la

solución enzimática por medio de Mandels - Pectina (sección 2. 2. 3. 1.) o bien realizando la incubación con la solución enzimática previamente desnaturalada durante 20 min a 100°C (Aubá, 1988).

Cada punto experimental se cuantificó por duplicado, y cada experimento se realizó tres veces. Los resultados corresponden al promedio de todas las determinaciones realizadas, y se expresan como el cuociente entre la actividad de PAL en plántulas tratadas con PGasa y plántulas controles. Para el caso de plántulas dañadas mecánicamente se calculó: a) el cuociente entre la actividad de PAL en la plántula dañada mecánicamente en relación a la misma actividad en la plántula intacta (control del efecto del daño mecánico) y b) el cuociente entre la actividad de PAL en plántulas dañadas mecánicamente y tratadas con PGasa, y los valores calculados según a) para los mismos tiempos.

Los experimentos de rutina se realizaron incubando al tiempo en que se produjo la máxima respuesta de inducción de la PAL.

2. 3. 3. Actividad inductora de oligómeros totales de pared de *Alternaria alternata* (O-FCW).

El efecto se estudió, tanto en plántulas enteras como con daño mecánico, utilizando la mezcla de O-FCW, preparada tal como se describió en la sección 2. 2. 3. 2. La

mezcla utilizada contenía 0,61 μ moles equivalentes de ácido galacturónico/mL y 0,12 mg/mL de proteínas. Para ello las plántulas (1 g) se pusieron en placas de Petri en contacto directo con la mezcla de O-FCW (100 μ g equiv. de glucosa), y se incubaron a 28°C. El aumento de actividad de PAL (sección 2. 5. 2.) se midió en homogeneizados de plántulas (sección 2. 4.) preparados a diferentes tiempos desde el inicio del tratamiento. Cada punto se cuantificó en duplicados, y cada experimento se repitió tres veces.

Los controles se realizaron sustituyendo a la solución de O-FCW por agua o bien realizando la incubación con la solución de O-FCW desnaturalada nuevamente durante 20 min a 100°C.

Cada punto experimental se cuantificó por duplicado, y cada experimento se realizó tres veces. Los resultados corresponden al promedio de todas las determinaciones realizadas, y se expresan como el cuociente entre la actividad de PAL en plántulas tratadas con O-FCW y plántulas controles. Para el caso de plántulas dañadas mecánicamente se calculó: a) el cuociente entre la actividad de PAL en la plántula dañada mecánicamente en relación a la misma actividad en la plántula intacta (control del efecto del daño mecánico) y b) el cuociente entre la actividad de PAL en plántulas dañadas mecánicamente y tratadas con O-FCW, y los

valores calculados según a) para los mismos tiempos.

Los experimentos de rutina se realizaron incubando al tiempo en que se produjo la máxima respuesta de inducción de la PAL.

2. 3. 4. Actividad inductora de un oligosacárido de 19 unidades de ácido galacturónico obtenido de pared de plántulas de limonero (O-PCW₁₉).

El efecto se estudió, tanto en plántulas enteras como con daño mecánico, utilizando un oligosacárido que contenía 19 unidades de ácido galacturónico, preparado y aislado tal como se describió en las secciones 2. 2. 3. 1. y 2. 2. 4. 1. La muestra utilizada contenía 100 µg de azúcares reductores. Para ello las plántulas (1 g) se pusieron en placas de Petri en contacto directo con el O-PCW₁₉, y se incubaron a 28°C. El aumento de actividad de PAL se midió en homogeneizados de plántulas (sección 2. 4.) preparados a diferentes tiempos desde el inicio del tratamiento. Cada punto se cuantificó en duplicados, y cada experimento se repitió tres veces.

Los controles se realizaron sustituyendo a la solución de O-PCW₁₉ por agua destilada estéril, o bien realizando la incubación con la solución de O-PCW₁₉ desnaturalada durante 20 min a 100°C.

Adicionalmente, se realizó un control agregando a 1

g de plántulas, 100 μ g equivalentes de glucosa de O-PCW₁₉ previamente tratados con 19 U de PGasa. En una alícuota hidrolizada en paralelo, se comprobó la hidrólisis total cuantificando ácido galacturónico (sección 2. 7. 2.).

Cada punto experimental se cuantificó por duplicado, y cada experimento se realizó tres veces. Los resultados corresponden al promedio de todas las determinaciones realizadas, y se expresan como el cociente entre la actividad de PAL en plántulas tratadas con O-PCW₁₉ y plántulas controles. Para el caso de plántulas dañadas mecánicamente se calculó: a) el cociente entre la actividad de PAL en la plántula dañada mecánicamente en relación a la misma actividad en la plántula intacta (control del efecto del daño mecánico) y b) el cociente entre la actividad de PAL en plántulas dañadas mecánicamente y tratadas con O-PCW₁₉, y los valores calculados según a) para los mismos tiempos.

Los experimentos de rutina se realizaron incubando al tiempo en que se produjo la máxima respuesta de inducción de la PAL.

2. 3. 5. Actividad inductora de un oligosacárido de 16 unidades de ácido galacturónico obtenido de PGA (O-PGA₁₆).

El efecto se estudió, tanto en plántulas enteras como con daño mecánico, utilizando un oligosacárido

que contenía 16 unidades de ácido galacturónico, preparado y aislado tal como se describió en las secciones 2. 2. 3. 2. y 2. 2. 4. 2. La muestra utilizada contenía 100 μ g de azúcares reductores. Para ello las plántulas (1 gr) se pusieron en placas de Petri en contacto directo con el O-PGA₁₆ y se incubaron a 28°C. El aumento de actividad de PAL (sección 2. 5. 2.) se midió en homogeneizados de plántulas (sección 2. 4.) preparados a diferentes tiempos desde el inicio del tratamiento. Cada punto se cuantificó en duplicado, y cada experimento se repitió tres veces.

Los controles se realizaron sustituyendo a la solución de O-PGA₁₆ por agua destilada estéril, o bien realizando la incubación con la solución de O-PGA₁₆ desnaturada durante 20 min a 100°C.

Cada punto experimental se cuantificó por duplicado, y cada experimento se realizó tres veces. Los resultados corresponden al promedio de todas las determinaciones realizadas, y se expresan como el cuociente entre la actividad de PAL en plántulas tratadas con O-PGA₁₆ y plántulas controles. Para el caso de plántulas dañadas mecánicamente se calculó: a) el cuociente entre la actividad de PAL en la plántula dañada mecánicamente en relación a la misma actividad en la plántula intacta (control del efecto del daño mecánico) y b) el cuociente entre la actividad de PAL en

plántulas dañadas mecánicamente y tratadas con O-PGA₁₆, y los valores calculados según a) para los mismos tiempos.

Los experimentos de rutina se realizaron incubando al tiempo en que se produjo la máxima respuesta de inducción de la PAL.

2. 4. Preparación de homogeneizados de plántulas de limonero.

Los homogeneizados se prepararon utilizando plántulas completas (hipocotilos, radículas y cotiledones), o bien cotiledones e hipocotilos según lo descrito (Carvajal, 1990).

2. 5. Sistemas enzimáticos y ensayos de actividad.

2. 5. 1. Endopoligalacturonasa (PGasa).

La actividad de PGasa obtenida de *A. alternata* (sección 2. 2. 3. 1.) se cuantificó midiendo la aparición de azúcares reductores (Somogyi, 1945; Nelson, 1944) de acuerdo a lo señalado en la sección 2. 7. 1. a partir del sustrato PGA de acuerdo a lo descrito (Lee y West, 1981; Aubá, 1988). Los valores de actividad corresponden a los obtenidos en velocidades iniciales, después de descontar los valores de los correspondientes controles no enzimáticos. La actividad enzimática se expresó como μ moles de azúcares reductores (glucosa) producidos por min (U).

2. 5. 2. Fenilalanina amonía liasa (PAL).

La actividad de PAL presente en homogeneizados de plántulas de cítricos (sección 2. 4.) se midió cuantificando la formación de ácido trans cinámico a 290 nm, de acuerdo a lo descrito por Zucker (1965). El medio de ensayo utilizado fué el descrito por Carvajal (1990). Los valores de actividad corresponden a los obtenidos en velocidades iniciales, después de descontar los valores de los correspondientes controles no enzimáticos. La actividad de la enzima se expresó como pkat/mg.

2. 5. 3. Controles no enzimáticos.

Se realizaron en las mismas condiciones que para la medición de la actividad enzimática, reemplazando a la fracción enzimática por enzima hervida (20 min para el control de la actividad de PGasa y 5 min para la actividad de PAL) o por el amortiguador de ensayo. Los valores obtenidos fueron descontados de los correspondientes valores de actividad enzimática.

2. 6. Cuantificación de proteínas.

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (1976).

2. 7. Cuantificación de azúcares.

2. 7. 1. Azúcares reductores.

Se determinaron de acuerdo al método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945; Nelson, 1944), usando glucosa como referencia (Mettifoggo, 1987; Aubá, 1988).

2. 7. 2. Acido galacturónico.

Se determinó usando p-hidroxibifenilo de acuerdo a lo descrito (Blumenkrantz y Hansen, 1973).

2. 7. 3. Polietilénglicol (PEG).

Se determinó por la reacción de PAS, usando ácido peryódico y bisulfito de sodio, como reductor (Segrest y Jackson, 1972).

2. 8. Efecto de anticuerpos anticonidias sobre la inducción de la PAL en plántulas de limonero infectadas con *A. alternata*.

Se estudió en las mismas condiciones mencionadas en la sección 2. 3. 1., adicionando en forma simultánea a la adición de las conidias, una dilución de 1:10 de un anticuerpo policlonal obtenido en contra de las conidias (Bravo, 1992). Los resultados corresponden a un promedio de 4 experimentos realizados en triplicado.

Los anticuerpos anticonidias de *A. alternata* fueron cedidos gentilmente por el Sr. Roberto Bravo (Bravo, 1992).

2. 9. Efecto de la concentración de oligómeros de pared fúngica sobre la inducción de la PAL.

Se estudió en las mismas condiciones mencionadas en la sección 2. 3. 3. adicionando diferentes alicuotas de una solución acuosa de O-FCW, preparada tal como se describió en la sección 2. 2. 3. 2. El rango de concentración empleado fue desde 0 a 300 μ gr equivalentes de glucosa. Los resultados corresponden a un promedio de tres experimentos realizados en triplicado.

2. 10. Efecto de compuestos diferentes a los elicitores fúngicos o de plántulas de limonero sobre la inducción de PAL.

Se estudió el efecto de ion Ca^{2+} , del Ionóforo de Ca^{2+} A23187, de Verapamil, de EGTA, de Norarmepavina, de BaCl_2 y de MgCl_2 , sobre la inducción de PAL. El estudio se realizó en las condiciones descritas en la sección 2. 3. 1. sustituyendo a los elicitores fúngicos ó de plántulas de limonero por los compuestos mencionados.

2. 10. 1. Efecto de CaCl_2 10 μ M sobre la inducción de la PAL.

El efecto se estudió solamente en plántulas con daño mecánico. Las plántulas se incubaron tal como se indica en la sección 2. 3. 1. adicionando una solución de CaCl_2 10 μ M. Los experimentos se realizaron con incubaciones entre 0 y 10

horas. A diferentes tiempos se prepararon homogeneizados (sección 2. 4.) en los que se cuantificó la actividad de PAL (sección 2. 5. 2.). El control realizado correspondió a la actividad de PAL encontrada en plántulas con daño mecánico (sección 2. 3. 1.). Los resultados corresponden al promedio de cinco experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 1. 1. Efecto de CaCl_2 sobre la actividad de PAL.

Como control se estudió el efecto directo de CaCl_2 10 μM sobre la actividad de PAL. Para ello se adicionó al medio de ensayo CaCl_2 , de modo que la concentración final resultara ser 10 μM .

2. 10. 2. Efecto de distintas concentraciones de CaCl_2 sobre la inducción de PAL.

Se realizaron experimentos dosis - respuesta utilizando plántulas de limonero dañadas mecánicamente. Las incubaciones se realizaron durante 3 y 7 horas, tal como se indicó en la sección 2. 10. 1. adicionando diferentes alícuotas de una solución de CaCl_2 de modo que la concentración final fluctuara entre 0,0625 y 10 μM . Los resultados corresponden al promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 3. Efecto del Ionóforo de Ca^{2+} , A23187 $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ sobre la inducción de la PAL.

El efecto se estudió solamente en plántulas con daño mecánico. Las plántulas se incubaron tal como se indica en la sección 2. 3. 1. adicionando una solución del ionóforo de Ca^{2+} $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$. Los experimentos se realizaron con incubaciones entre 0 y 10 horas. A diferentes tiempos se prepararon homogeneizados (sección 2. 4.) en los que se cuantificó la actividad de PAL (sección 2. 5.). El control realizado correspondió a la actividad de PAL encontrada en plántulas con daño mecánico (sección 2. 3. 1.). Los resultados corresponden al promedio de cinco experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 3. 1. Efecto del Ionóforo de Ca^{2+} A23187 sobre la actividad de PAL.

Como control se estudió el efecto directo del Ionóforo de Ca^{2+} A23187 sobre la actividad enzimática. Para ello se adicionó al medio de ensayo de cuantificación de PAL (sección 2. 5.), de modo que la concentración final resultara ser $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$.

2. 10. 4. Efecto de diferentes concentraciones del Ionóforo de Ca^{2+} A23187, sobre la inducción de la PAL.

Se realizaron experimentos dosis - respuesta utilizando plántulas de limonero dañadas mecánicamente. Las

incubaciones se realizaron tal como se indicó en la sección 2. 10. 1. adicionando diferentes alicuotas de una solución del Ionóforo de Ca^{2+} de modo que la concentración final fluctuara entre 1×10^{-3} a 1×10^1 μM en el medio de inducción. Los resultados corresponden al promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 5. Efecto de diferentes concentraciones de Verapamil sobre la inducción de la PAL.

Se realizaron experimentos dosis - respuesta utilizando plántulas de limonero dañadas mecánicamente. Las incubaciones se realizaron tal como se indicó en la sección 2. 10. 1. adicionando diferentes alicuotas de una solución de Verapamil de modo que la concentración final fluctuara entre 10 y 50 μM en el medio de inducción. El control realizado correspondió a la actividad de PAL encontrada en plántulas con daño mecánico (sección 2. 3. 1.). Los resultados corresponden al promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 5. 1. Efecto de Verapamil sobre la actividad de PAL.

Como control se estudió el efecto directo del Verapamil sobre la actividad enzimática. Para ello se adicionó al medio de ensayo de cuantificación de PAL (sección 2. 5.), de modo que la concentración final resultara ser 50 μM .

2. 10. 6. Efecto de diferentes concentraciones de EGTA sobre la inducción de la PAL.

Se realizaron experimentos dosis - respuesta utilizando plántulas de limonero dañadas mecánicamente. Las incubaciones se realizaron tal como se indicó en la sección 2. 10. 1. adicionando diferentes alícuotas de una solución de EGTA de modo que la concentración final fluctuara entre 0,25 y 3 mM en el medio de inducción. El control realizado correspondió a la actividad de PAL encontrada en plántulas con daño mecánico (sección 2. 3. 1.). Los resultados corresponden al promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 6. 1. Efecto del EGTA sobre la actividad de PAL.

Como control se estudió el efecto directo del EGTA sobre la actividad enzimática. Para ello se adicionó al medio de ensayo de cuantificación de PAL (sección 2. 5.), de modo que la concentración final resultara ser 3 mM.

2. 10. 7. Efecto de diferentes concentraciones de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL.

Se realizaron experimentos dosis - respuesta utilizando plántulas de limonero dañadas mecánicamente. Las incubaciones se realizaron tal como se indicó en la sección 2. 10. 1. adicionando diferentes alícuotas de Norarmepavina de modo que la concentración final

fluctuara entre 10 y 50 μM en el medio de inducción. El control realizado correspondió a la actividad de PAL encontrada en plántulas con daño mecánico (sección 2. 3. 1.). Los resultados corresponden al promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 7. 1. Efecto de Norarmepavina sobre la actividad de PAL.

Como control se estudió el efecto directo de la Norarmepavina sobre la actividad enzimática. Para ello se adicionó al medio de ensayo de cuantificación de PAL (sección 2. 5.), de modo que la concentración final resultara ser 50 μM .

2. 10. 8. Efecto conjunto de ion Ca^{2+} y de Norarmepavina sobre la inducción de PAL.

El experimento se realizó con plántulas de limonero dañadas mecánicamente según lo indicado en la sección 2. 3. 1. Los tratamientos incluyeron una incubación de 3 horas en presencia de CaCl_2 y se realizaron en las siguientes condiciones: a) A tiempo cero (daño mecánico) se agregaron en forma simultánea CaCl_2 1 μM y Norarmepavina 50 μM ; b) A tiempo cero (daño mecánico) se agregó Norarmepavina 50 μM y luego, a intervalos de 15 min (15, 30, 45 y 60 min) se agregó CaCl_2 1 μM . De esta forma, el tratamiento al que se le agregó CaCl_2 60 min después de haber agregado Norarmepavina, tuvo un tiempo de incubación total de 4 horas. Fué necesario, por lo tanto,

realizar dos tipos de controles con tratamientos semejantes a las del experimento: a') Control de daño mecánico a tiempos entre 3 y 4 horas, con puntos intermedios cada 15 min y b') adición de CaCl_2 1 μM a intervalos de 15 min (15, 30, 45 y 60 min) a partir del tiempo cero (daño mecánico). De esta forma, el tratamiento al que se le agregó CaCl_2 60 min después de haber realizado el daño mecánico, tuvo un tiempo de incubación total de 4 horas. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 9. Efecto de diferentes concentraciones de BaCl_2 sobre la inducción de la PAL.

Se realizaron experimentos dosis - respuesta utilizando plántulas de limonero dañadas mecánicamente. Las incubaciones se realizaron tal como se indicó en la sección 2. 10. 1. adicionando diferentes alícuotas de una solución de BaCl_2 de modo que la concentración final fluctuara entre 0,0625 y 10 μM en el medio de inducción. El control realizado correspondió a la actividad de PAL en plántulas con daño mecánico (sección 2. 3. 1.). Los resultados corresponden al promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 9. 1. Efecto del BaCl_2 sobre la actividad de PAL

Como control se estudió el efecto directo del BaCl_2 sobre la actividad enzimática. Para ello se adicionó al medio

de ensayo de cuantificación de PAL (sección 2. 5.), de modo que la concentración final resultara ser 10 μM .

2. 10. 10. Efecto de diferentes concentraciones de MgCl_2 sobre la inducción de PAL.

Se realizaron experimentos dosis - respuesta utilizando plántulas de limonero dañadas mecánicamente. Las incubaciones se realizaron tal como se indicó en la sección 2. 10. 1. adicionando diferentes alícuotas de una solución de MgCl_2 de modo que la concentración final fluctuara entre 0,5 y 10 μM en el medio de inducción. El control realizado correspondió a la actividad de PAL en plántulas con daño mecánico (sección 2. 3. 1.). Los resultados corresponden al promedio de cuatro experimentos realizados en triplicado.

2. 10. 10. 1. Efecto del MgCl_2 sobre la actividad de PAL.

Como control se estudió el efecto directo del MgCl_2 sobre la actividad enzimática. Para ello se adicionó al medio de ensayo de cuantificación de PAL (sección 2. 5.), de modo que la concentración final resultara ser 10 μM .

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3. 1. Determinación de la actividad de inductores (elicitores) sobre la respuesta de hipersensibilidad en plántulas de *C. limon* intactas.

3. 1. 1. Actividad inductora de conidias de *A. alternata*.

Las conidias de *A. alternata* indujeron la actividad de la PAL, observándose la mayor activación 24 horas después del tratamiento, confirmando lo descrito anteriormente (Roco y cols., 1993). La inducción máxima resultó ser de 11 veces con respecto al control. Las conidias inactivadas térmicamente no indujeron la actividad de la PAL. Además, el tratamiento de plántulas de limonero en presencia simultánea de conidias activas y de una dilución 1 : 10 de anticuerpos anticonidias, tampoco produjo inducción de la actividad de la PAL. Los anticuerpos por si mismos, tampoco fueron capaces de inducir la actividad de la enzima (Figura 3. 1.).

La ausencia de activación de PAL en plántulas de limonero tratadas con conidias inactivadas térmicamente, sugiere que el tratamiento modificó irreversiblemente a estas estructuras fúngicas. De hecho, las conidias inactivadas térmicamente no dieron origen a micelio, ni se desarrollaron cuando fueron sembradas en un medio APD, confirmando su

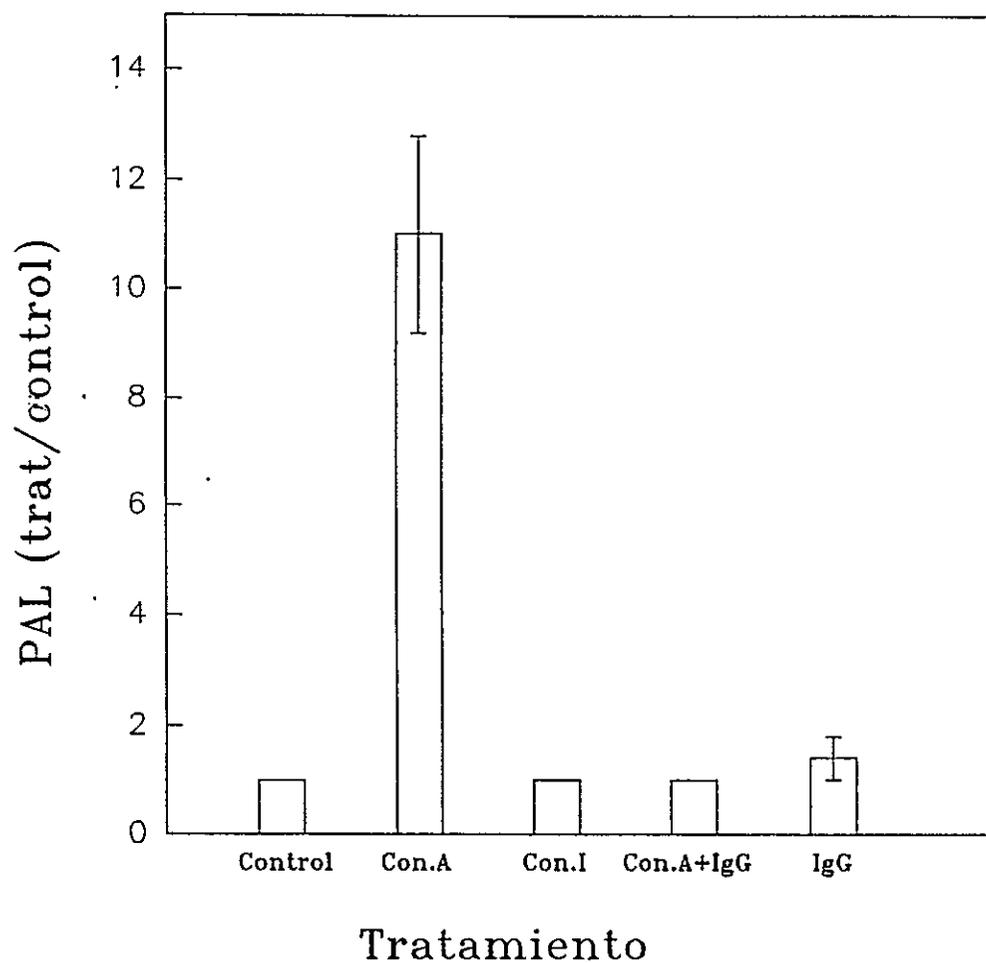


Figura 3.1 Actividad inductora de conidias de *Alternaria alternata* en plántulas de *Citrus limon* intactas. La actividad de la PAL fue cuantificada 24 h post-tratamiento. Control: NaCl 0.85%; A: activas; I: inactivadas por calor.

inactivación.

El tratamiento con calor desnatura proteínas, lo que permitiría sugerir que se requieren proteínas que mantengan su estructura nativa para inducir la respuesta de la planta. Estas podrían encontrarse tanto a nivel de la pared, como ser excretadas por el microorganismo.

Durante el proceso de infección de un tejido vegetal por un hongo, se produce una interacción física entre la conidia y la superficie de la planta. Una vez producido este reconocimiento, la conidia comienza a germinar emitiendo un tubo germinativo y excretando enzimas que le permiten hidrolizar los componentes de la pared celular vegetal, facilitando de esta forma su penetración dentro del tejido (Agrios, 1988). La ausencia de inducción de la PAL en respuesta al tratamiento con conidias en presencia de los anticuerpos, señala que probablemente los anticuerpos están impidiendo la interacción física directa entre la conidia y la superficie del vegetal. Estudios realizados en paralelo, en relación al efecto de estos anticuerpos sobre la germinación de las conidias, demostraron que los anticuerpos retardan la germinación de las mismas, desde las 4 horas hasta las 8 horas (Figura 3. 2.). Sin embargo, experimentos cinéticos realizados hasta 72 horas post tratamiento con conidias en presencia de anticuerpos anti-conidias, no

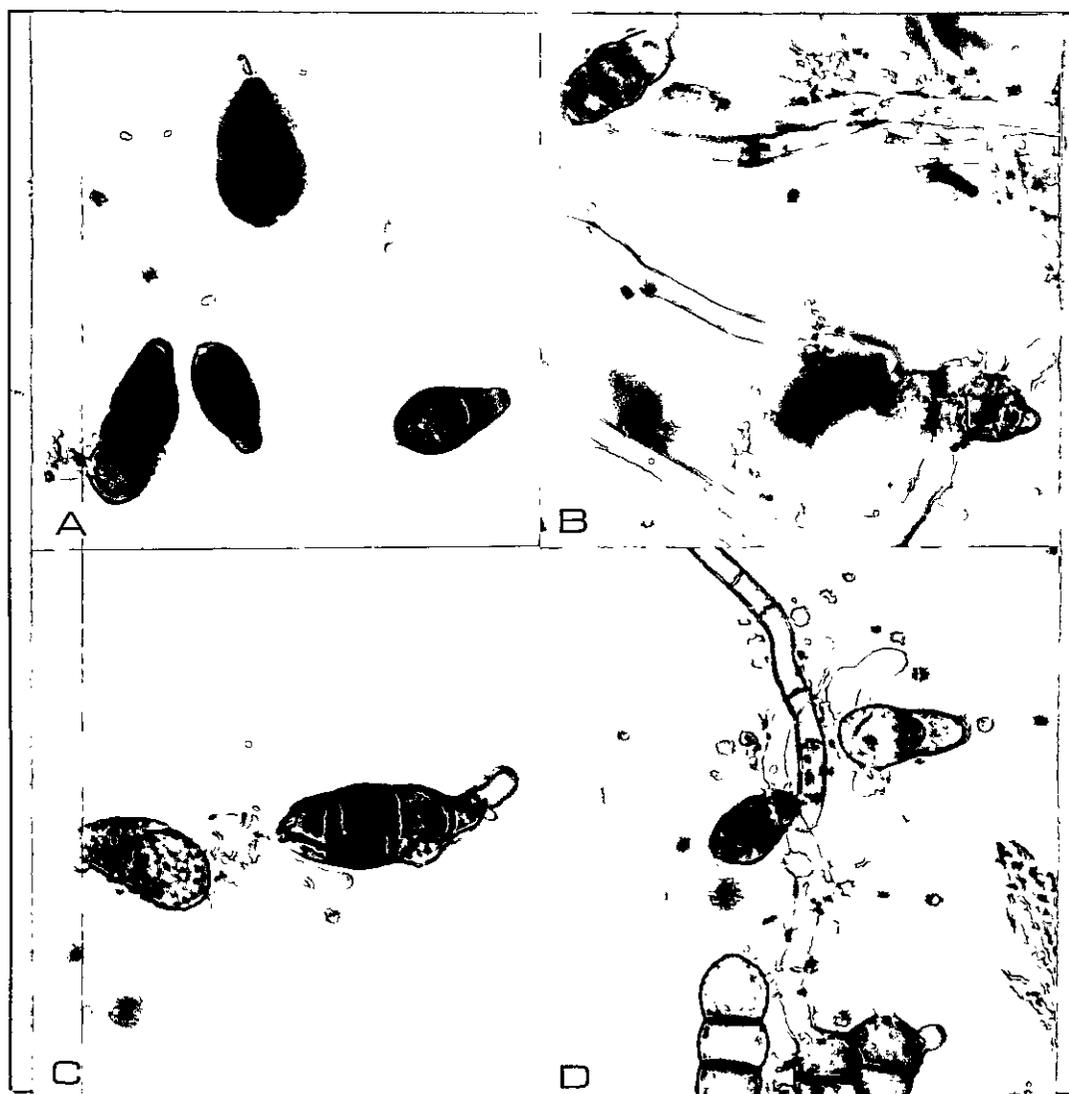


Figura 3.2 Germinación de conidias de *Alternaria alternata* en presencia y ausencia de IgG. A: Control tiempo cero, B: Control 4 horas, C: Conidias + IgG 4 horas, D: Conidias + IgG 8 horas.

mostraron una inducción tardía de la PAL. Este hecho sugiere que los anticuerpos están ejerciendo además otra acción, como por ej. modificar el metabolismo del hongo, o inhibir la secreción de PGasa; impidiendo de esta forma que el microorganismo actúe como un inductor de la respuesta del vegetal. Un efecto semejante se ha descrito en la respuesta de plántulas de limonero frente a la inoculación con conidias de *Trichoderma harzianum* en presencia de anticuerpos en contra de esas conidias (Quaas y cols., 1993).

3. 1. 2. Actividad inductora de endopoligalacturonasa (PGasa) de *A. alternata*.

La PGasa de *A. alternata* indujo la actividad de la PAL, observándose la mayor activación 20 horas después de iniciado el tratamiento, confirmando los resultados obtenidos anteriormente (Roco y cols., 1993). Si se compara la temporalidad de esta respuesta defensiva con la obtenida con conidias fúngicas, se puede apreciar un adelanto de cuatro horas. En este tiempo las conidias han comenzado a germinar y posiblemente a secretar PGasa, por lo tanto, este desfase era un resultado esperado. La inducción resultó ser siete veces con respecto al control. La enzima inactivada térmicamente no fué capaz de inducir la respuesta de la planta (Figura 3. 3.).

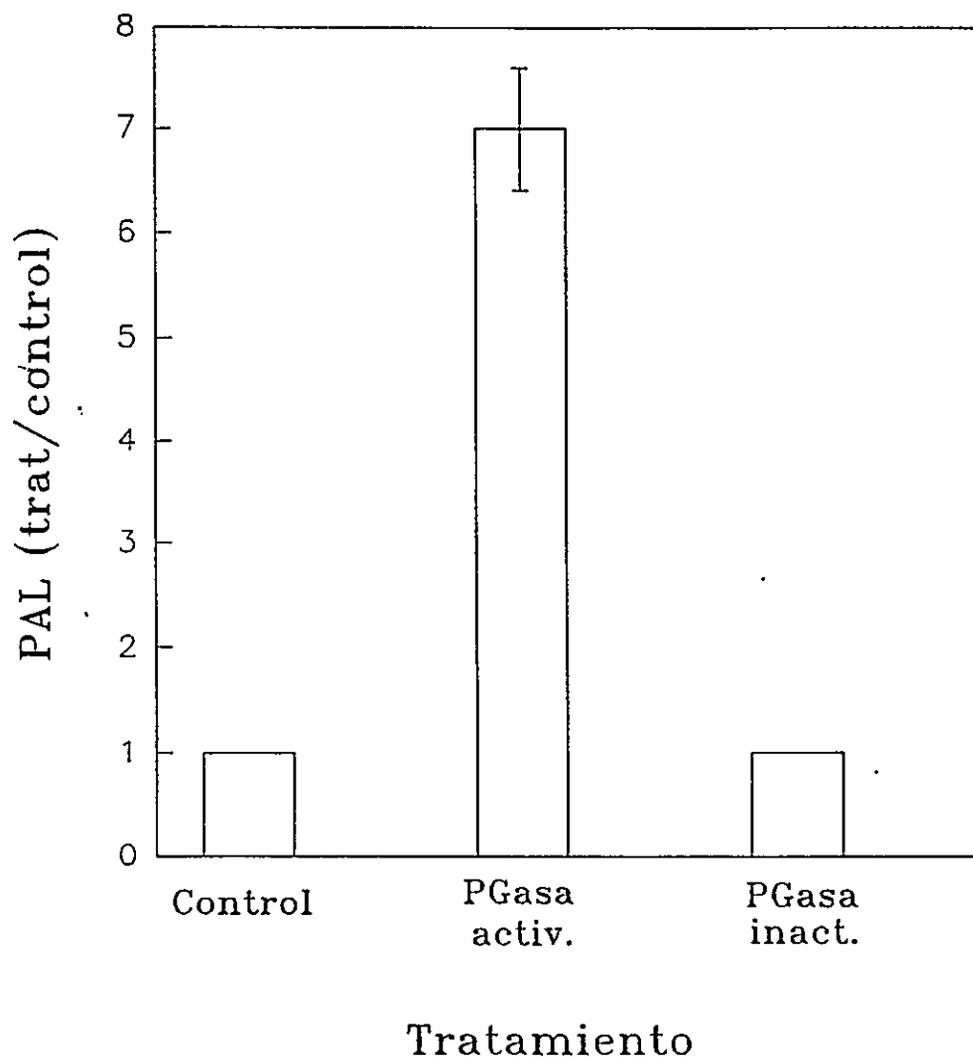


Figura 3.3 Actividad inductora de endopoligalacturonasa (PGasa) de *Alternaria alternata* en plántulas de *Citrus limon* intactas. La actividad de PAL fue cuantificada 20 h post-tratamiento. La PGasa fue inactivada por calor.

Existen numerosas evidencias que han permitido establecer que la acción de las enzimas pectolíticas es clave para el desarrollo de la infección (Collmer y Keen, 1986), y para la inducción de la defensa del tejido vegetal (Lee y West, 1981). Por lo tanto, el resultado obtenido con la PGasa inactivada térmicamente confirma la participación de esta enzima en la inducción de la respuesta de la planta.

3. 1. 3. Actividad inductora de O-FCW, de O-PCW₁₉ y de O-PGA₁₆.

Los siguientes oligosacáridos: O-FCW, O-PCW₁₉, O-PGA₁₆, no fueron capaces de inducir la actividad de la PAL en plántulas de limonero intactas en una cinética realizada hasta 32 horas (Figura 3. 4.). Estos mismos elicitors tratados térmicamente, se comportaron de igual forma. Al comparar nuestros resultados del tratamiento de plántulas de limonero intactas con los O-FCW, y lo que ocurre en otros sistemas, se encuentra que los modelos de trabajo que más se aproximan al nuestro son aquellos realizados con suspensiones celulares. Se ha descrito que elicitors de *Phytophthora megasperma* var. *sojae* inducen la respuesta de suspensiones celulares de perejil, aumentando la actividad de la PAL después de 8 horas de iniciado el tratamiento (Hahlbrock, K. y cols., 1981). Algo semejante ocurre en suspensiones

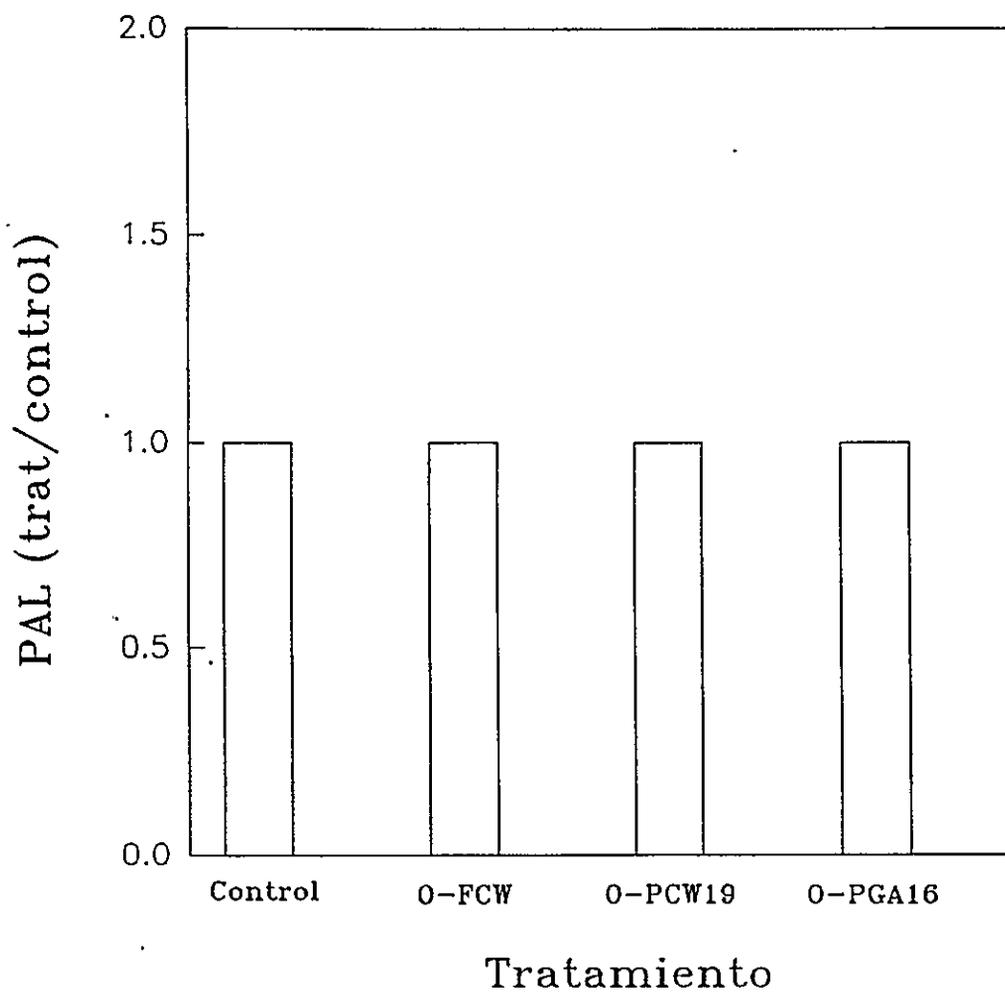


Figura 3.4. Actividad inductora de O-PCW19 y de O-PGA16 en plántulas intactas de *Citrus limon*. La actividad de PAL fue cuantificada entre 0 y 38 horas.

celulares de zanahoria tratadas con paredes de *Chaetomium globosum*, en donde se alcanza un máximo de actividad de la PAL entre 16 y 24 horas desde el inicio del tratamiento (Kurosaki, F. y cols., 1986). En este último caso, también se analizó el efecto que tenía la edad del cultivo sobre la capacidad de respuesta, encontrándose que la inducción de la PAL estaba fuertemente influenciada por éste: suspensiones celulares en fase activa de crecimiento inducían más a la PAL que suspensiones celulares envejecidas. En estas suspensiones de zanahoria se observaba la presencia de pared celular bien diferenciada. Por otra parte, hay que considerar que en las plántulas de limonero, las paredes celulares se encuentran impregnadas de cutina, la cual forma una cubierta protectora (cutícula) junto con las ceras que se encuentran embebidas en ella (Raven, P. y cols., 1992).

Se ha demostrado que glucanos β -1,3- β -1,6 producidos por hidrólisis ácida de micelio de *Phytophthora megasperma f.sp. glycinea*, compiten por el receptor para la síntesis de fitoalexinas en poroto de soya, en la medida que aumenta su grado de polimerización. Estos glucanos se unen con alta afinidad a fracciones microsomales y a protoplastos de esta especie vegetal. Los protoplastos carecen de pared celular; lo que sugiere que el reconocimiento no se produce a nivel de ésta, sino más bien a nivel de membrana plasmática,

la cuál también está representada en la fracción microsomal (Cosio, E. y cols., 1988; Cosio, E. y cols., 1990). Las plántulas de limonero intactas, no tienen expuesta a la membrana plasmática, por lo tanto, la ausencia de respuesta frente a estos oligosacáridos no es de extrañar, si es que el reconocimiento se produce exclusivamente a nivel de la membrana plasmática.

En relación a los O-PCW, la formación de oligómeros de diferentes tamaño, se produce por hidrólisis enzimática de plántulas intactas. Esta hidrólisis produce ruptura de la pared celular del vegetal, el que posteriormente responde activando la vía fenilpropanoide. Desde este punto de vista, los inductores podrían corresponder a estos oligosacáridos los que interactuarían con un tejido ya dañado por la enzima. En este caso, al realizar el tratamiento con plántulas de limonero intactas y al no existir daño previo del tejido, dicha interacción no se estaría produciendo, y por lo tanto, el tejido vegetal no activaría sus sistemas de defensa.

3. 2. Determinación de la actividad de inductores (elicitores) sobre la respuesta de hipersensibilidad en plántulas de *C. limon* con daño mecánico.

Antes de realizar estas determinaciones, se estudió el efecto del daño mecánico sobre la respuesta de la planta.

Se determinó que se producía inducción de la PAL, observándose un máximo de activación a las 8 horas (4 veces el control sin daño) (Figura 3. 5.). El hombro observado a las 4 horas, no se consideró como inducción en respuesta a daño mecánico. La activación de la PAL en respuesta a daño mecánico ha sido descrita en numerosas especies, entre ellas la papa (Joos y Halbrock, 1992). En estos casos junto a la activación de la PAL, como consecuencia del daño producido por el patógeno, se ha observado síntesis de proteínas ricas en hidroxiprolina, como la extensina, (Roby, D. y cols., 1985) y síntesis de lignina para la protección del área dañada (Farmer, E., 1985)

3. 2. 1. Actividad inductora de conidias de *A. alternata*.

Las plántulas de limonero con daño mecánico previo, indujeron la actividad de la PAL cuatro horas después del tratamiento con conidias activas o inactivadas térmicamente. La actividad de la PAL se indujo en respuesta a conidias activas o inactivadas térmicamente, 3,5 veces con respecto al control (daño mecánico), (Figura 3. 6.). En estos experimentos también se observó la activación de PAL a las ocho horas como respuesta frente a daño mecánico.

Las conidias activas comienzan a germinar a las 4 horas aproximadamente, por lo que no resulta factible

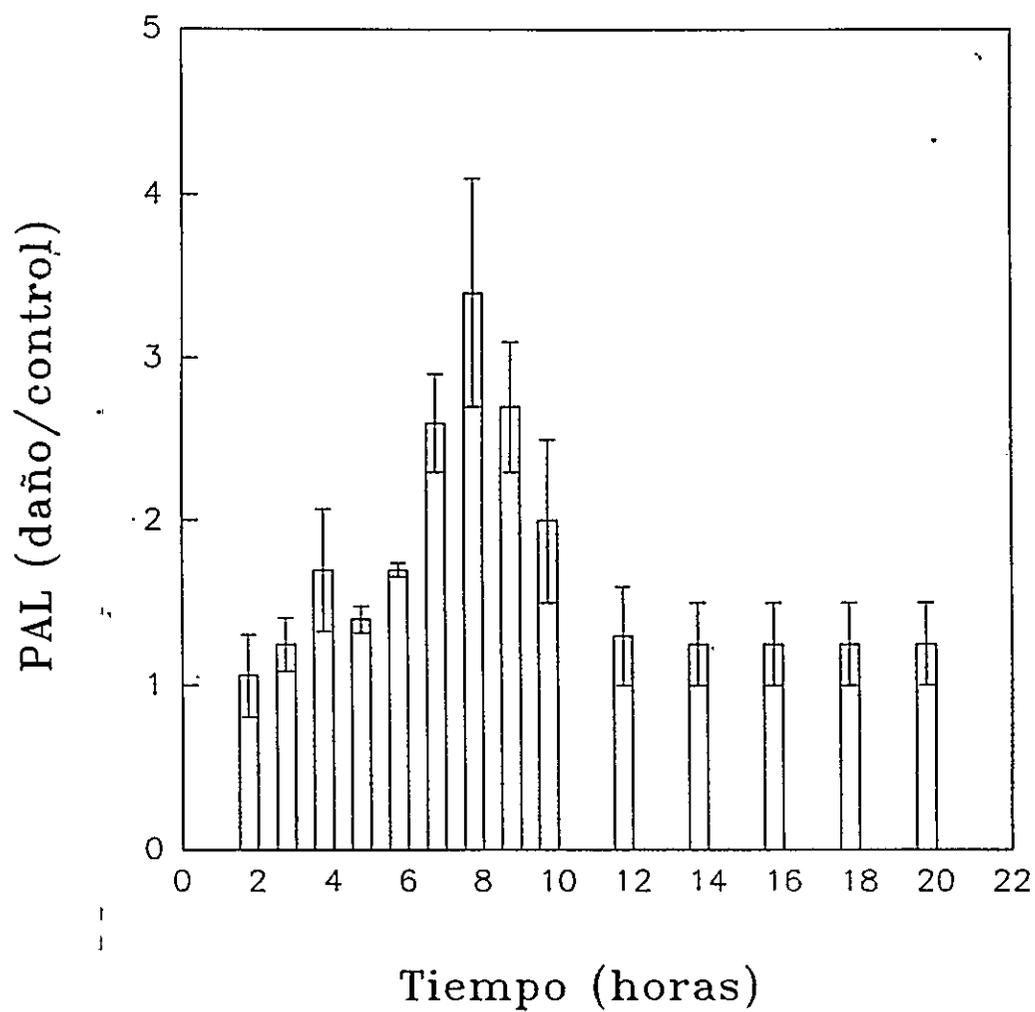


Figura 3.5 Respuesta de plántulas de *Citrus limon* al daño mecánico. Los controles correspondieron a plántulas intactas.

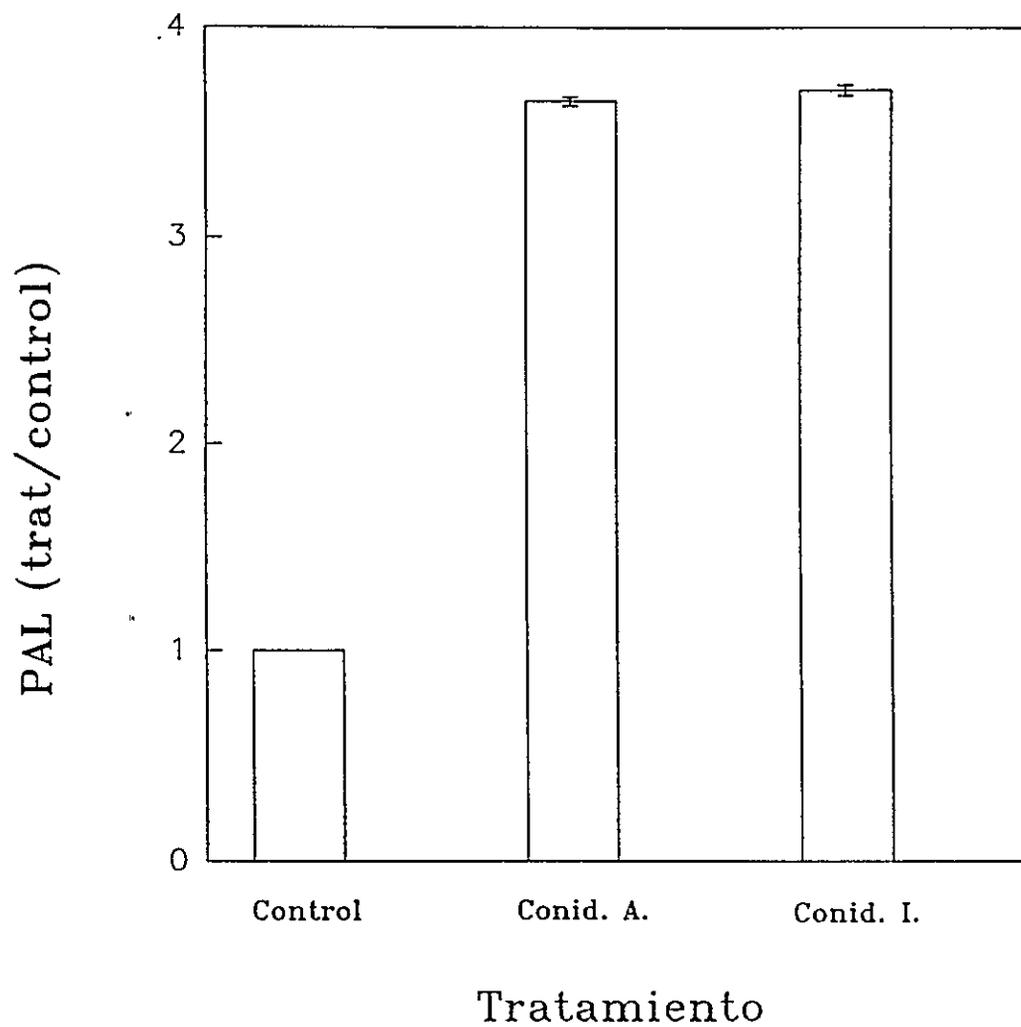


Figura 3.6. Actividad inductora de conidias de *Alternaria alternata* en plántulas de *Citrus limon* dañadas. La actividad de PAL se cuantificó 4 horas post-tratamiento. Control: daño mecánico, A: activa, I: inactivadas por calor.

explicar la respuesta de la planta a este tiempo, producto de la acción de PGasa excretada por el hongo. Por otra parte, la inducción de la PAL por conidias inactivadas térmicamente, permite descartar la participación de proteínas del hongo en el proceso de inducción. Ambos tipos de conidias comparten la presencia de oligosacáridos en su pared celular, los que no son modificados por el tratamiento térmico realizado y los que podrían estar interactuando con estructuras internas de la pared celular vegetal, para la inducción de la respuesta defensiva. *A. alternata* posee glucanos y quitina en su pared celular (Bartnicki-García, 1968), por lo que podría pensarse que alguno de estos componentes fuera reconocido por la célula vegetal.

La inducción de PAL en plántulas con daño mecánico se adelanta en 20 horas si se compara con la respuesta de plántulas intactas en relación al efecto inducido por las conidias. Si se considera que estructuras internas de la pared celular reconocen a los azúcares presentes en la pared de la conidia, se puede suponer que no es requisito que ésta germine y excrete PGasa para que se induzca la respuesta de defensa. Sin embargo, sí se puede afirmar que la plántula intacta no tiene en su superficie estructuras que reconozcan la presencia de estos polisacáridos.

3. 2. 2. Actividad inductora de endopoligalacturonasa (PGasa).

Las plántulas de limonero con daño mecánico previo, indujeron la actividad de la PAL, observándose un máximo de inducción 7 horas después del tratamiento con PGasa. La inducción fué de 10 veces con respecto al control (daño mecánico). La preparación enzimática inactivada térmicamente no indujo la actividad de la PAL (Figura 3. 7.); mientras que la inducción de la PAL a las 8 horas, en respuesta al daño mecánico, no se vió alterada.

Estos resultados confirman la necesidad de una preparación enzimática activa capaz de degradar la pared celular y dejar expuestas estructuras internas de la célula vegetal, como podría ser el plasmalema. Nuestra preparación enzimática tiene una alta actividad de PGasa, pero no podemos descartar que contenga otras actividades enzimáticas dentro de las cuáles podría encontrarse una actividad de cutinasa constitutiva. Esta enzima ha sido descrita para otros microorganismos (Kolatkudy). Si nuestra preparación enzimática tuviera esas características, es factible suponer que esta cutinasa podría iniciar la degradación de la pared de planta. A continuación, la PGasa continuaría con la hidrólisis de la pectina de la pared celular vegetal, permitiendo la liberación de oligosacáridos de diferentes

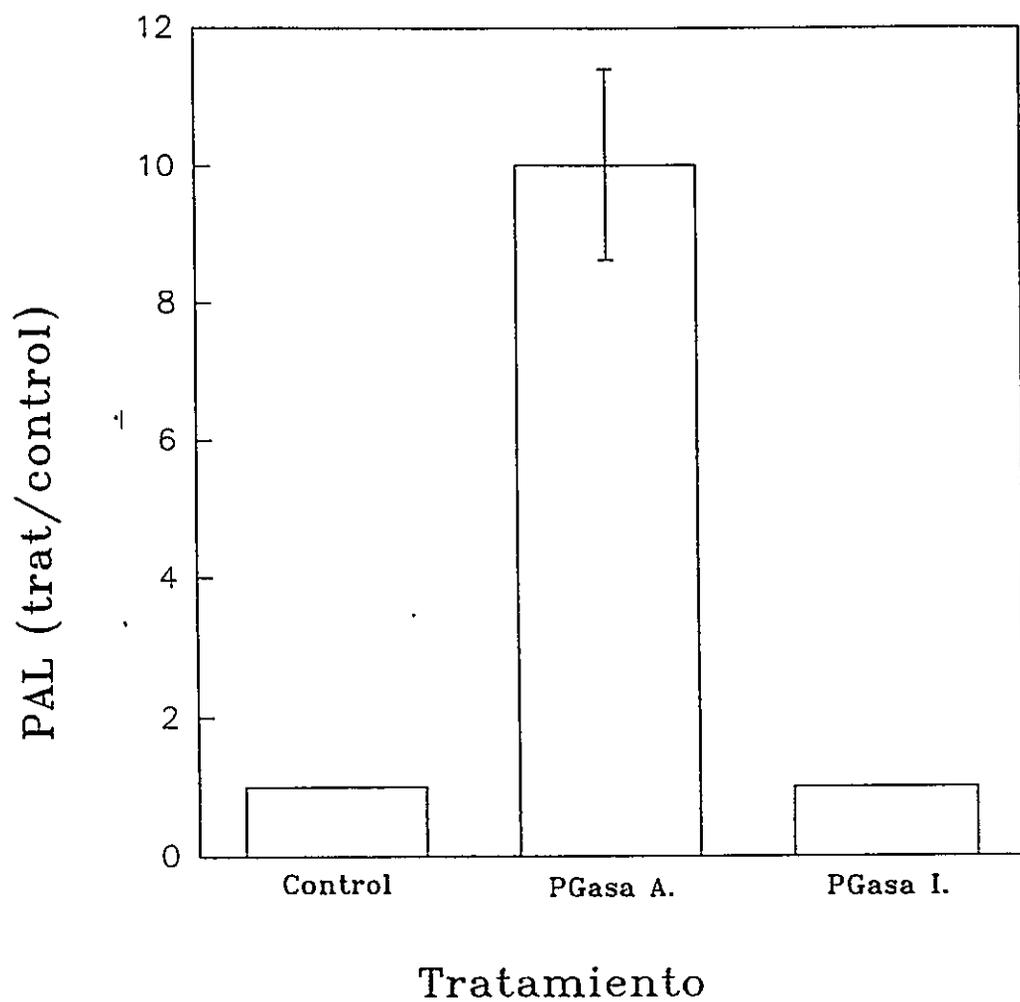


Figura 3.7. Actividad inductora de PGasa de *Alternaria alternata* en plántulas dañadas. La actividad de PAL fue cuantificada 7 horas post-tratamiento. Control: planta dañada, A: activa, I: inactivada por calor.

tamaños, los que serían los verdaderos inductores de la respuesta defensiva. La participación de este tipo de enzimas se ha confirmado en numerosos procesos de infección de tejidos vegetales (Collmer y Keen, 1986). La liberación de fragmentos pécticos por una poligalacturonasa de *Rhizopus stolonifer* que induce la síntesis de la fitoalexina casbeno, en *Ricinus communis*, ha sido descrita por Lee y West (1981), datos que concuerdan con resultados obtenidos después de tratamiento de plántulas de limonero con PGasa de *A. alternata* (Roco, A. y cols., 1993).

La respuesta de plántulas de limonero dañadas mecánicamente, al tratamiento con PGasa se adelantó 13 horas si se compara con la respuesta de las plántulas intactas, frente al mismo inductor. Esta diferencia en la temporalidad a la cuál ocurrió la respuesta en plántulas dañadas puede deberse a una mayor accesibilidad de la enzima a la pectina de la pared, la que originaría oligosacáridos que pueden interactuar con una mayor superficie de estructuras internas expuestas. La exposición de estas estructuras en plántulas intactas tratadas con PGasa, correspondería sólo a los lugares en que efectivamente la enzima produjo daño. Se ha comprobado que oligosacáridos liberados por acción de la PGasa de *A. alternata* sobre plántulas de limonero, tienen tamaños (o DP) que dependen del tiempo de tratamiento con la

enzima; y sólo algunos de ellos son capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en esta especie vegetal (Roco, A. y cols., 1993).

3. 2. 3. Actividad inductora de O-FCW, de O-PCW₁₉ y de O-PGA₁₆.

Las plántulas de limonero con daño mecánico previo, indujeron la actividad de la PAL cuatro horas después del tratamiento, confirmando resultados anteriores (Roco y cols., 1993). Los O-FCW indujeron siete veces, O-PCW₁₉ indujo 24 veces y O-PGA₁₆ indujo 16 veces, con respecto al control (daño mecánico solamente) (Figura 3. 8.). Para todos los casos se observó además, la inducción de la PAL a las 8 horas, en respuesta a daño mecánico.

De los tres inductores usados, el que presentó un mejor efecto fué el O-PCW₁₉, que es producido en el tratamiento de plántulas de limonero intactas con PGasa fúngica. Antecedentes previos (Roco, 1990) demostraban que la respuesta del tejido dependía del tamaño del oligosacárido usado, sugiriendo que existía una especificidad en el reconocimiento. El aislamiento desde paredes fúngicas de un 1,3-1,6-hepta- β -glucósido ramificado con una alta actividad inductora en poroto de soya (Sharp, J. K. y cols., 1984a; Sharp, J. K. y cols., 1984b), proporcionó información inicial

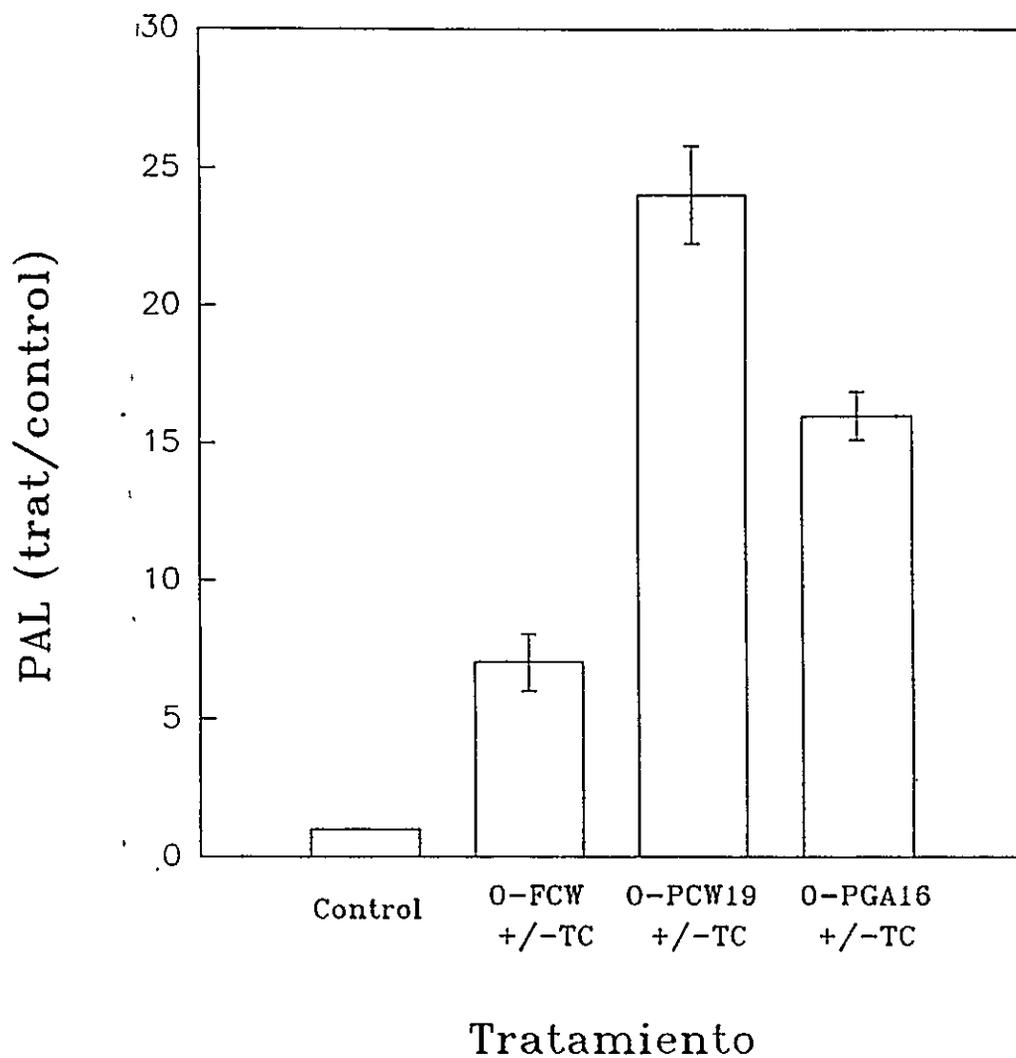


Figura 3.8. Actividad inductora de O-FCW, O-PCW19 y O-PGA16, en plántulas dañadas. La actividad de PAL se cuantificó 4 horas post-tratamiento. Control: planta dañada, TC: tratamiento con calor.

sobre el requerimiento de una estructura mínima para la actividad inductora . Trabajos posteriores (Cosio, E. y cols., 1988; Cosio, E. y cols., 1990) con este mismo elicitor y con un heptaglucósido sintético señalan incluso los grados de polimerización que deben poseer los elicitores con mayor actividad inductora (DP promedio=18). Estos resultados se ven complementados con el estudio de oligoglucósidos sintéticos con los que se estimó cuál era la estructura esencial del β -glucósido activo, encontrándose que era indispensable la presencia de un extremo trisacárido no reducido para la actividad biológica del elicitor. Estos mismos autores demostraron que si este extremo era reemplazado por un residuo de glucosamina o N-acetilglucosamina, la actividad inductora se reducía hasta en 1000 veces. (Cheong, J. y cols., 1991). Farmer y cols. (1991), dan cuenta de la longitud mínima de un fragmento oligogalacturónico, aislado de hojas de tomate, que posee características de elicitor activo: el DP debe estar comprendido entre 14 y 15 residuos. Por otra parte, Jin y West (1984) encuentran que oligosacáridos de 13 unidades de ác. galacturónico, preparados a partir de PGA, son los mejores inductores.

En nuestro modelo experimental, el uso de la mezcla total de O-PCW no produjo inducción de la PAL, hecho que podría explicarse por competencia entre los

oligosacáridos presentes en la mezcla, dónde solamente unos pocos son capaces de inducir la respuesta defensiva (Roco y cols., 1993). Se debe considerar además, que en estos experimentos se usó una cantidad total de 100 μg de azúcares reductores (equivalentes de glucosa), donde la proporción de los elicitores que desencadenan la respuesta pudiera ser muy baja, por la presencia mayoritaria de fragmentos de bajo peso molecular, en los cuales la presencia de esta "estructura determinante" (Cosio, E. y cols., 1990) del reconocimiento se encuentra disminuída. Anderson-Prouty y Albersheim (1975) obtuvieron resultados semejantes con elicitores de *Colletotrichum lindemuthianum* que fueron degradados enzimáticamente a fragmentos más pequeños, los cuales no indujeron la respuesta defensiva en *Phaseolus vulgaris*. Farmer y cols. (1991) trabajaron con tres oligosacáridos químicamente semejantes: PGA, PGU y PMA, los cuales diferían en la conformación de las cadenas. PGA y PGU, como resultado de la ubicación de los hidroxilos en posición cuatro del azúcar, dejan con mayor exposición al átomo de oxígeno, lo que permite que en presencia de ion calcio se formen fuertes complejos intermoleculares unidos por interacciones iónicas. Esto no ocurre con PMA cuyo átomo de oxígeno en posición cuatro, presenta una ubicación endo que lo imposibilita para formar dichos complejos. En este modelo

"egg-box" (Ress, 1972), los iones calcio se ajustan o encajan entre dos o más cadenas de residuos galactosilurónicos no esterificados, de forma que los átomos de oxígeno permiten la quelación del ion calcio con participación de residuos galactosiluronato, presentes entre dos cadenas de galacturonano vecinas (Poovaiah, B. y cols., 1988). Farmer y cols. (1991) también señalan que la formación de este complejo intermolecular ("egg-box"), es dependiente del grado de polimerización de los urónidos en presencia de ion calcio saturante. Con oligómeros galacturonatos, la estructura "egg-box" se forma cuando el DP es mayor a 10, siendo éste el tamaño mínimo para interaccionar con ion calcio. Esto se relaciona además, con la capacidad que tienen los oligosacáridos con un DP mayor a 10, de aumentar la fosforilación de una proteína de membrana de 34 KDa (pp34). Oligómeros más pequeños que no forman el complejo con iones calcio son totalmente inactivos en aumentar la fosforilación de pp34 (Farmer y cols., 1991). Por lo tanto, en nuestra mezcla total de O-PCW la presencia de "estructuras determinantes", como las llaman Cosio y cols. (1990), pudiera ser el equivalente al complejo intermolecular "egg-box" (Farmer y cols., 1991), que sólo se da con oligómeros con un determinado DP. Nuestros resultados muestran que una mezcla total de O-PCW no induce actividad de la PAL, y esto puede

deberse a la gran diversidad en los DP de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática. Sin embargo, también hay que considerar que la mezcla de O-PCW es representativa de sólo una temporalidad en la hidrólisis de la pared celular, ya que O-PCW obtenidos después de distintos tiempos de tratamiento de plántulas de limonero con PGasa de *A. alternata* contenían distintas proporciones de oligosacáridos de diferente DP. Es así como a tiempos cortos de tratamiento de plántulas de limonero con PGasa de *A. alternata* se podían encontrar O-PCW de tamaños mayores que los que se obtenían a tiempos largos de tratamiento. Esta observación podría representar la dinámica que existe a nivel de los O-PCW en una situación "in vivo", donde sería necesario que la planta reconociera tempranamente que existe una agresión para preparar la respuesta celular (Roco, A. y cols., 1993). Una vez gatillada la respuesta, probablemente no sería indispensable la presencia continua de los oligosacáridos activos en la inducción, ya que se ha descrito que la planta presenta una "memoria" para responder rápidamente a una nueva agresión (Farmer y Ryan, 1991). Además, es importante considerar que la respuesta de la planta frente a una agresión por un patógeno presenta una temporalidad bien definida y tiene la característica de ser transitoria, lo que reafirma que no se requiera que el estímulo permanezca en el

tiempo.

El grado de esterificación que pueda tener el oligosacárido también pudiera ser importante. Al respecto, O-PGA₁₆ que tiene todos sus grupos carboxilatos libres, también fué un buen inductor de la respuesta, aún cuando ésta fué de menor magnitud. Por lo tanto, la presencia de un cierto número de carboxilatos esterificados también pareciera ser necesaria para mejorar la respuesta. Estas características sugieren la existencia de un reconocimiento específico que podría estar dado por la presencia de un posible receptor que reconociera tanto tamaño de la molécula como cantidad de carboxilatos libres o esterificados, tal como se ha sugerido en el caso de poroto de soya, que es capaz de unir un oligómero de PGA con un DP=12 unidades de ácido galacturónico (Horn y cols., 1989). Similares resultados se han obtenido en *Ricinus communis*, en donde los mejores elicitores para la síntesis de casbeno, son oligómeros de PGA con un DP entre 7 y 20 unidades de ácido galacturónico (Jin y West, 1984).

La respuesta de la planta al tratamiento con O-FCW resultó ser de menor magnitud que la observada con los otros dos elicitores. Esta se produjo con la misma temporalidad, sugiriendo que la respuesta se produce por un mecanismo similar. La diferencia en magnitud, podría deberse a la

distinta composición química de la pared fúngica en relación a la pared vegetal. Se ha señalado que la presencia de residuos de N-acetilglucosamina, principal azúcar de la quitina, inhibe la actividad inductora de un β -glucósido (Cheong y cols., 1991). Se ha descrito que hongos como *A. alternata* poseen una pared celular que contiene quitina y glucanos, con un 2% de ácido glucurónico (Bartnicki-García, 1968). La presencia de este azúcar en la pared fúngica, que contiene un grupo carboxilato libre, podría permitir que el tejido vegetal también lo reconociera como elicitador. Debido a la facilidad de obtención de la mezcla de O-FCW y a su actividad inductora, se decidió continuar usándolo como elicitador en la gran mayoría de los experimentos.

Los elicitores con tratamiento térmico indujeron a la actividad de la PAL en igual magnitud que lo hicieron los sin este tratamiento (Figura 3. 8.). Los polisacáridos no sufren descomposición con la temperatura empleada, mientras que las proteínas se desnaturan. Este resultado sugiere que son los polisacáridos presentes en pared fúngica y vegetal, los verdaderos inductores de la respuesta defensiva de la planta.

3. 3. Efecto de la concentración de oligómeros de pared fúngica sobre la inducción de la PAL.

Las plántulas de limonero con daño mecánico respondieron en forma hiperbólica en relación a la inducción de la PAL en función de la concentración del elicitor, entre 0 y 150 μg de azúcares reductores (equivalentes de glucosa), alcanzándose la saturación con 100 μg , y observando un 50% de activación con 25 μg . A concentraciones mayores que 150 μg de azúcares reductores se redujo la inducción (Figura 3. 9.). Tratamientos con 400 μg de azúcares reductores no modificaron la actividad basal de la PAL.

La primera porción de la curva puede interpretarse a través de la existencia de un receptor para estos O-FCW debido a la presencia de saturación. Experimentos dosis-respuesta, realizadas con fracciones de membrana de poroto de soya y con [$^{14}\text{-C}$] micolaminarano, un β -1,3 glucano ramificado aislado de *Phytophthora sp.*, muestran un comportamiento semejante. Sin embargo estos autores observan una saturación del sistema con una concentración del elicitor superior a 100 μM , encontrando un 50% de activación a una concentración de 50 μM . En este mismo sistema, no se observó un efecto inhibitorio a altas concentraciones del elicitor (Yoshikawa, M. y cols., 1983). Considerando el tipo de ensayo realizado por estos autores, la concentración de elicitor de 100 μM , es

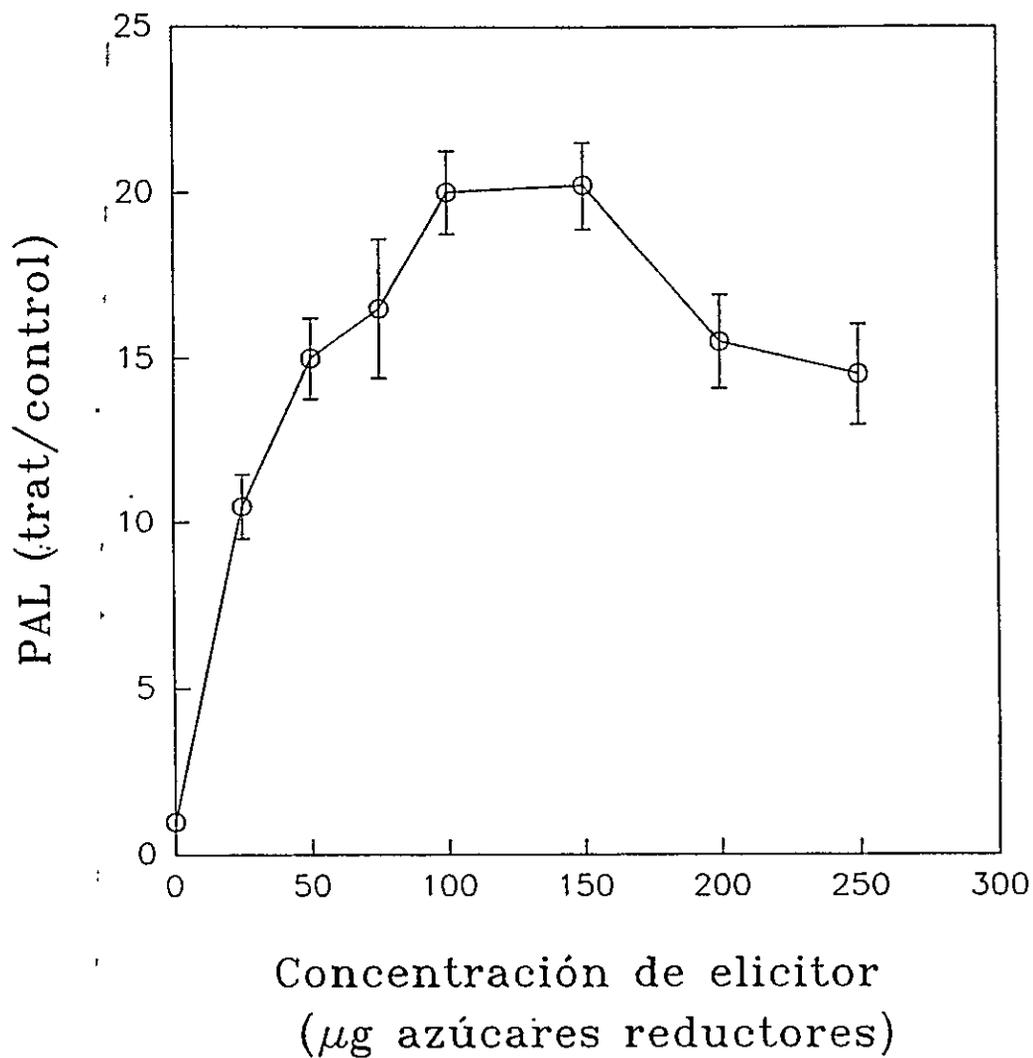


Figura 3.9. Efecto de la concentración de O-FCW sobre la inducción de la PAL. La actividad de la enzima se cuantificó 4 horas post-tratamiento. Control: planta dañada.

equivalente a 18 μg de azúcares reductores, valor inferior al obtenido por nosotros. Sin embargo, ellos utilizan un oligosacárido de un tamaño bien definido, mientras que los O-FCW usados en nuestros experimentos corresponden a una mezcla, lo que permite explicar la diferencia. En nuestro caso, al ser los O-FCW una mezcla de oligosacáridos, no se conoce si existen en ella algunos que pudieran tener una acción inhibitoria, o que pudieran competir con los que realmente producen la inducción. Desde ese punto de vista, el comportamiento de O-FCW en una concentración de 400 μg de azúcares reductores, podría ser equivalente al observado para la mezcla de O-PCW a una concentración de 100 μg de azúcares reductores. Por otra parte, la ausencia de efecto inhibitorio observado en el sistema de poroto de soya puede deberse a que se utilizó un elicitor de un solo tamaño o bien, a que la concentración máxima utilizada de 400 μM es equivalente a sólo 72 μg de azúcares reductores.

Los resultados obtenidos en poroto de soya usando el micolaminarano, y realizando además estudios de unión del mismo a membranas aisladas, sugieren la existencia de receptores específicos para este elicitor (Yoshikawa, M. y col, 1983). Adicionalmente, estudios del mismo tipo realizados con otros elicitores y sistemas de membranas confirman la especificidad de la interacción y del

reconocimiento (Cheong, J. y Hahn, M., 1991). Existen además algunas evidencias que señalan que el sitio de unión detectado en membranas es inactivado por proteólisis y por tratamiento con calor, lo que sugiere que este sitio es una proteína o una glicoproteína (Cheong, J. y Hahn, M., 1991).

Experimentos realizados en suspensiones celulares de poroto de soya de 7 días, utilizando como elicitador ácido poligalacturónico preparado de pectina cítrica, marcado con FITC o con ^{125}I , demuestran que éste se une a la membrana plasmática y es posteriormente internalizado, para concentrarse mayoritariamente en la vacuola (Horn, M. A. y cols., 1989). Estos resultados también demuestran que los elicitores efectivamente interactúan con la membrana plasmática y no con la pared celular.

3. 4. Efecto de compuestos diferentes a los elicitores fúngicos o de plántulas de limonero sobre la inducción de la PAL.

3. 4. 1. Efecto de CaCl_2 10 μM sobre la inducción de la PAL.

Las plántulas de limonero con daño mecánico previo indujeron la actividad de la PAL a las tres y a las siete horas desde el inicio del tratamiento con CaCl_2 10 μM (Figura 3. 10.). Al comparar esta cinética de inducción en relación a

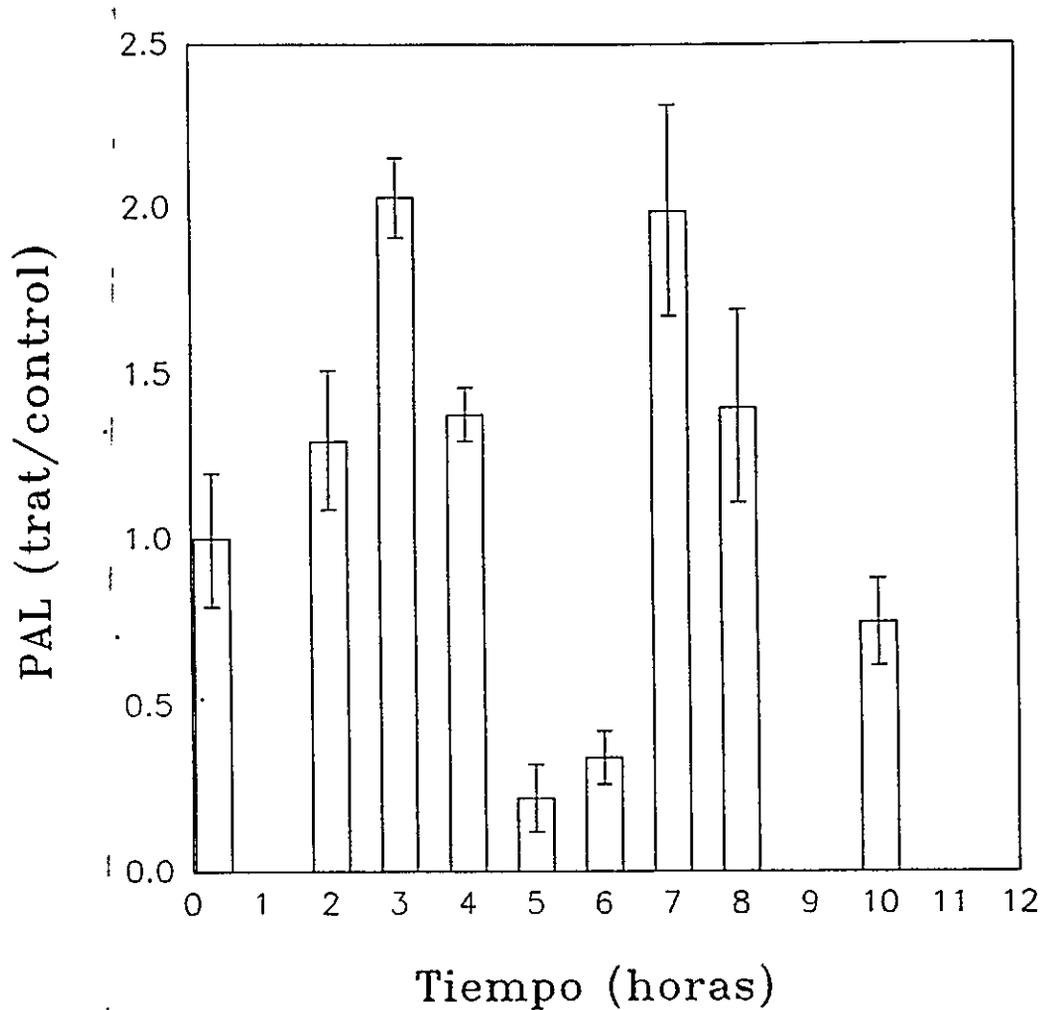


Figura 3.10. Efecto de CaCl_2 10 μM sobre la inducción de la PAL. Tanto la respuesta a los elicitores (4h) como al daño mecánico (8h), se adelanta en 1 h respectivamente, en presencia de Calcio. Control: planta dañada.

la observada solamente con daño mecánico, se puede apreciar la aparición de un nuevo máximo de inducción de PAL (tres horas) y un adelanto en una hora en la temporalidad de la respuesta a daño, desde las ocho a las siete horas. La respuesta observada a las tres horas de tratamiento con CaCl_2 no aparece cuando se realiza solamente daño, pero esta temporalidad se encuentra adelantada en una hora con respecto al efecto producido por O-FCW o conidias fúngicas en plantas previamente dañadas. De modo que la adición de CaCl_2 produce un adelanto de la respuesta a elicitores y al daño mecánico. Este adelanto podría sugerir que el ion Ca^{2+} está participando en la transducción de la señal, y que su participación se produce después que el elicitor es reconocido por un posible receptor o que el daño mecánico es sentido por el vegetal.

En general los trabajos que informan la participación de ion Ca^{2+} en la interacción planta-patógeno, han sido realizados adicionando al sistema vegetal los elicitores en presencia de este metal bivalente (Köhle, H. y cols., 1985; Pelissier, B. y cols., 1986; Stab, M. y Ebel, J., 1987), con lo que han podido concluir que la presencia de ion Ca^{2+} es indispensable para que se produzca la respuesta defensiva de la planta. Más recientemente, la presencia de ion Ca^{2+} se ha correlacionado con fosforilación de proteínas durante el

proceso de respuesta del vegetal ((Grab, D. y cols., 1989; Dietrich, A. y cols., 1990), y en general se le ha propuesto como un posible transductor de señales en estos sistemas (Dixon y Lamb, 1990).

Nuestros resultados fueron obtenidos en ausencia de elicitors, por lo tanto, son solamente comparables con los resultados obtenidos en la inducción de la fitoalexina 6-metoximeleína en células de zanahoria (Kurosaki y cols., 1987). En este último sistema, tanto el ion Ca^{2+} como el Ionóforo de Ca^{2+} A23187, fueron capaces de inducir la formación de fitoalexinas en ausencia de elicitor exógeno. De estas observaciones, se puede inferir que el daño mecánico más el ion Ca^{2+} adicionado exógenamente pueden reemplazar a los elicitors, y más aún, adelantar la respuesta del vegetal.

3. 4. 2. Efecto de diferentes concentraciones de CaCl_2 sobre la inducción de la PAL.

La magnitud de la inducción de la PAL observada previamente (sección 3. 4. 1.) dependió de la cantidad de CaCl_2 adicionado durante el tratamiento . La mejor inducción, tanto a las tres como a las siete horas, se observó con CaCl_2 1 μM (0,29 nmoles/plántula), (Figura 3. 11.). Este valor pudiera considerarse bajo si se compara con los valores de

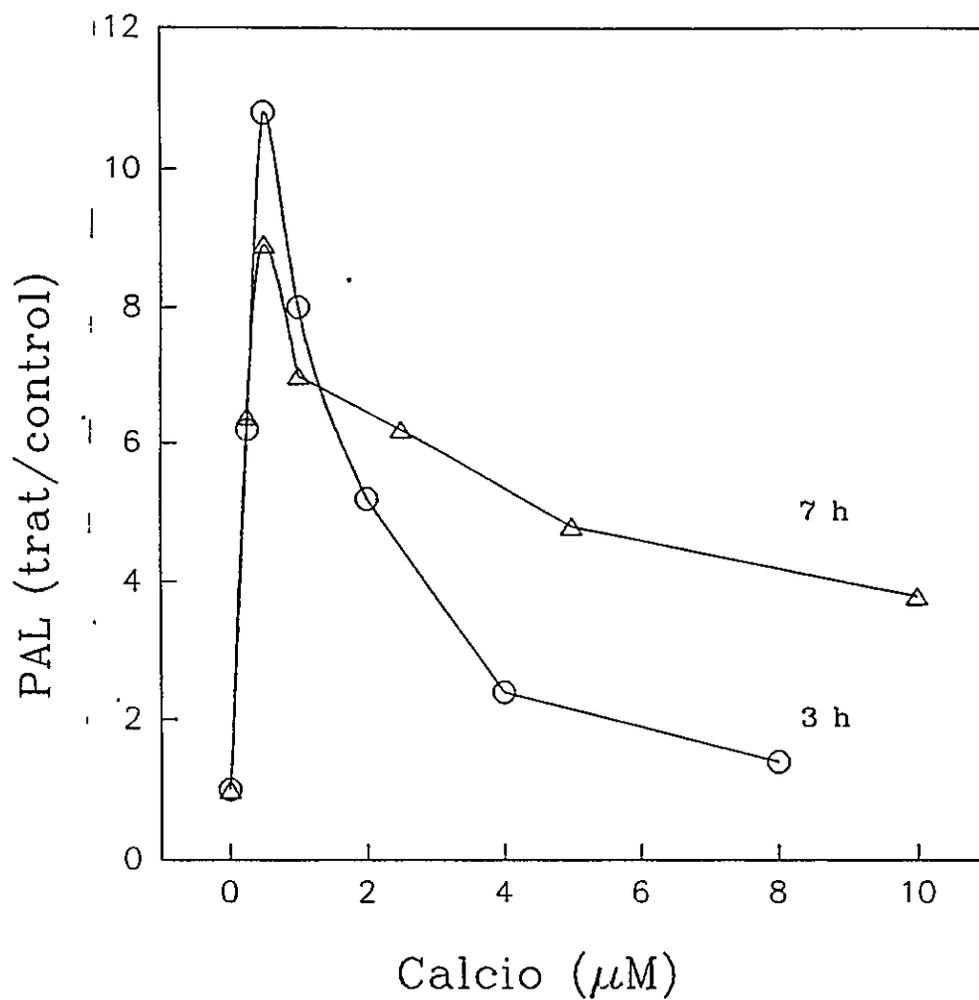


Figura 3.11. Efecto de diferentes concentraciones de CaCl_2 . La actividad de PAL se cuantificó 3 y 7 horas post-tratamiento. Control: daño mecánico.

CaCl₂ (15 μM) adicionados a suspensiones celulares de poroto de soya para producir la inducción de callosa (Köhle, H. y cols., 1985).

Se ha descrito que las concentraciones de ion Ca²⁺ citosólico para células vegetales en reposo son del orden de 150 nM, concentración que puede aumentar hasta 400 nM o más en células excitadas (Leonard y Hepler, 1990; Trewavas y Gilroy, 1991). Si se considera que el ion Ca²⁺ puede participar en la transducción de la señal producida por elicitores o por daño mecánico, es importante considerar cómo debiera desplazarse este catión para que aumente su concentración citosólica. Los sistemas transportadores de iones Ca²⁺ están acoplados a la utilización de ATP en membrana plasmática y retículo endoplásmico (Evans y cols., 1991), o bien, a un gradiente de protones que autogenera ATP en el tonoplasto (Blackford y cols., 1990). Estos tres tipos de membrana definen los sitios potenciales de entrada de ion Ca²⁺ al citoplasma en forma pasiva, vía canales de calcio (Johannes y cols., 1991).

El ion Ca²⁺ es un constituyente estructural de la pared celular donde se encuentra unido fuertemente a los grupos carboxilatos de las unidades de ácido galacturónico que forman parte de la pectina. Cuando ocurre pérdida de ion calcio desde el tejido vegetal, por ej. por efecto de daño

mecánico, las células perciben esta alteración y bombean ion calcio desde el interior para compensar la disminución de ion Ca^{2+} en la pared.

En nuestros experimentos se adicionó CaCl_2 a plántulas previamente dañadas cuyo contenido celular en este catión pudiera ser equivalente al descrito (Trewavas y Gilroy, 1991). Se debiera esperar un vaciamiento del contenido de las células dañadas, por lo que la cantidad de ion Ca^{2+} real debiera sumarse a la adicionada en nuestro sistema. Considerando que el ion Ca^{2+} debe movilizarse hacia el interior de la célula (citoplasma), nuestros resultados se acercan más a los valores citoplasmáticos descritos en células excitadas, aún cuando puede suponerse que no todo el ion Ca^{2+} agregado ingresa al citoplasma.

3. 4. 3. Efecto de CaCl_2 sobre la actividad de la PAL.

No se observó efecto de CaCl_2 sobre la actividad de la enzima, al adicionar concentraciones entre 0 y 10 μM del reactivo al medio de reacción para cuantificación de la actividad de la PAL. Por lo tanto, los resultados descritos en 3. 4. 1. y 3. 4. 2. corresponden a un efecto de inducción de la actividad de la PAL, y no a una activación de la enzima.

3. 4. 4. Efecto del Ionóforo de Ca^{2+} A23187 $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ sobre la inducción de la PAL.

Las plántulas de limonero con daño mecánico previo indujeron la actividad de la PAL a las tres y a las siete horas desde el inicio del tratamiento con el Ionóforo de Ca^{2+} $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ (Figura 3. 12.). Al comparar esta cinética de inducción en relación a la observada solamente con daño mecánico, y a la observada con daño mecánico en presencia de CaCl_2 , se puede apreciar que el efecto del Ionóforo es comparable con el de ion Ca^{2+} . Es más, si se compara con la cinética de inducción producida por ion Ca^{2+} en plántulas con daño mecánico, existe coincidencia en la temporalidad de la respuesta. Este resultado, en conjunto con el descrito en las secciones 3. 4. 1. y 3. 4. 2. refuerza la hipótesis de la participación de ion Ca^{2+} en la transducción de la señal. El efecto de este Ionóforo es comparable al observado en suspensiones celulares de zanahoria, sistema en el que fué utilizado en ausencia de elicitores (Kurosaki, F. y cols., 1987). Su efecto también se ha descrito en sistemas en los que se ha utilizado en conjunto con elicitores fúngicos (Köhle, H. y cols., 1985; Pelissier, B. y cols., 1986; Stab, M. y Ebel, J., 1987). Sin embargo, en suspensiones celulares de poroto, este Ionóforo adicionado incluso en conjunto con el elicitor de *Colletotrichum lindemuthianum*, no es capaz de

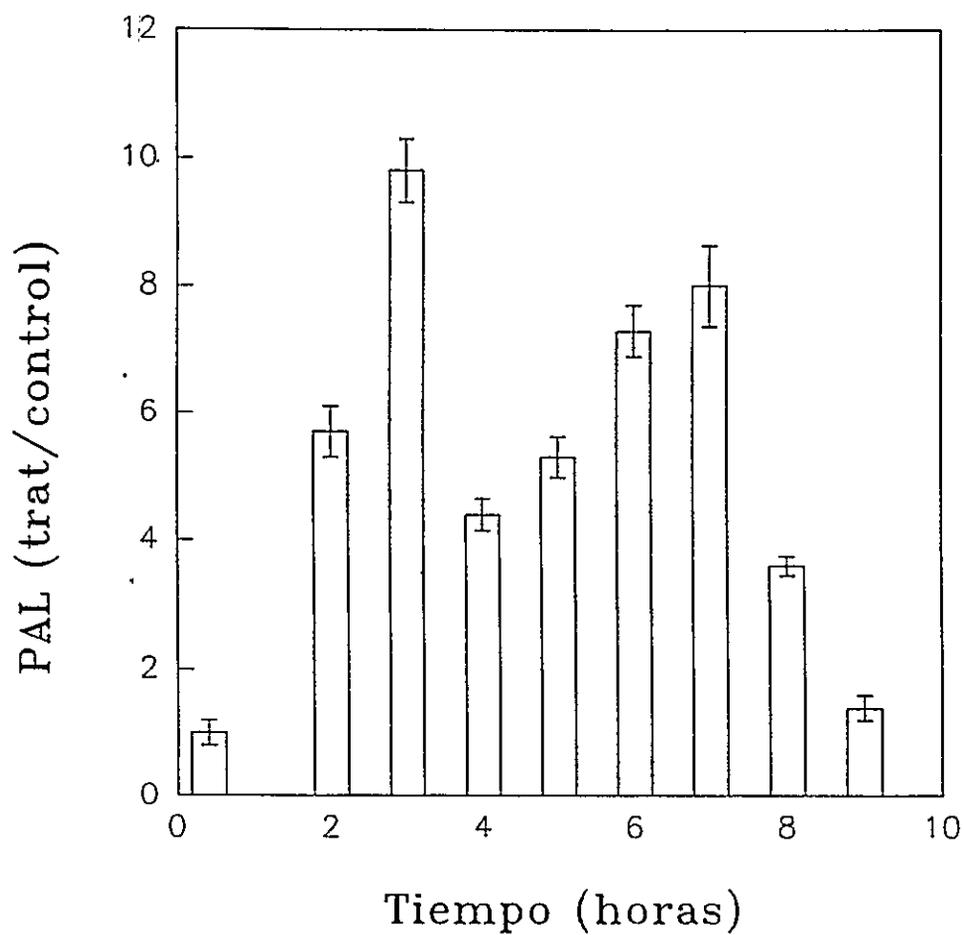


Figura 3.12. Efecto del ionóforo de Calcio A23187 $0.01\mu\text{M}$, sobre la inducción de la PAL. Tanto la respuesta a los elicitores (4h) como al daño mecánico (8h), se adelanta en 1h respectivamente, en presencia del ionóforo. Control: planta dañada.

inducir la respuesta (Bolwell, G. y cols., 1991), sugiriendo que la transducción de señales pudiera ocurrir a través de diferentes moléculas dependiendo de la especie vegetal.

3. 4. 5. Efecto de diferentes concentraciones del Ionóforo de Ca^{2+} A23187 sobre la inducción de la PAL.

La magnitud de la inducción de la PAL observada previamente (sección 3. 4. 4.) dependió de la cantidad del Ionóforo adicionado durante el tratamiento . La mejor inducción, tanto a las tres como a las siete horas, se observó con A23187 $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ (Figura 3. 13.). Este Ionóforo se ha descrito como un transportador iónico (Pressman, B. C., 1976), por lo tanto, si la respuesta defensiva depende de la concentración de ion Ca^{2+} , también debe depender de la concentración de Ionóforo adicionado.

3. 4. 6. Efecto del Ionóforo de Ca^{2+} A23187 sobre la actividad de la PAL.

No se observó efecto del Ionóforo sobre la actividad de la enzima, al adicionar concentraciones entre 0 y $3 \mu\text{M}$ del reactivo al medio de reacción para cuantificación de la actividad de la PAL. Por lo tanto, los resultados descritos en 3. 4. 4. y 3. 4. 5. corresponden a un efecto de inducción de la actividad de la PAL, y no a una activación de

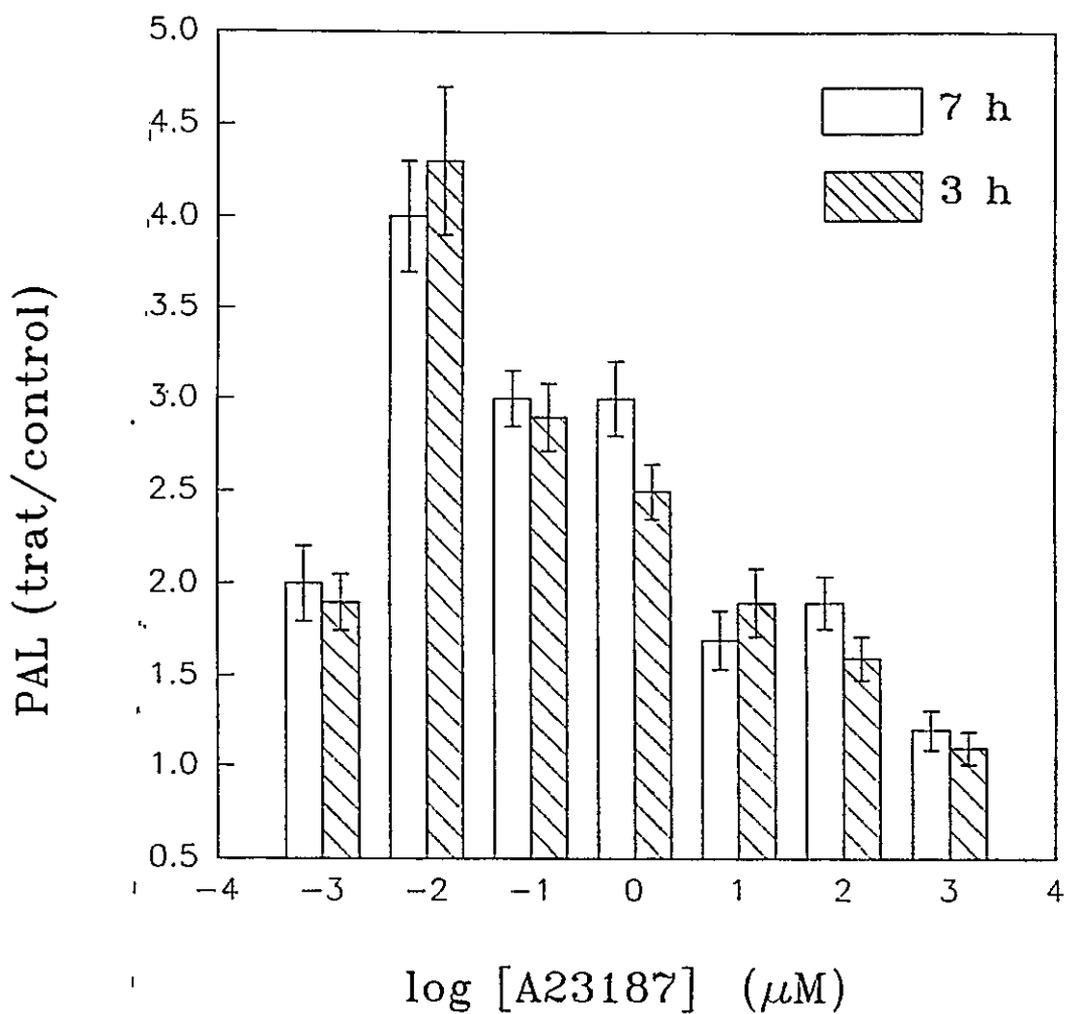


Figura 3.13. Efecto de diferentes concentraciones de A23187 sobre la inducción de la PAL. La actividad de la PAL se cuantificó 3 y 7 horas post-tratamiento. Control: planta dañada.

la enzima.

3. 4. 7. Efecto de diferentes concentraciones de Verapamil sobre la inducción de la PAL.

El Verapamil 50 μM inhibió el aumento de la actividad de la PAL inducido por daño mecánico y O-FCW a las cuatro horas (Figura 3. 14.). A esta misma concentración se obtuvo la máxima inhibición de la respuesta de la planta inducida por daño mecánico en presencia de ion Ca^{2+} 1 μM (tres horas), al analizar el efecto de diferentes concentraciones de Verapamil (Figura 3. 15.). El $I_{0,5}$ fué de aprox. 25 μM . El Verapamil se ha descrito como un antagonista de canales de calcio en células vegetales (Graziana, A. y cols., 1988; Harvey, H. J. y cols., 1989), y se ha comprobado que se une a fracciones de membrana (Andrejaukas, E. y cols., 1985). Por lo tanto, si la presencia de ion Ca^{2+} es indispensable para que se produzca la respuesta defensiva en plántulas de limonero, la presencia de este bloqueador nuevamente confirma este hecho.

3. 4. 8. Efecto de Verapamil 50 μM sobre la actividad de la PAL.

El Verapamil a esta concentración no inhibió la actividad de la PAL, por lo tanto, los resultados descritos

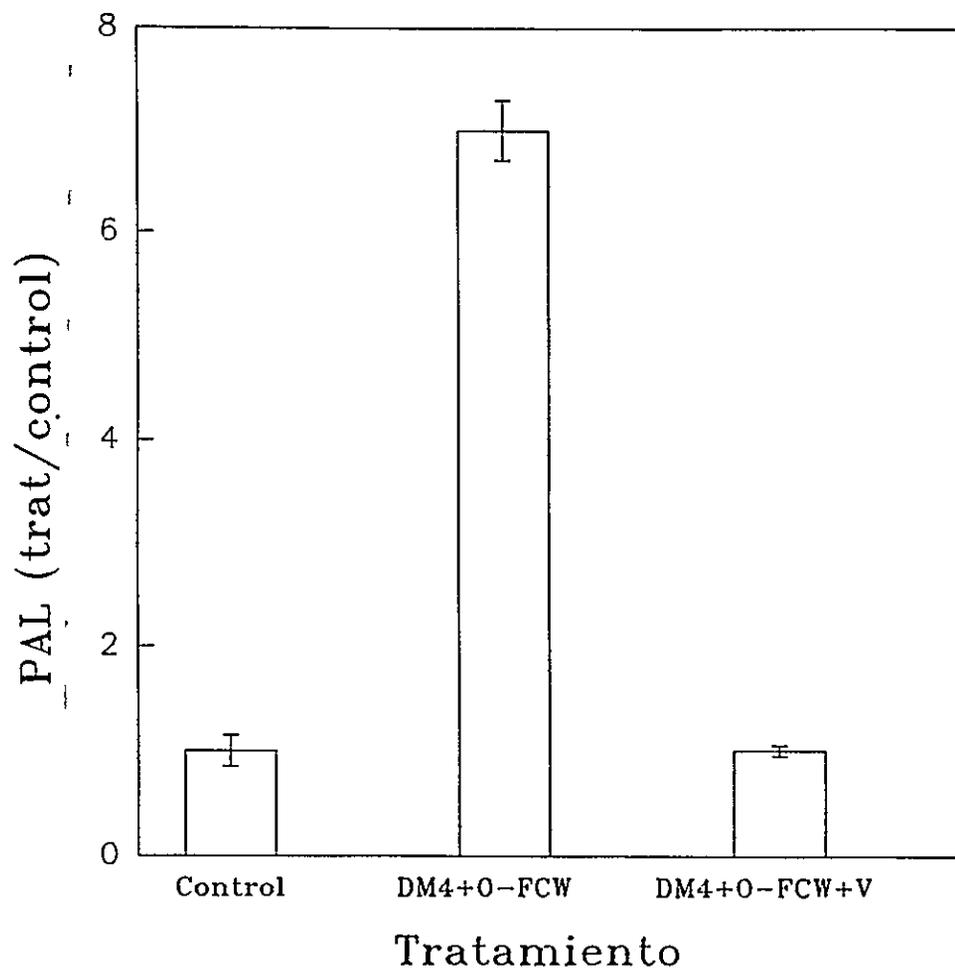


Figura 3.14. Efecto de Verapamil 50 μ M sobre la inducción de la PAL por O-FCW. La actividad de la PAL se cuantificó 4 horas post-tratamiento. Control: planta dañada, V: Verapamil, DM4: daño mecánico durante 4 horas.

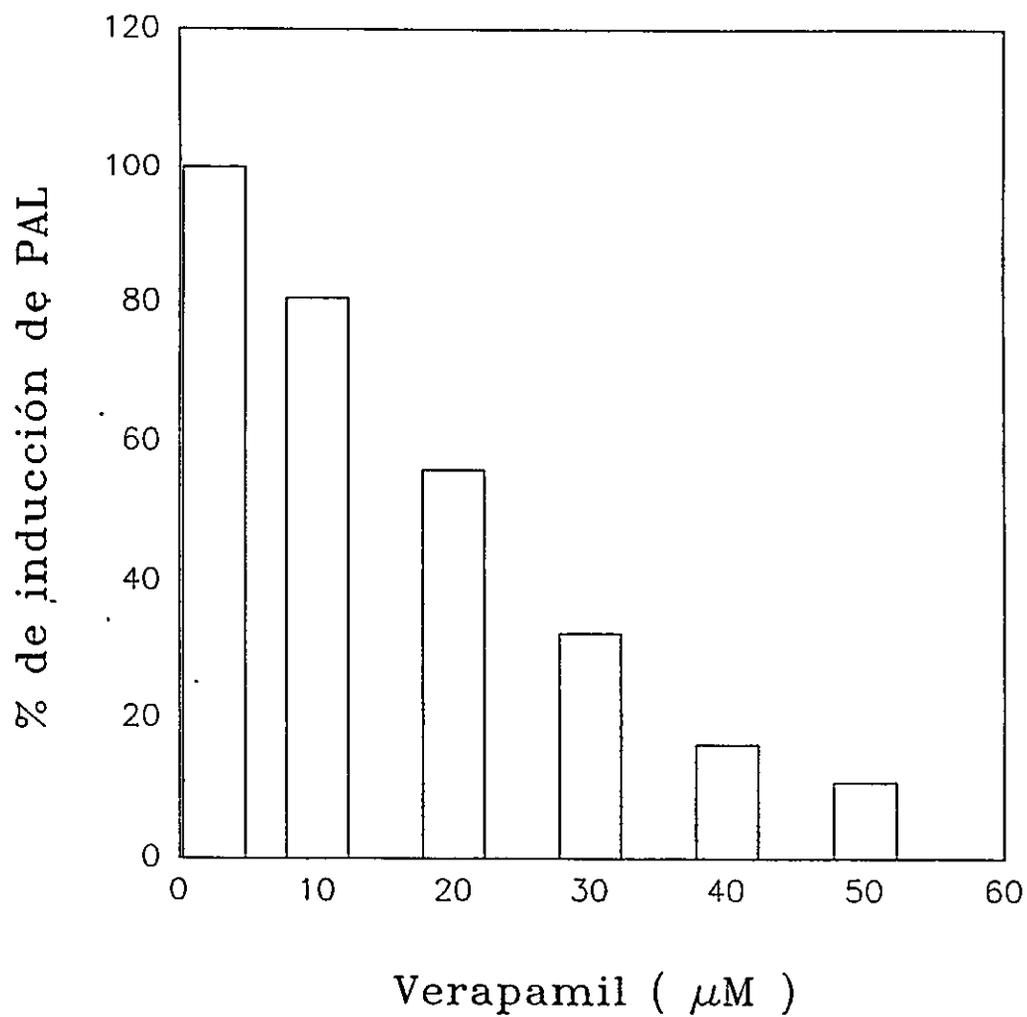


Figura 3.15. Efecto de diferentes concentraciones de Verapamil sobre la actividad de la PAL inducida por CaCl_2 $1\mu\text{M}$, en plántulas dañadas.

en 3. 4. 7. corresponden a una inhibición de la inducción de la PAL y no a una inhibición de la actividad de la enzima.

3. 4. 9. Efecto de diferentes concentraciones de EGTA sobre la inducción de la PAL.

El EGTA inhibió el aumento en la actividad de la PAL inducida por daño mecánico en presencia de CaCl_2 1 μM (Figura 3. 16.). El $I_{0,5}$ fué de 0,2 mM. Este experimento nos permitió calcular además, la concentración de Ca^{2+} libre (Figura 3. 17.). Si se analizan los datos de inducción de la PAL en respuesta a diferentes concentraciones de ion Ca^{2+} (Figura 3. 11), se puede apreciar que a las concentraciones de ion Ca^{2+} libres obtenidas después de agregar cualquiera de las concentraciones de EGTA, debieran observarse solamente valores de actividad basales de PAL. Estos resultados sugieren que la inhibición de la inducción observada a diferentes concentraciones de EGTA, se debe a la quelación del ion Ca^{2+} , lo que disminuye la cantidad de ion Ca^{2+} libre necesario para inducir la respuesta de la planta.

3. 4. 10. Efecto de EGTA 3 mM sobre la actividad de la PAL.

El EGTA 3 mM no inhibió la actividad de la PAL, por lo tanto, los resultados descritos en 3. 4. 9. corresponden a una inhibición de la inducción de la enzima y no a una

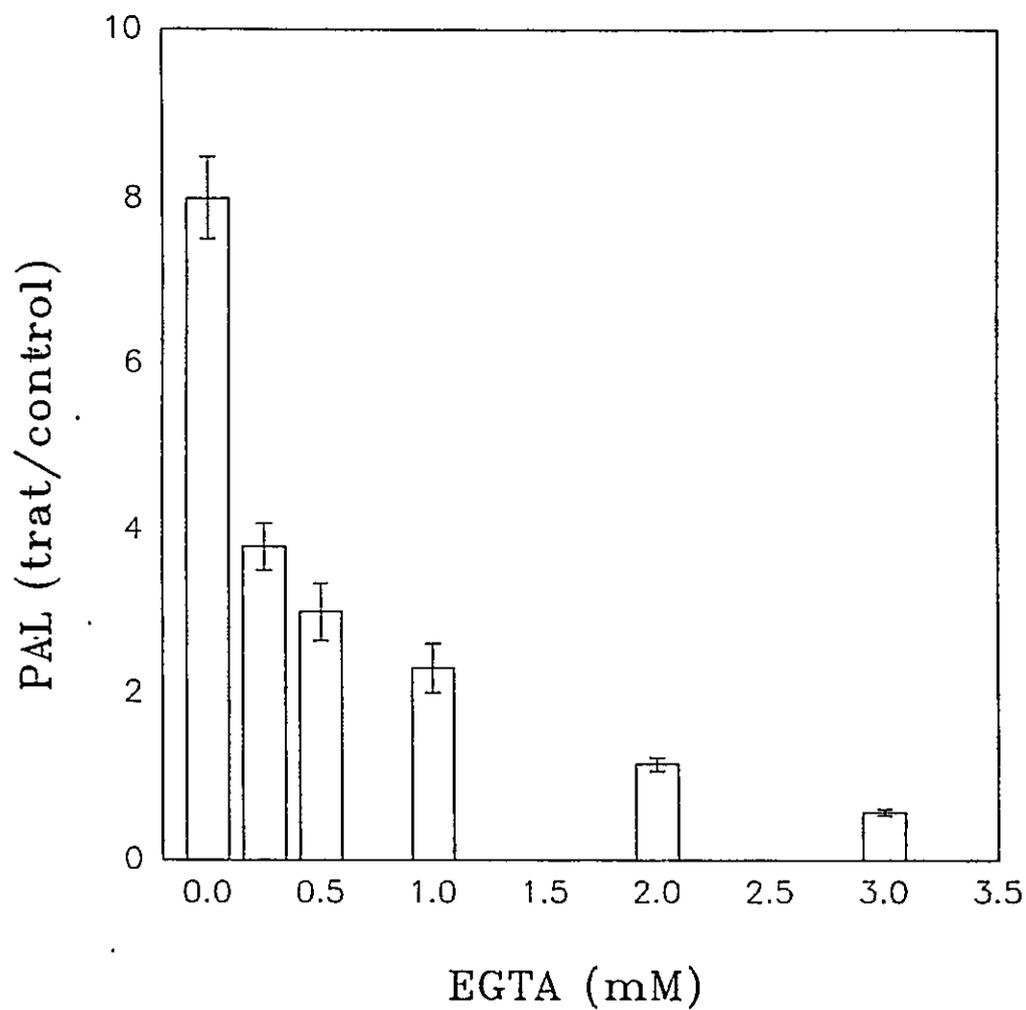


Figura 3.16. Efecto de diferentes concentraciones de EGTA sobre la inducción de la PAL. La actividad de la PAL fue cuantificada 3 horas post-tratamiento de plántulas con daño mecánico en presencia de CaCl_2 . Control: planta dañada en presencia de CaCl_2 .

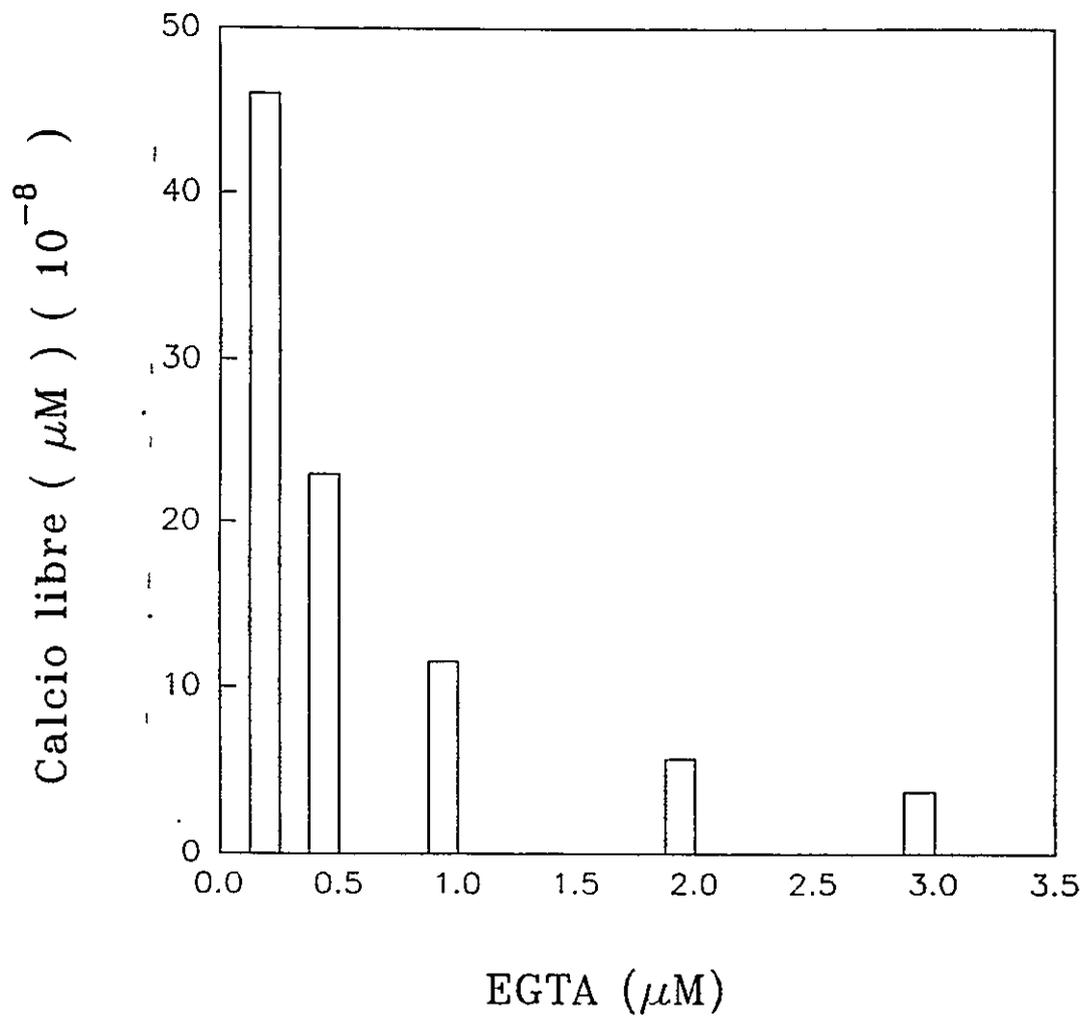


Figura 3.17. Concentración de Calcio libre después de adicionar diferentes concentraciones de EGTA a plántulas dañadas en presencia de CaCl_2 $1 \mu\text{M}$.

inhibición de la actividad de la PAL. Esta inhibición de la inducción está relacionada directamente con la disminución del ion Ca^{2+} libre. El EGTA no afectó la actividad basal de la PAL, lo que confirma que la actividad de la enzima no depende de la presencia de ion Ca^{2+} .

3. 4. 11. Efecto de diferentes concentraciones de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL.

La Norarmepavina 50 μM inhibió completamente: a) el aumento de la actividad de la PAL inducida por daño mecánico y O-FCW a las cuatro horas, b) el aumento de la actividad de la PAL inducida por daño mecánico y ion Ca^{2+} 1 μM a las tres horas; e inhibió parcialmente el aumento de la actividad de la PAL inducida por daño mecánico cuando el ion Ca^{2+} se adicionó una hora después que se produjo el daño y que se agregó la Norarmepavina (Figura 3. 18.). De esta forma, sólo cuando el alcaloide se adicionó simultáneamente con el ion Ca^{2+} o con O-FCW, se obtuvo una completa inhibición de la respuesta de la planta. Cuando el ion Ca^{2+} se adicionó una hora después de realizar el daño mecánico y de adicionar Norarmepavina, se observó solamente un 25% de inhibición de la inducción, sugiriendo que el alcaloide no mantiene su efecto inhibitorio en el tiempo.

Al analizar el efecto de diferentes concentraciones

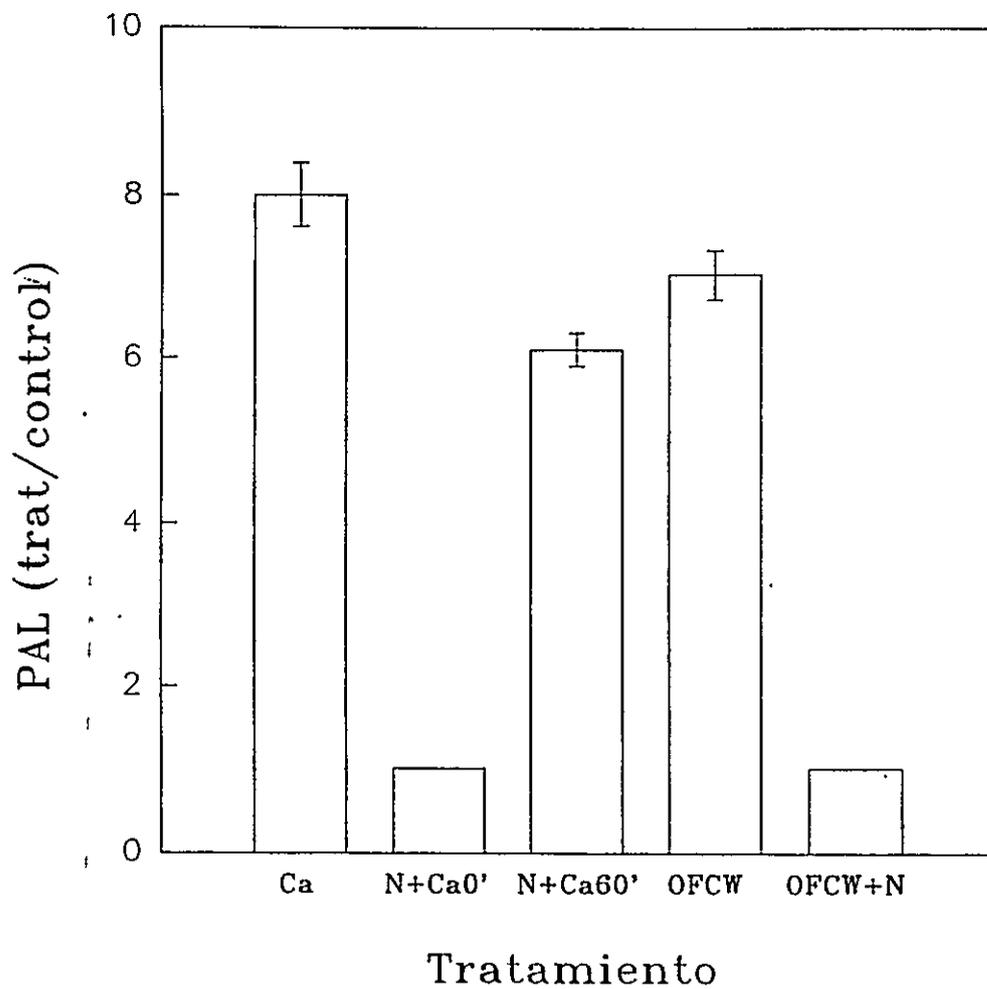


Figura 3.18. Efecto de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL por CaCl_2 $1\mu\text{M}$, en plántulas con daño. La actividad de la PAL se cuantificó a las 3 horas post-tratamiento con calor y 4 horas post-tratamiento con O-PCW. N: Norarmepavina.

de Norarmepavina en la inducción de la respuesta defensiva, se pudo obtener el valor del $I_{0,5}$ que resultó ser de $3 \mu\text{M}$ (Figura 3. 19.). Este experimento fué realizado adicionando simultáneamente ion Ca^{2+} $1 \mu\text{M}$.

Se ha descrito que los alcaloides benzil-isoquinolínicos son antagonistas de canales de calcio en animales (Morales M. A. y cols. 1989), tal como se ha descrito para Verapamil (Graziana, A. y cols., 1988). Recientemente, se ha informado que la Norarmepavina, obtenida por síntesis química, también actúa como un antagonista de ion Ca^{2+} (Cassels, B. K. y Morales, M. A., 1993). Los resultados obtenidos, son comparables a los de Verapamil y apoyan la idea de la participación de canales de calcio en la respuesta de la planta.

3. 4. 12. Efecto de Norarmepavina $50 \mu\text{M}$ sobre la actividad de la PAL.

La Norarmepavina $50 \mu\text{M}$ no inhibió la actividad de la PAL, por lo tanto, los resultados descritos en 3. 4. 11. corresponden a una inhibición de la inducción de la enzima y no a una inhibición de la actividad de la PAL. Confirman además, la necesidad de que existan canales de calcio para que se produzca la respuesta defensiva de la planta.

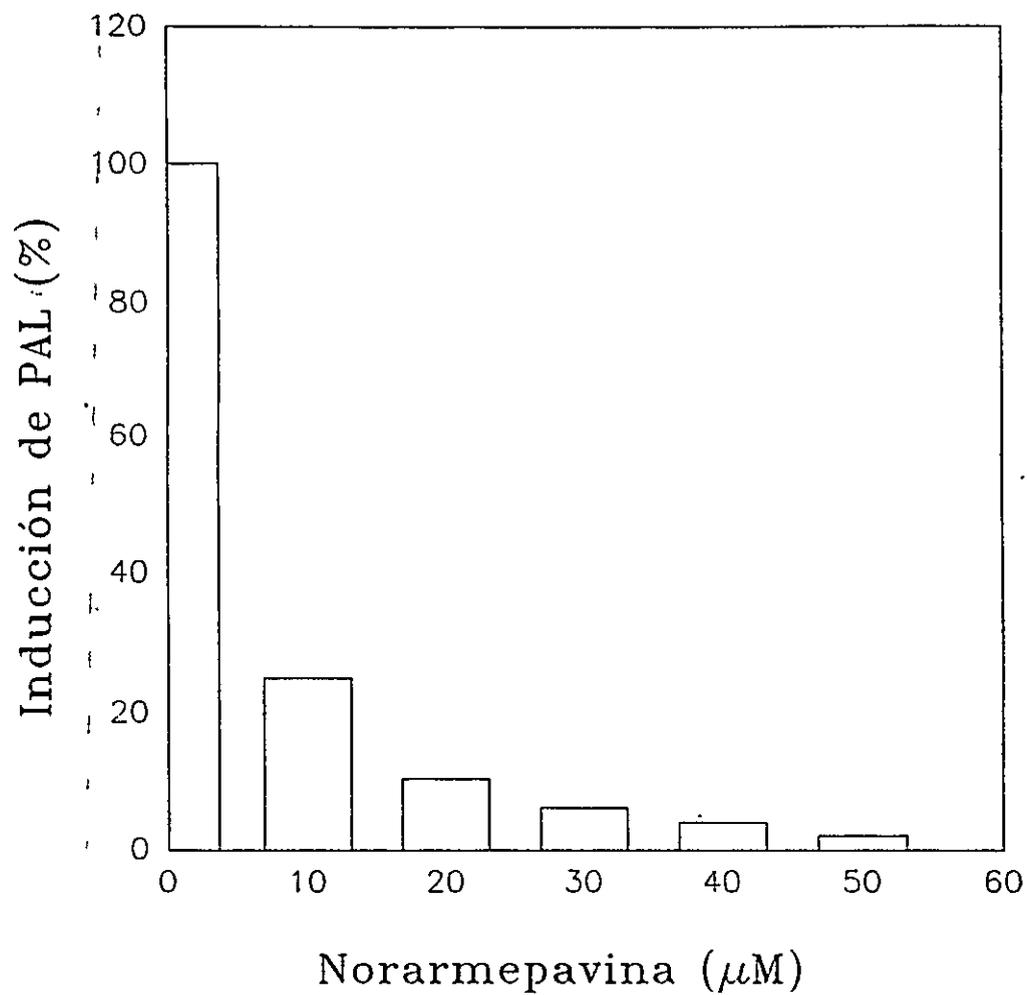


Figura 3.19. Efecto de diferentes concentraciones de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL, en plántulas dañadas en presencia de CaCl₂ 1 μM.

3. 4. 13. Efecto conjunto de ion Ca^{2+} y de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL.

El efecto inhibitorio de Norarmepavina dependió de la temporalidad a la cuál se adicionó el ion Ca^{2+} 1 μM (Figura 3. 20.), sugiriendo que este bloqueador de canales de calcio pudiera ser metabolizado por el tejido vegetal, ya que se recuperaba la capacidad inductora en la medida que transcurría el tiempo. Aún cuando la formación y metabolización de alcaloides isoquinolínicos no es muy activa en *Citrus*, sí es posible encontrar estos compuestos en esta especie vegetal (Kefford, J. F. y Chandler, B. V., 1970). Al comparar el efecto de la Norarmepavina en tejidos animales (Cassels, B. K. y Morales, M. A., 1993) con el encontrado en nuestro sistema, es posible comprender que la Norarmepavina sea un buen bloqueador de canales de calcio en sistemas animales que no poseen la rutas de biosíntesis y de degradación de estos alcaloides benzilisoquinolínicos. En las plantas, al existir enzimas del metabolismo secundario, es perfectamente comprensible que la Norarmepavina sea metabolizada. Además, en caso hipotético de que este compuesto fuera sintetizado en *Citrus*, su biosíntesis y almacenamiento debiera estar compartimentalizado de modo que no afectara la respuesta de la planta frente al ataque por patógenos.

Al analizar la cinética de supresión del efecto antagonista de Norarmepavina en las condiciones descritas (Figura 3. 20.), se puede observar que el ion Ca^{2+} nuevamente es capaz de inducir a partir de 15 minutos desde la adición de ion Ca^{2+} . Estos resultados permiten calcular un $t_{0,5}$ de 45 min para la inducción de un 50% de la capacidad de inducción máxima por el ion Ca^{2+} (ocho veces la actividad basal de PAL).

3. 4. 14. Efecto de diferentes concentraciones de BaCl_2 sobre la inducción de la PAL.

Se consideró que el BaCl_2 no tuvo efecto en la inducción de la actividad de la PAL, a las diferentes concentraciones utilizadas (Figura 3. 21.). Este experimento permite descartar que la activación de PAL pueda deberse solamente a la presencia de un catión bivalente, ya que el ion Ba^{2+} no es capaz de reemplazar al ion Ca^{2+} . Además, para el funcionamiento de los canales iónicos, se sabe que existe una gran especificidad por el catión, y no se ha descrito que para el caso de los canales de calcio, este ion pueda ser reemplazado por ion Ba^{2+} (Johannes y cols., 1991).

Si se considera el tamaño del ion Ba^{2+} , tenemos un radio iónico de 1,34 Angstroms y para el ion Ca^{2+} de 0,99 Angstroms (Handbook of Chemistry and Physics, 1982 - 1983, 63rd edition, CRC Press); de modo que es poco probable que

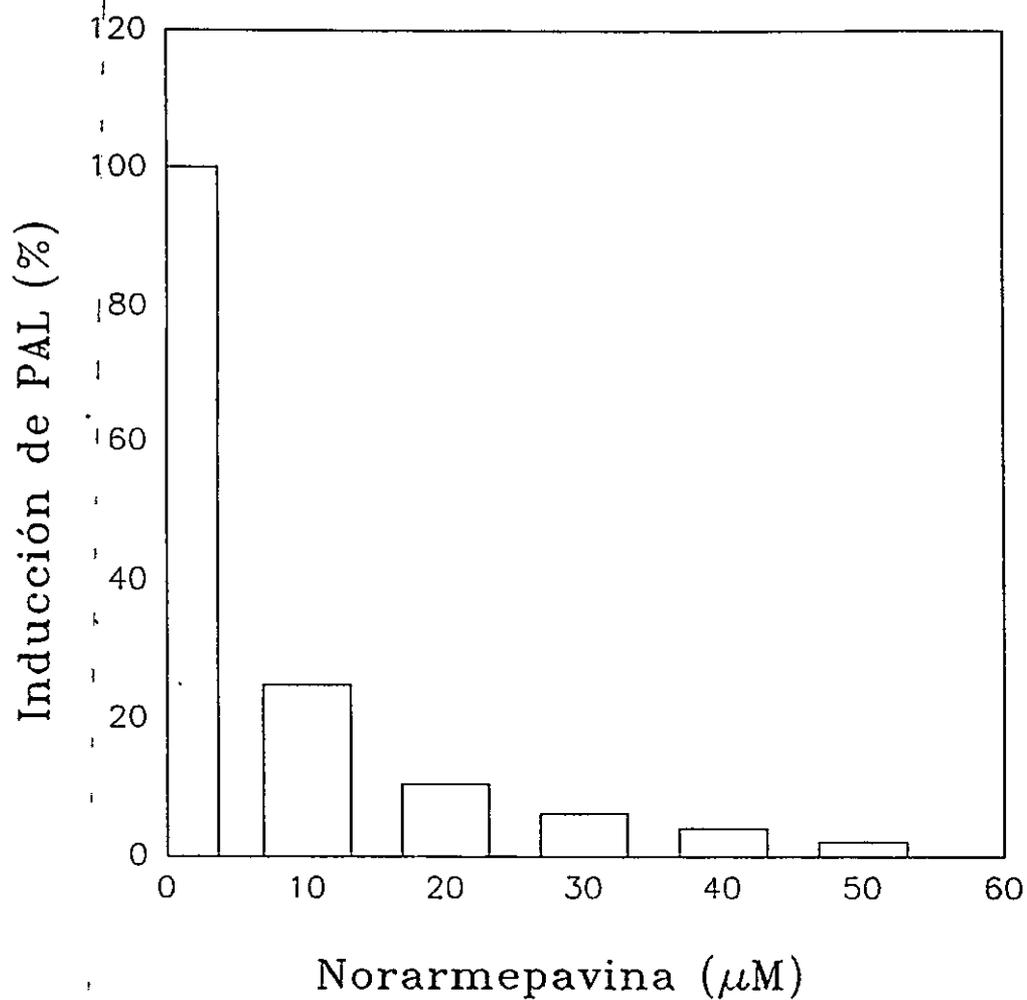


Figura 3.20. Efecto conjunto de CaCl_2 y de Norarmepavina sobre la inducción de la PAL. La actividad de la PAL se cuantificó 3 horas post-adición de CaCl_2 $1\mu\text{M}$. Control: cinética de inducción de PAL por daño mecánico y CaCl_2 $1\mu\text{M}$.

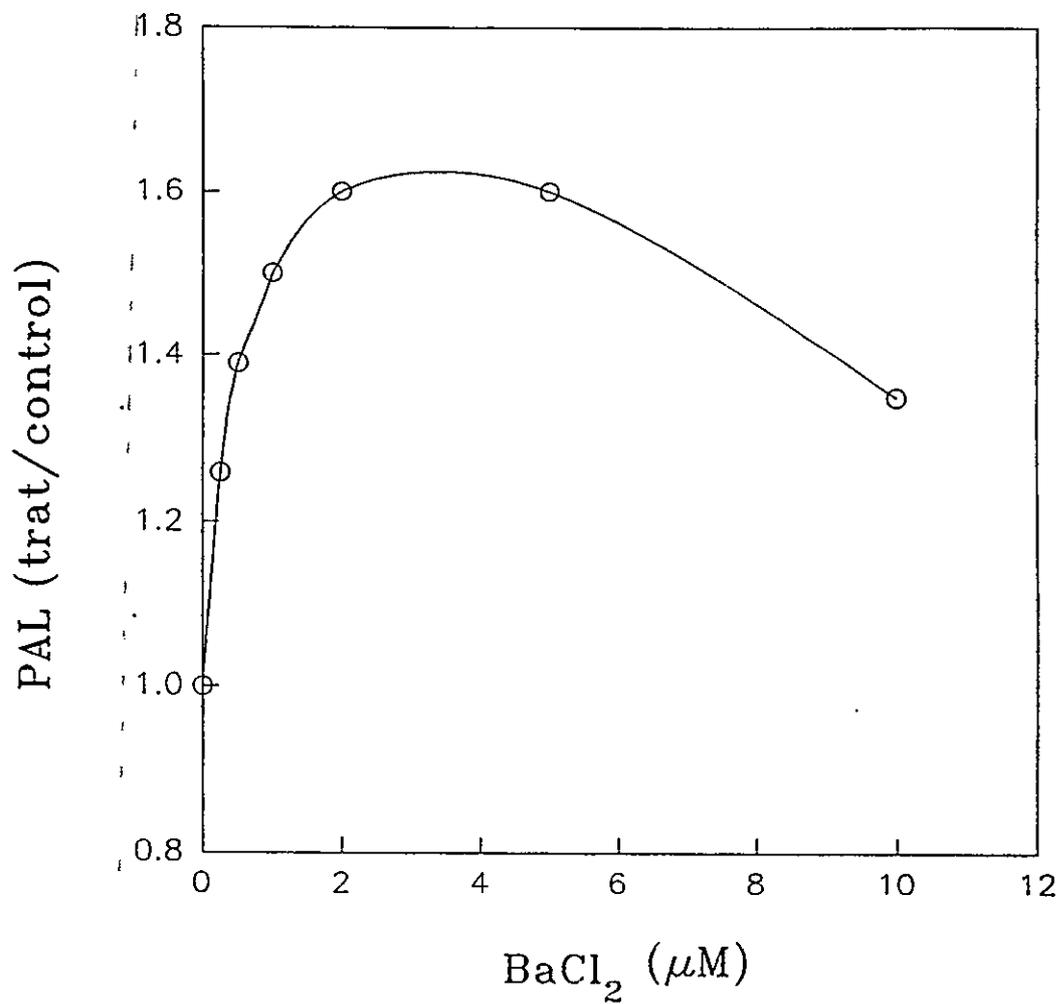


Figura 3.21. Efecto de diferentes concentraciones de BaCl₂ sobre la inducción de la PAL. La actividad de PAL fue cuantificada 3 horas post-tratamiento. Control: planta dañada.

desde este punto de vista, el ion Ba^{2+} pueda reemplazar por tamaño al ion Ca^{2+} en su efecto de activador de ATPasas.

3. 4. 15. Efecto de $BaCl_2$ 10 μM sobre la actividad de la PAL.

No se observó efecto de $BaCl_2$ 10 μM sobre la actividad de la PAL. Por lo tanto, se puede concluir que el ion Ba^{2+} no afecta su actividad, ni es capaz de inducirla.

3. 4. 16. Efecto de diferentes concentraciones de $MgCl_2$ sobre la inducción de la PAL.

El $MgCl_2$, a concentraciones entre 0,5 y 10 μM , indujo 2,5 veces la actividad de la PAL inducida por daño mecánico (Figura 3. 22.). Se ha descrito que existen ATPasas de membrana dependientes de ion Mg^{2+} y ion Ca^{2+} (Olbe, M. y Sommarin, M., 1991), para cuya actividad sería necesaria la presencia de ambos metales bivalentes. El leve efecto de ion Mg^{2+} no permite descartar la participación de ATPasas dependientes de ion Mg^{2+} . Por otra parte, la cantidad tanto de ion Ca^{2+} como de ion Mg^{2+} presente en los amortiguadores podría ser suficiente para mantener activas a las ATPasas dependientes de estos metales. La participación de ATPasas de membrana, en la transducción de la señal, es algo que deberá abordarse en el futuro.

Los resultados sugieren que el ion Mg^{2+} es capaz

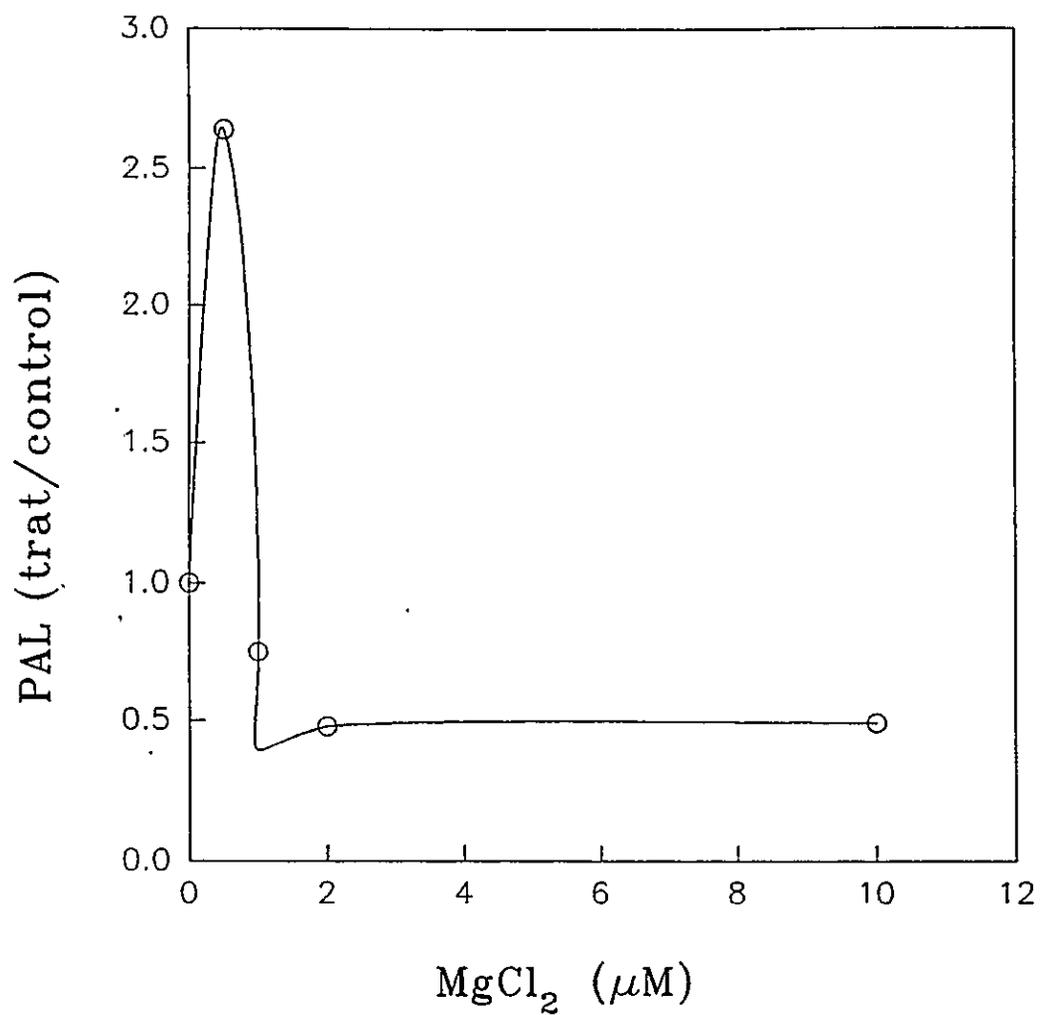


Figura 3.22. Efecto de diferentes concentraciones de MgCl₂ sobre la inducción de la PAL. La actividad de la PAL se cuantificó 3 horas post-tratamiento. Control: planta dañada.

de reemplazar parcialmente al ion Ca^{2+} como inductor. El radio iónico del Mg^{+2} , de 0,66 Angstrons es inferior al del ion Ca^{2+} (0,99 Angstrons) y por lo tanto, podría esperarse que en caso de que el ion Ca^{2+} estuviera activando algún sistema enzimático, éste pudiera ser reemplazado por un catión de menor radio iónico. Por otra parte, si la interacción se debiera solamente a la carga del ion, se hubiera observado un efecto de inducción semejante entre el ion Ca^{2+} , el ion Mg^{2+} y el ion Ba^{2+} . Aparentemente, tanto el tamaño del ion como su carga son importantes para la inducción de la defensa del vegetal.

3. 4. 17. Efecto de MgCl_2 sobre la actividad de la PAL.

No se observó efecto de MgCl_2 sobre la actividad de la enzima, al adicionar concentraciones entre 0 y 10 μM del reactivo al medio de reacción para cuantificación de la actividad de la PAL. Por lo tanto, los resultados descritos en 3. 4. 16. corresponden a un efecto de inducción de la actividad de la PAL, y no a una activación de la enzima.

4. CONCLUSIONES

Con el objeto de estudiar qué mecanismos bioquímicos participan en la respuesta defensiva de las plantas, es que en este trabajo se eligió como modelo una interacción de tipo incompatible entre *Citrus limon* y *Alternaria alternata*.

En primer lugar fue necesario establecer la naturaleza de los posibles inductores (conidias fúngicas, enzimas hidrolíticas, oligosacáridos de diversos orígenes); determinar si alguno de ellos era reconocido específicamente por la planta, entendiéndose como el mejor inductor a aquella estructura frente a la cuál la planta desarrolla su máxima capacidad de respuesta de una manera tal, que es capaz de sobrevivir frente a la interacción con el patógeno. Fue necesario además, establecer la secuencia de los eventos que ocurren durante el proceso de respuesta de la planta, tratando de definir la participación de algún metal en el mecanismo de transducción.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten comprobar que producto de la interacción de la conidia fúngica con la planta, ésta induce la actividad de la PAL (marcador de respuesta defensiva) 24 h post-tratamiento. Esta

respuesta se adelanta en 4 h si a las plantas se les trata directamente con la PGasa sintetizada por el hongo. Esta temporalidad en la respuesta sugiere la existencia de una secuencia de los eventos que van ocurriendo en el proceso de infección. Esta secuencia se inicia con la germinación de la conidia y posterior síntesis de la PGasa, cuya acción sobre la pared celular de la planta produce oligosacáridos con diferente grado de polimerización los que corresponderían a los verdaderos elicitores de la respuesta defensiva. Es importante señalar que ninguno de éstos, ensayados sobre plántulas no dañadas, fue capaz de inducir la actividad de la PAL. Esto demuestra que la superficie del vegetal es incapaz de reconocer a los elicitores.

Las plántulas de limonero dañadas mecánicamente activan a la PAL en respuesta a: daño mecánico, conidias (activas e inactivadas térmicamente), PGasa, y elicitores (de pared celular vegetal, de pared fúngica y de PGA). El tiempo que demora la planta dañada en responder al tratamiento con conidias (activas e inactivas) y con elicitores es de 4 h, hecho que sugiere que lo que reconoce alguna estructura interna de la planta es una estructura común entre la superficie de la conidia y los elicitores. El tratamiento térmico empleado con algunos elicitore (PGA y oligómeros fúngicos) y con las conidias, permiten descartar la

participación de proteínas en el proceso de reconocimiento. Por lo tanto se puede concluir que la estructura que la planta reconoce es un azúcar. Esto último, más la especificidad de la respuesta frente al grado de polimerización de los oligosacáridos y la respuesta de saturación del tejido dañado frente a estos inductores, hacen pensar en un mecanismo de reconocimiento vía receptor. Esta idea ha sido ampliamente discutida en la literatura, existiendo hasta el momento sólo evidencias parciales de este hecho.

Teniendo ya confirmada la participación y definidas algunas características del inductor, como son su origen y grado de polimerización, se trató de establecer qué mecanismos podrían estar operando para permitir que la respuesta defensiva de la planta se indujese en un tiempo lo suficientemente breve, de modo tal que el vegetal fuese capaz de inducir uno o mas mecanismos defensivos que le permitiesen en definitiva no morir frente a la agresión generada por el ataque fúngico. Los resultados de este trabajo permiten concluir que la inducción de la PAL, se produce mediante la participación de iones calcio, a través de canales de calcio. Así lo demostraron los resultados con calcio y con ionóforo de calcio, los que adelantan la inducción de la PAL en una hora, aumentando además la magnitud de la respuesta. Por otra

parte, tanto el EGTA como bloqueadores específicos de canales de calcio, suprimen la inducción de la respuesta. Estos resultados permiten afirmar que calcio está participando en la transducción de la señal.

5. BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G. N. (1988) How pathogens attack plants?. Cap III en "Plant Pathology". 3rd ed., pp. 63-86. Academic Press, Inc. New York.
- Albersheim, P. (1976) en "Plant Biochemistry". (J. Bonner and J. E. Varner, eds.), 3^a ed., pp.225-274. Academic Press, New York.
- Anderson-Prouty, A. J., and Albersheim, P. (1975) Host-pathogen interaction. VIII. Isolation of pathogen synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in the pathogen's host. *Plant Physiol.* 56:286-291.
- Andrejauskas, E., Hertel, R. and Marmé, D.³ (1985) Specific binding of the Calcium antagonist [³H]verapamil to membrane fractions from plants. *J. Biol. Chem.* 260: 5411-5414.
- A. O. A. C. (1980) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13^a ed., pp. 61. W. Horwitz, Ed.
- Aúba, M. (1988) Enzimas de hongos utilizadas en la infección del tejido vegetal: caracterización y propiedades. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile.
- Aubá, M., Chiong, M. and Pérez, L. M. (1993) Effect of foliar nutrients, fungicides, temperature and metal ions on pectate lyase and endopolygalacturonase from *Alternaria alternata* found in association with sooty molds on *Citrus* trees. *Fitopatologia* 28: 38 - 44.
- Ayers, A., Ebel, J., Valent, B. and Albersheim, P. (1976) Host-Pathogen Interactions. X Fraction and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 57:760-765.
- Bartnicki-García, S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-107.

- Bell, E. A. (1981) "The physiological role(s) of secondary (natural) products" en *The Biochemistry of Plants*, ed. P. K. Stumpf y E. E. Conn. Capítulo 1. pp 1-19. Ac. Press, New York.
- Blackford, S., Rea, P. A. and Sanders, D. (1990) Voltage sensitivity of H^+ / Ca^{2+} antiport in higher plant tonoplast suggests a role in vacuolar calcium accumulation. *J. Biol. Chem.* 265: 9617 - 9620.
- Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* 54: 484-489.
- Bolwell, G. P., Coulson, V., Rodgers, M., Murphy, D. and Jones, D. (1991) Modulation of the elicitation response in cultured french bean cells and its implication for the mechanism of signal transduction. *Phytochemistry* 30: 397-405.
- Bowles, D. (1990) Defense-relative proteins in higher plants; *Annu. Rev. Biochem.* 59:873-907.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bravo, R. (1992) Proteínas excretadas por hongos de la fumagina:caracterización y participación en la infección de plántulas de limonero. Tesis para optar al título de Bioquímico. Universidad de Chile.
- Bruce, R. and West, C. (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.* 91: 889-897.
- Carvajal, E. (1990) Distribución subcelular de fenilalanina amonio liasa en plántulas de *Citrus limon*. Efecto de la infección por *Trichoderma harzianum*. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile.
- Cassels, B. and Morales, M. (1993) Benzylisoquinoline alkaloids as novel calcium channel modulators. Simposio: Trends in natural product research in Latin America: Prospects for pharmaceutical and agrochemical applications. Foz do Iguazu 15-20 de Agosto.

- Cheong, J., Birberg, W., Fugedi, P., Pilotti, A., Garegg, P., Hong, N., Ogawa, T. and Hahn, M. (1991) Structure-activity relationships of oligo- β -glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. *The Plant Cell* 3: 127-136.
- Cheong, J. and Hahn, M. (1991) A specific, high-affinity binding site for the hepta- β -glucoside elicitor that exist in soybean membranes. *The Plant Cell* 3: 137-147.
- Collmer, A. and Keen, N. T. (1986) The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:383-409.
- Conn, E. E., Stumpf, P. K., Bruening, G. and Doi, R. H. (1987) *Outlines of Biochemistry*. 5th Ed. pp.... John Wiley and Sons, New York.
- Cosio, E., Popperl, H., Schmidt, W. and Ebel, J. (1988) High-affinity binding of fungal β -glucan fragments to soybean (*Glycine max*) microsomal fractions and protoplast. *Eur. J. Biochem.* 175:309-315.
- Cosio, E., Frey, T., Verduyn, R., van Boom, J. and Ebel, J. (1990) High-affinity binding of a synthetic heptaglucoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS.* 271:223-226.
- Darwill, A. G., Albersheim, P. (1984) Phytoalexins and their elicitors. A defense againts microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:243-275.
- Dietrich, A., Mayer, J. and Hahlbrock, K. (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 265: 6360-6368.
- Dixon, R. and Lamb, C. J. (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 339 - 367.
- DuPont, F. M., Bush, D. S., Windle, J. J. and Jones, R. L. (1990) Calcium and proton transport in membrane vesicles from barley roots. *Plant Physiol.*94:179-188.
- Ebel, J. (1986) Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:235-264.

- Edwards, K., Cramer, C. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Schuch, W. and Lamb, C. J. (1985) Rapid transient induction of phenylalanine ammonia lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6731-6735.
- Enyedi, A., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, A. (1992) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pest. Cell 70:879-886.
- Evans, D. E., Briars, S. A. and Williams, L. E. (1991) Active calcium transport by plant cell membranes. J. Exp. Bot. 42: 285 - 303.
- Fanta, N., Quaas, A., Zulueta, P. and Pérez, L. M. (1992) Release of reducing sugars from *Citrus* seedlings, leaves and fruits. Effect of treatment with pectinase and cellulase from *Alternaria* and *Trichoderma*. Phytochemistry 31: 3359 - 3364.
- Farmer, E. (1985) Effects of fungal elicitor on lignin biosynthesis in cell suspension cultures of soybean. Plant Physiol. 78: 338-342.
- Farmer, E. and Ryan, C. (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase in plant leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 7713-7716.
- Farmer, E., Moloshok, T., Saxton, M. and Ryan, C. (1991) Oligosaccharide signaling in plants. J. Biol. Chem. 266: 3140-3145.
- Farmer, E. and Ryan, C. (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. The Plant Cell 4: 129 - 134.
- Grab, D., Feger, M. and Ebel, J. (1989) An endogenous factor from soybean (*Glycine max*) cell cultures activates phosphorylation of a protein which is dephosphorylated in vivo in elicitor-challenged cells. Planta 179:340-348.
- Graziana, A., Fosset, M., Ranjeva, R., Hetherington, A. and Lazdunski, M. (1988) Ca⁺² Channel inhibitors that bind to plant cell membranes block Ca⁺² entry into protoplasts. Biochemistry 27: 764-768.

- Haberer, H., Schöder, G. and Ebel, J. (1989) Rapid induction of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthetase mRNAs during fungal infection of soybean (*Glycine max*) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures of the onset of phytoalexin synthesis. *Planta* 177: 58-65.
- Hahlbrock, K. Lamb, C. Purwin, C. Ebel, J. Fautz, E. and Schafer, E. (1981) Rapid Response of Suspension-cultured Parsley Cells to the Elicitor from *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 67: 768-773.
- Hahlbrock, K. and Scheel, B. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 347-369.
- Handbook of Chemistry and Physics. (1982-1983) 63rd Edition. CRC PRESS .
- Hanke, D. (1992) A new signalling role for salicylic acid. *Plant Disease Resistance* 2: 441-442.
- Harbone, J. B. (1988) Introduction to Ecological Biochemistry. 3rd Edition. pp.....Academic Press, New York.
- Harvey, H., Venis, M. and Trewavas, A. (1989) Partial purification of a protein from maize (*Zea mays*) coleoptile membranes binding the Ca⁺²-channel antagonist verapamil. *Biochem. J.* 257: 95-100.
- Horn, M., Heinsteins, P. and Low, P. (1989) Receptor-mediated endocytosis in plant cells. *The Plant Cell* 1: 1003-1009.
- Jin, D. F. and West, C. A. (1984) Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of chalcone synthetase activity in castor bean seedlings. *Plant Physiol.* 74: 989-992.
- Johannes, E., Brosnan, J. and Sanders, D. (1991) Calcium channels and signal transduction in plant cells. *Bio-essays*, 13: 331 - 336.
- Joos, H-J. and Hahlbrock, K. (1992) Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and mode of expression. *Eur. J. Biochem.* 204: 621 - 629.

- Keen, N. T., and Bruegger, B. (1977) Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 62: 1. citado según West, C. A. (1981).
- Kefford, J. F. and Chandler, B. V. (1970) The Chemical Constituents of Citrus Fruits. pp.....Acad. Press, New York - London.
- Köhle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W. and Kauss, H. (1985) Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+} -dependent process. Plant Physiol. 77: 544-551.
- Kuc J. (1982) Induced immunity to plant disease. Bio-Science 82: 854-860.
- Kuc, J. and Rush, J. (1985) Phytoalexins. Arch. Biochem. Biophys. 236: 455-472.
- Kuhn, D., Chappell, J., Boudet, A. and Hahlbrock, K. (1984) Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV light or fungal elicitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1102-1106.
- Kurosaki, F., Tashiro, N. and Nishi, A. (1986) Induction of chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls. Plant Cell Physiol. 27(8): 1587-1591.
- Kurosaki, F., Tsurusawa, Y. and Nishi, A. (1987) The elicitation of phytoalexins by Ca^{2+} and cyclic AMP in carrot cells. Phytochemistry 26: 1919 - 1923.
- Lamb, C. J. (1979) Regulation of enzymes levels in phenylpropanoid biosynthesis: characterization of the modulation by light and pathway intermediates. Archives of Biochemistry and Biophysics 192: 311-317.
- Lee, S-Ch. and West, C. A. (1981) Polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer*, and elicitor of casbene synthetase activity in castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. Plant. Physiol. 67:633-639.
- Leonard, R. T. and Hepler, P. K., eds (1990) Calcium in Plant Growth and Development. (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists) c.s. Schoeder, J. and Thuleau, P. 1991.

- Levitt, J. (1957) The significance of "apparent free space" (A.F.S.) in ion absorption. *Physiol. Plant.* 10:882-888.
- Lois, R., Dietrich, A., Halbrock, K. and Schulz, W. (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *The EMBO Journal* 8: 1641-1648.
- Lyon, M. and Wood, R. (1975) Production of phaseollin, coumestrol and related compounds in bean leaves inoculated with *Pseudomonas spp.* *Physiol. Plant Pathol.* 6: 117-124.
- Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J. (1974) Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotech. and Bioeng.* 14: 1471-1493.
- Mauch, F. and Staehelin, A. (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *The Plant Cell* 1:447-457.
- Mettifogo, S. (1987) Identificación de los hongos de la fumagina que parasitan cítricos, y su capacidad para excretar celulasas y pectinasas. Tesis para optar al título de Químico-Farmacéutico. Universidad de Chile.
- Morales, M. A., Gallardo, L. R., Martínez, J. L. Puebla, R. S. and Hernández, D. A. (1989) Effects of 7-O-demethylisothalic-berberine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid of *Berberis chilensis*, on electrical activity of frog cardiac pacemaker cells. *Gen Pharmacol.* 20: 621-625.
- Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
- Olbe, M. and Sommarin, M. (1991) ATP-dependent Ca^{+2} transport in wheat root plasma membrane vesicles. *Physiologia Plantarum* 83:535-543.
- Pavani, M. (1992) Identificación de metabolitos secundarios producidos como respuesta a la infección de tejidos vegetales por microorganismos patógenos. Tesis para optar al grado de Magister en Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. and Ryan, C. (1991) A poly-peptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.
- Pelissier, B., Thibaud, J., Grignon, C. and Esquerré-Tugayé, M. (1986) Cell surfaces in plant-microorganism interactions. VII. Elicitor preparations from two fungal pathogens depolarize plant membranes. *Plant Science* 46: 103-109.
- Peña-Cortés, H., Sanchez-Serrano, J. J., Mertens, R., Willmitzer, L. and Prat, S. (1989) Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9851-9855.
- Pérez, L. M., Mettifogo, S., Zaldívar, M. and Musalem, M. (1991) Sooty molds infecting citrus species in Chile: identification of the associated fungi and their ability to excrete plant cell wall hydrolyzing enzymes. *Fitopatologia* 26: 28-38.
- Poovaiah, B., Glenn, G. and Reddy, S. (1988) Calcium and fruit softening: physiology and biochemistry. *Horticultural Review* 10: 107-152.
- Pressmann, B. (1976) Biological applications of ionophores. *Annu. Rev. Biochem.* 45:501-530.
- Quaas, A., Chiong, M., Roco, A., Bravo, R., Seelenfreund, D. and Pérez, L. M. (1993) Antibodies against fungal conidia and antibiotics inhibit phenylalanine ammonia-lyase activation in *Citrus*. *J. Plant Physiol.* 141: 393 - 397.
- Raskin, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 439-463.
- Raven, P., Evert, R. and Eichhorn, S. *Biology of Plants*. (1992). 5th ed. pp..... Worth Publishers.
- Ress, D. (1972) Shapely polysaccharides. *Biochem. J.* 126: 257-273.

- Robertsen, B. (1986) Elicitors of the production of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 28:137-148.
- Roberts, K. (1992) Potential awareness of plants. *Nature* 360:14-15.
- Roby, D., Toppan, A. and Esquerré-Tugayé, M. (1985) Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions. *Plant Physiol.* 77:700-704.
- Roby, D., Toppan, A. and Esquerré-Tugayé, M. (1987) Cell surface in plant-microorganism interactions: VIII Increased proteinase inhibitor activity in melon plants in response to infection by *Colletotrichum lagenarium* or to treatment with an elicitor fraction from this fungus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30: 453-460.
- Roco, A. (1990) Inductores de la respuesta de *Citrus* a infección por hongos patógenos. Tesis para optar al título de Bioquímico. Universidad de Chile.
- Roco, A., Castañeda, P. and Pérez, L. M. (1993) Oligosaccharides released by pectinase treatment of *Citrus limon* seedlings are elicitors of the plant response. *Phytochemistry* (en prensa).
- Ross, A. F. (1966) Systemic effects of local lesion formation. In *Viruses of Plants*, A.B.R. Beemster and J. Dijkstra, eds. (Amsterdam: North-Holland), pp. 127-150. in: *Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests*. Enyedi, A., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, I. (1992) *Cell* 70: 879-886.
- Segrest, J. P. and Jackson, R. L. (1972) Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. en *Methods in Enzymology*. Vol XXVIII. Part B. (Ginsburg, V., Ed.) pp. 54 - 62. Ac. Press, New York.
- Sharp, J., Valent, B. and Albersheim, P. (1984a) Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* 259: 11312-11320.

- Sharp, J., McNeil, M. and Albersheim, P. (1984b) The structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. J. Biol. Chem. 259: 11321-11336.
- Somogyi, M. A. (1945) A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 160: 61.
- Stab, M. and Ebel, J. (1987) Effects of Ca^{2+} on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. Arch. Biochem. Biophys. 257: 416 - 423.
- Swain, T. (1977) Secondary compounds as protective agents. Annu. Rev. Plant. Physiol. 28:479-501.
- Trewavas, A. and Gilroy, S. (1991) Signal transduction in plant cells. Trends in Genetics 7: 356 - 361.
- Walter, H. M., Grima-Pettenati, J. Ground, C., Boudet, A. M., Lamb, C. J. (1988) Cinnamyl alcohol dehydrogenase, cDNA and mRNA induction by fungal elicitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5546-5550.
- Ward, E., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Mettraux, J. P. and Ryals, J. A. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. The Plant Cell 3: 1085-1094.
- West, C. A. (1981) Fungal elicitors of the phytoalexin response in higher plants. Naturwissenschaften 68:447-457
- Wildon, D. C., Thain, J., Minchin, P., Gubb, I., Reilly, A., Skipper, Y., Doherty, H., O'Donnell and Bowles, D. (1992) Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. Nature 360:62-65.
- Yoshikawa, M., Keen, N. T. and Wang, M. C. (1983) A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. Plant Physiol. 73: 497-506.
- Zucker, M. (1965) Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiol. 40: 779-784.