

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo A. C.**

**EFEECTO DE OLIGOGLUCANOS FÚNGICOS EN EL
SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO DE
Cucurbita pepo L. BAJO ESTRÉS POR TEMPERATURA**

PRESENTADA POR

Abel Cerón García

TESIS APROBADA POR LA COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS

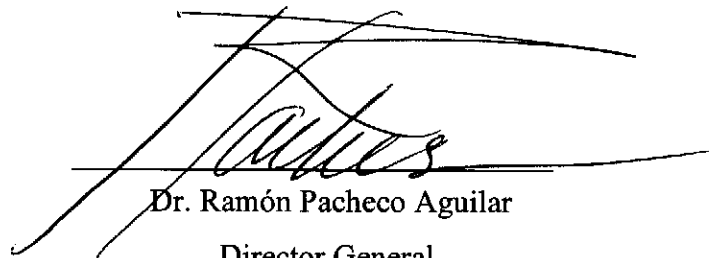
Hermosillo, Sonora

Marzo de 2011

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y se agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

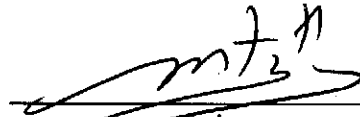
La publicación de comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberán dar los créditos correspondientes al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General.

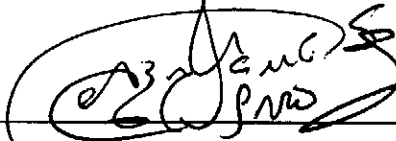
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Abel Cerón García, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.



Dr. Miguel Ángel Martínez-Téllez

Director



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna



Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se lo dedico a mi Dios, y Señor Jesucristo, quién siempre ha estado guiándome y orientándome, en todo momento, para alcanzar una más de las metas trazadas en esta vida.

También este trabajo es dedicado a mi familia; mi amada madre y mis hermanos. Pues siempre han estado atentos en mi persona, y motivándome a dar siempre lo mejor que tengo. Incluyo en este apartado a Bethel, mi amada esposa; que sin duda, ella conoce a fondo, el lado personal de este logro alcanzado.

Extiendo esta dedicatoria al Lic. Alfredo Cerón San Nicolás y Familia, así como a la Dra. Clara Pelayo Zaldívar por todo el apoyo brindado, y por ser quienes me motivaron e impulsaron para incursionar en este apasionante campo de acción y de conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACyT por todo el apoyo económico brindado durante toda la realización de este trabajo de investigación.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por permitirme formar parte de su historia, siendo la casa que me abrió sus puertas para llevar a cabo la realización de este trabajo, pero sobretodo por ser el sitio donde se le dio forma a todo esto.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez, por su dirección en este trabajo de investigación, por su apoyo incondicional, por las ideas, las exigencias, las sugerencias; que más que ser direccionadas para este documento, el sentido real es hacia mi formación académica, y por supuesto, mi vida. Gracias por su confianza.

Agradezco al Dr. Gustavo González Aguilar, Dra. María auxiliadora Islas Osuna y la Dra. Irasema Vargas Arispuro, por todo el asesoramiento brindado durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por permitirme hacer uso de las instalaciones en sus respectivos laboratorios, por su orientación, sugerencias y consejos que valoro y atesoro. Gracias porque más que ser un comité de tesis, son un grupo de amigos que admiro, y que siempre mostraron su interés durante mi formación académica. Gracias por su confianza.

Agradezco de manera general a todos los investigadores, técnico y estudiantes que pertenecen a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal del CIAD, por cualquier aportación que hayan hecho para este trabajo, por acompañarme en los seminarios departamentales, y permitirme formar parte de la historia de esta Coordinación.

Agradezco, particularmente, por el apoyo técnico ofrecido durante el desarrollo de este trabajo de investigación a mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Vegetal; gracias al Q.B. Francisco Soto Córdova por el asesoramiento en las técnicas cromatográficas que se emplearon en este trabajo. Gracias al Q.B. Olivia Briceño Torres por su apoyo técnico y administrativo, que siempre me brindo muy gentilmente. Gracias al M. C. Emmanuel Aispuro Hernández por su apoyo técnico y de gestión para la publicación de los hallazgos derivados de este trabajo de investigación. Gracias al M. C. Marisol Ochoa Villareal por el apoyo técnico ofrecido durante la parte final de este trabajo de investigación.

Agradezco el apoyo técnico ofrecido por el personal del Laboratorio de Ecología Química; gracias al Q.B. Socorro Vallejo Cohen y al M. C. Consuelo Guadalupe Corrales Maldonado, por su apoyo durante el aislamiento y propagación del material fúngico evaluado en este trabajo de investigación, y por las facilidades prestadas durante la realización de varios experimentos preliminares bajo su supervisión.

Agradezco el apoyo técnico en la recabación y soporte documental de este trabajo de investigación al personal de la Biblioteca: Gerardo Reyna Cañez, Luis Francisco Conde Ortiz y Fernando Alejo Leyva Livshin.

Gracias por su compañerismo y amistad a Manuel, Iván, Vanesa, Blanca, Azucena y a mis compañeros del Doctorado. Agradezco a todos aquellos que, de una u otra forma, hicieron de mi estancia en el CIAD algo muy agradable.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
SINOPSIS	ix
BIBLIOGRAFÍA.....	xv

CAPÍTULO 1

EFFECTOS ELICITORES DE OLIGOGLUCANOS DURANTE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS.....	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Especies Reactivas de Oxígeno y Estrés Oxidativo	4
Sistema Antioxidante en plantas	5
Respuestas de defensa ante estrés oxidativo en plantas.....	8
Elicitores en plantas.....	10
Respuestas bioquímicas elicidadas por oligosacáridos.....	10
Oligoglucanos.....	12
Receptores de oligoglucanos en plantas	13
Mecanismo de acción de oligoglucanos en plantas	15
CONCLUSIÓN.....	15
BIBLIOGRAFÍA	17

CAPÍTULO 2

RESPUESTA DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO DE CALABAZA ZUCCHINI BAJO ESTRÉS TÉRMICO POR APLICACIÓN DE OLIGOGLUCANOS.....	24
RESUMEN	25

ABSTRACT	25
INTRODUCCIÓN	26
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Material vegetal.....	28
Establecimiento de la condición de estrés por calor	28
Marcadores biológicos de estrés térmico.....	29
Pérdida iónica relativa (PIR).....	29
Producción de H ₂ O ₂	30
Recuperación del estrés en plántulas de calabaza	30
Obtención e hidrólisis de pared celular de <i>T. harzianum</i>	31
Purificación de oligoglucanos activos	31
Análisis de carbohidratos en los oligoglucanos activos	32
Aplicación de tratamientos en plantas	33
Evaluación enzimática de SOD.....	33
Evaluación enzimática de APX.....	34
Evaluación enzimática de CAT.....	35
Determinación del contenido de proteína soluble	35
Análisis estadísticos	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Efecto del estrés térmico en plántulas de calabaza	36
Aislamiento y caracterización de los oligoglucanos activos	41
Actividad biológica de oligoglucanos en el sistema antioxidante enzimático.....	45
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48

CAPÍTULO 3

OLIGOGLUCANS AS ELICITORS OF AN ENZYMATIC ANTIOXIDANT SYSTEM IN ZUCCHINI SQUASH (<i>Cucurbita pepo</i> L.) SEEDLINGS AT LOW TEMPERATURE.....	54
ABSTRACT	55

RESUMEN	56
INTRODUCTION	57
MATERIALS AND METHODS.....	59
Plant material and stress conditions	59
Ion Leakage (IL) and H ₂ O ₂ content.....	59
Fungal cell-wall preparation	60
Isolation of OG mixtures	61
Biological assays using OG mixtures.....	61
Biological assays using OG SEC fractions.....	63
Biological assays using OG AEC sub-fractions	63
Statistical analysis	64
RESULTS.....	64
Establishment of cold stress condition	64
Changes in SOD activity	66
Changes in APX activity	68
Changes in CAT activity	68
DISCUSSION	71
CONCLUSION.....	76
REFERENCES	77
CONCLUSIONES GENERALES	82
PERSPECTIVAS	83
Anexos	I

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema antioxidante enzimático y no enzimático en plantas.....	7
Figura 2. Principales oligosacáridos reconocidos por las plantas: (A) oligoglucano, (B) oligogalacturónido, (C) oligómero de quitina, (D) oligómero de quitosano. Glc, glucosa; GalUA, ácido galacturónico; GlcNAc, N-acetil glucosamina; GlcN, N-glucosamina.	11
Figura 3. Mecanismo de acción del efecto elicitor de oligoglucanos en plantas.....	16
Figura 4. Pérdida iónica relativa (A) y contenido de H ₂ O ₂ (B) en plántulas de calabaza zucchini bajo estrés a 45 °C: ●, control a 25 °C; ▼, plántulas con estrés a 45 °C; ■, plántulas recuperadas del estrés durante 3 días a 25 °C.	37
Figura 5. Efecto de los oligoglucanos de <i>T. harzianum</i> sobre el sistema antioxidante enzimático en cotiledones de calabaza zucchini con estrés por calor (45 °C, 12 h). Actividad enzimática de SOD (A), APX (B) y CAT (C). Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (p≤0.05).	39
Figura 6. Purificación de los oligoglucanos activos derivados de la pared celular de <i>T. harzianum</i> . Fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaño (A) y sub-fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico (B). —, fracción analizada; ---, fracción descartada.....	42
Figura 7. Rate of ion leakage (A) and H ₂ O ₂ production (B) in cold-stressed zucchini cotyledons (5°C). Results are mean ± SD of at least three replications	65
Figura 8. Changes in SOD activity in cold-stressed zucchini cotyledons elicited with enzymatic (A) and chemical (B) oligoglucan mixtures. Both mixtures include their respective SEC fractions. Different letters indicate significant differences (p≤0.05) between values. Controls (-, +) correspond to non-elicited plants	67
Figura 9. Changes in APX activity in cold-stressed cotyledons elicited with enzymatic (A) and chemical (B) oligoglucan mixtures. Both mixtures include their respective SEC fractions and their AEC sub-fractions (only C). Different letters indicate significant differences (p≤0.05) between values. Controls (-, +) correspond to non-elicited plants. Inserts represent D-glucose contents from pooled enzymatic or chemical SEC fractions (A and B)	69
Figura 10. Changes in CAT activity in cold-stressed cotyledons elicited with enzymatic (A) and chemical (B) oligoglucan mixtures. Both mixtures include their respective SEC fractions and their AEC sub-fractions (only C and D). Different letters indicate significant differences (p ≤ 0.05) between values. Controls (-, +) correspond to non-elicited plants. Inserts represent D-glucose contents from pooled enzymatic or chemical SEC fractions (A and B) or AEC sub-fractions (C and D)	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Carbohidratos identificados en oligoglucanos activos de <i>T. harzianum</i>	44
---	----

SINOPSIS

Los radicales libres son especies químicas altamente oxidantes, con uno o más electrones libres no apareados, que reaccionan con otras especies químicas generando nuevos radicales y reacciones de oxidación en cadena (Halliwell y Gutteridge, 2006). Las principales especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas en las plantas son: el anión superóxido ($O_2\bullet^-$), el radical hidróxilo ($\bullet OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies químicas presentan características oxidantes idénticas a los radicales libres y se producen en el cloroplasto, mitocondria y peroxisomas (Foyer y Noctor, 2003), mediante vía enzimática, principalmente por las enzimas NADPH-oxidasas que se encuentran unidas a la membrana plasmática, por peroxidasas unidas a la pared celular, así como a las amino- y flavin-oxidasas que están presentes en el citoplasma.

Independientemente de que las ERO se producen como parte del metabolismo responsable de generar la energía en la célula, la presencia de condiciones estresantes impactan directamente su producción, incrementando considerablemente los niveles de susceptibilidad celular. Bajo condiciones libres de estrés, la formación y remoción de las ERO se encuentra en equilibrio (del Río *et al.*, 2006). Sin embargo, este equilibrio puede ser alterado fácilmente, incrementándose de 3 a 10 veces los niveles normales de las ERO al interior de la célula (Apel y Hirt, 2004). Esta acumulación excesiva afecta severamente la actividad catalítica de las enzimas involucradas en la producción de energía, el metabolismo de los aminoácidos y finalmente, conducen a la muerte celular (Halliwell, 2006).

Bajo condiciones tolerables de estrés oxidativo, las plantas cuentan con mecanismos de defensa que contrarrestan esta condición adversa, permitiendo la reducción del estrés oxidativo producido por las ERO sobre las moléculas biológicas como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Este mecanismo de defensa, se compone por el sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y catalasa) y el sistema antioxidante no-enzimático (glutación, ascorbato, tocoferol, carotenos y compuestos fenólicos). La enzima superóxido dismutasa (SOD, EC. 1.15.1.1) es responsable de eliminar el $O_2^{\bullet-}$ mediante dismutación generando H_2O_2 . La actividad de SOD puede ser dependiente de Cu/Zn, Fe y Mn, y su conformación estructural se presenta como homodímeros y/o homotetrámeros (Alscher *et al.*, 2002). Una vez generado el H_2O_2 , las peroxidasas son las responsables de su eliminación por oxidación empleando varios sustratos (ascorbato y glutación). La ascorbato peroxidasa (APX, EC. 1.11.1.7) es una de las enzimas con mayor actividad para eliminar H_2O_2 . También, la enzima catalasa (CAT, EC. 1.11.1.6), presente principalmente en peroxisomas cumple con la función de eliminar el H_2O_2 (Asada, 2006).

Los efectos que provocan las ERO en plantas son dependientes de la concentración con que se presentan en la célula, y pueden ser benéficos cuando a bajas concentraciones de ERO pueden activar mecanismos de defensa natural de la planta, o en contraparte hasta producir daños severos en las membranas celulares debido a altas concentraciones de ERO. La exposición de las plantas a altas o bajas temperaturas favorece la producción y acumulación de ERO, que pueden disminuir el adecuado funcionamiento celular de las

plantas (Mittler *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el estrés por calor induce la peroxidación de lípidos de las membranas celulares. Además, se ha observado que este tipo de estrés altera negativamente la transcripción y los niveles de proteínas de varias enzimas antioxidantes (Vacca *et al.*, 2004). También, se ha reportado que el estrés por frío estimula la transcripción y la actividad de diversas enzimas que eliminan a las ERO (Sato *et al.*, 2001). Lo anterior refleja el efecto que tiene las temperaturas extremas para inducir la acumulación de H₂O₂ y otras especies reactivas en las células, y en consecuencia, afectar el sistema antioxidante de las plantas.

Evaluando esta situación, desde un punto de vista económico, las temperaturas extremas generan cuantiosas pérdidas en la producción en diversos cultivos agrícolas, sobretodo en climas tropicales donde se ha llegado a reportar pérdidas superiores al 50 % en productos hortofrutícolas (Hall, 2001). En países como Estados Unidos, las pérdidas en la agricultura se han cuantificado alrededor de \$150 billones de dólares en los últimos 30 años (Mittler, 2006). En un mundo tan cambiante, donde día a día el impacto de la actividad industrial así como el uso inadecuado de los recursos naturales, trae como consecuencia cambios climáticos que repercuten directamente en el metabolismo de las plantas y a su vez, en la producción agrícola a nivel global, es prioritario orientar esfuerzos hacia la mejora en los sistemas de producción agrícola, donde el impacto negativo por condiciones ambientales adversas es una situación recurrente (Rennenberg *et al.*, 2006).

En base a lo anteriormente expuesto, en esta tesis se evaluó el efecto de productos alternativos que reduzcan los efectos adversos provocados en las plantas cuando se

encuentran sometidas a condiciones ambientales no favorables, como los son las altas y/o bajas temperaturas. A este respecto, la inducción de mecanismos de defensa en plantas, ante condiciones de estrés, promueve beneficios que no se han logrado obtener de manera satisfactoria al implementar tratamientos que involucran el acondicionamiento térmico o la manipulación génica. Siendo la estrategia seguida, la aplicación de moléculas elicitoras, como los oligoglucanos que son capaces de estimular diversos mecanismos de defensa en plantas, tal como la síntesis de fitoalexinas, la producción controlada de ERO mediante el complejo enzimático NADPH oxidasa, que activa la fosforilación de proteínas cinasas, afectando diversos factores de transcripción que modifican selectivamente la expresión de genes relacionados con la defensa, entre los cuales se incluyen varios genes que forman parte del metabolismo secundario. Sin embargo, se desconoce si la inducción exógena con oligoglucanos afecta la actividad del sistema antioxidante en plantas bajo condiciones de estrés térmico.

Por lo que, esta investigación sostiene la hipótesis de que la aplicación exógena de oligoglucanos de *Trichoderma harzianum* incrementa la actividad del sistema antioxidante en cotiledones de calabaza zucchini (*Cucurbita pepo* L.) bajo condiciones de estrés por alta y baja temperatura. Para contrastar esto, se obtuvieron y caracterizaron oligoglucanos de *T. harzianum*, así mismo, se evaluó su efecto elicitor o inductor en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y catalasa del sistema antioxidante de calabaza zucchini bajo estrés térmico.

En el capítulo 1, se hace referencia a los aspectos generales de las ERO y su interacción con los sistemas antioxidantes en plantas. En donde se destaca el carácter altamente reactivo de las ERO y cómo se producen en las plantas y bajo qué condiciones, así como las vías de eliminación, inactivación y/o secuestro mediado por el sistema antioxidante enzimático y no-enzimático. Se destaca el papel que desarrollan las ERO como parte del sistema de defensa de las plantas, particularmente ante el ataque de fitopatógenos (reforzando las paredes celulares, induciendo la expresión de genes relacionados con la defensa y provocando la muerte celular en el tejido infectado). Además, se abordan las respuestas bioquímicas generadas en las plantas debido al reconocimiento de los inductores o elicitores derivados de las paredes celulares de plantas y hongos. Se describe de manera específica, las características estructurales de estas moléculas de señalización, así como los efectos biológicos producidos por los oligoglucanos fúngicos, que han sido aislados por diversos procedimientos de hidrólisis enzimática y química de la pared celular fúngica.

En el capítulo 2, se analizó el efecto producido debido al estrés por alta temperatura (45 °C) sobre la actividad de las enzimas del sistema antioxidante enzimático en cotiledones de calabaza zucchini cv. "Raven". La condición de estrés por temperatura no afectó la actividad enzimática de SOD, mientras que la actividad APX aumentó ligeramente, siendo la actividad enzimática de CAT la que se ve afectada negativamente (reducción de 54 %). El efecto biológico de inducción, por parte de los oligoglucanos fúngicos, obtenidos por hidrólisis enzimática a partir de la pared celular de *T. harzianum*, así como su purificación por cromatografía de exclusión por tamaño (6 kDa) y por

cromatografía de intercambio aniónico (Q-sefarosa), fue mayor en la actividad enzimática de CAT con incrementos cercanos al 300 % respecto a los controles establecidos. El efecto producido en la actividad SOD fue mínimo, y sólo para un tipo particular de oligoglucano, mientras que no se apreció un efecto potenciador de la actividad APX debida a los oligoglucanos fúngicos en cotiledones de calabaza bajo estrés a 45 °C. El efecto negativo producido por las condiciones de estrés por calor (45 °C, 12 h) en la actividad CAT del sistema antioxidante en el modelo de estudio, es revertida por la aplicación de los oligoglucanos fúngicos, incrementando en más de 700 % esta actividad enzimática, además estas moléculas potencian la actividad SOD en un 90 %. Estos oligoglucanos activos contienen a la glucosa como el monosacárido más abundante (aproximadamente 50 %). Estas moléculas elicitoras resultan ser alternativas viables para revertir los efectos adversos, debidos a condiciones ambientales extremas, como lo son las altas temperaturas (45 °C) en plántulas de calabaza zucchini.

En el capítulo 3, se analizó el efecto que se produce debido al estrés por bajas temperaturas (5 °C, 7 d) en el modelo de estudio de este trabajo de investigación que fueron cotiledones de calabaza zucchini cv. “Raven”. Se observó como la actividad del sistema antioxidante enzimático es incrementada significativamente, por efecto del tratamiento de inducción con oligoglucanos fúngicos. Específicamente, en la actividad enzimática de CAT con las diferentes mezclas de oligoglucanos fúngicos obtenidas por hidrólisis enzimática y química de la pared celular de *T. harzianum*, así como a los correspondientes procesos de purificación por cromatografía de exclusión por tamaño y de intercambio aniónico a los que fueron sometidas las diversas mezclas de oligoglucanos. Los oligoglucanos de *T.*

harzianum, no solo revierten el efecto negativo de las bajas temperaturas en la actividad SOD en cotiledones de calabaza zucchini, sino que refuerzan el sistema antioxidante, al incrementar la actividad de la enzima CAT en más de 120 %. Por lo anterior, estas moléculas elicitoras resultan ser una alternativa viable en la protección en plántulas de calabaza zucchini ante condiciones ambientales adversas (5 °C, 7 d).

BIBLIOGRAFÍA

- Alscher R G, N Erturk, L S Heath (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53:1331-1341.
- Apel K, H Hirt (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review in Plant Biology* 55:373-399.
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141:391-396.
- del Río L A, L M Sandalio, F J Corpas, J M Palma, J B Barroso (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141:330-335.
- Foyer C H, G Noctor (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119:355-364.
- Hall A E (2001) Crop responses to environment. CRS Press LLC, Boca Raton, pp 324.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology in fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141:312-322.
- Halliwell B, J M C Gutteridge (2006) Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford. 704 p.

- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11:15-19.
- Mittler R, S Vanderauwera, M Gollery, F Van Breusegem (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9:490-498.
- Rennenberg H, F Loreto, A Polle, F Brillì, S Fares, R S Beniwal, A Gessler (2006) Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biology* 8:556-571.
- Sato Y, T Murakami, H Funatsuki, S Matsuba, H Saruyama, M Tanida (2001) Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany* 52(354):145-151.
- Vacca R A, M C de Pinto, D Valenti, S Passarella, E Marra, L De Gara (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiology* 134:1100-1112.

EFECTOS ELICITORES DE OLIGOGLUCANOS DURANTE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS

Manuscrito de revisión enviado a la Revista Fitotecnia Mexicana

RESUMEN

El estrés oxidativo es producto de la acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en plantas que se encuentran sometidas al efecto de estreses bióticos y/o abióticos. Ante esta situación, las plantas cuentan con un eficiente sistema de eliminación de ERO basado en dos sistemas antioxidantes. El sistema enzimático (superóxido dismutasa, SOD; catalasa, CAT; ascorbato peroxidasa, APX) y no enzimáticos (carotenoides, tocoferoles, glutatión, compuestos fenólicos) para contrarrestar los efectos adversos de ERO sobre los lípidos, proteínas y ADN, que son macromoléculas indispensables para las estructuras y funciones celulares. Se ha demostrado que los oligogalacturónidos y los oligoglucanos derivados de las paredes celulares de plantas y de hongos respectivamente, actúan en plantas induciendo múltiples respuestas biológicas, entre ellas la producción de ERO y la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis, como uno de los mecanismos de defensa ante el ataque de fitopatógenos. Por lo que su estudio es imprescindible para el diseño de estrategias que permitan una reducción de los efectos negativos del estrés oxidativo en plantas.

ABSTRACT

Plants under the effect of biotic and/or abiotic factors may increase reactive oxygen species (ROS), their accumulation produce the oxidative stress. Plants employs an efficient ROS scavenging system based on enzymatic antioxidants (superoxide dismutase, SOD; catalase, CAT; ascorbate peroxidase, APX) and non-enzymatic antioxidants (carotenoids, tocopherols, glutathione, phenolic compounds) for resist to ROS adverse effects against important macromolecules necessities for cells structural and functionality: lipids, proteins

and nucleic acids. Multiple biological responses had been demonstrated using plant cell wall derivated oligogalacturonides and some fungal oligoglucans. ROS overproduction is a fast plant defense response during phytopathogen attack. Therefore, increasing the knowledge about oligoglucan elicitors, its contribute to design strategies that reduced the negative effects in plants during oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

El oxígeno molecular es esencial para la existencia de la vida de los organismos aerobios incluyendo las plantas. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno (ERO), que contemplan al anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), radical perhidroxilo ($\bullet O_2H$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se generan en todas las células aerobias como subproductos de los procesos metabólicos normales (Asada, 1999). En general, bajo diversas condiciones de estrés ambiental, las ERO muestran un incremento en sus niveles en células de plantas y se produce el estrés oxidativo. En efecto, el estrés oxidativo es una de las mayores causas de daño celular en plantas expuestas a estrés ambiental (Park *et al.*, 2004).

Por otro lado, cuando inciden de manera directa los efectos de diversos agentes bióticos y/o abióticos en las plantas, una de las primeras respuestas de defensa es la generación de ERO. Durante el estrés oxidativo ocurren múltiples procesos de señalización donde se ha visto implicado el efecto inductor de múltiples componentes de la pared celular de hongos y plantas. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue realizar una revisión sobre el estrés

oxidativo generado en plantas y su mediación con la inducción o elicitación de respuestas de defensa llevada a cabo por oligosacáridos, y de manera particular, por oligoglucanos.

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es definido como la producción rápida de $O_2\bullet^-$ y/o H_2O_2 en respuesta a diversos estímulos externos (Wojtaszek, 1997) en consecuencia al disturbio entre su producción y eliminación de la célula. El decremento de la actividad catalítica en los sistemas antioxidantes en plantas también es una razón por la que se presente el estrés oxidativo (Shigeoka *et al.*, 2002). El equilibrio del sistema antioxidante puede ser perturbado por un gran número de factores de estrés abiótico como la luz intensa, sequía, bajas y altas temperaturas y daño mecánico (Tsugane *et al.*, 1999). La presencia de metales pesados en los sitios de cultivo, como sucede con la contaminación por plomo (Pb) induce el estrés oxidativo que daña las células y sus componentes como los cloroplastos, además alteran la concentración de diferentes metabolitos incluyendo proteínas solubles, prolina, ascorbato y glutatión, y los antioxidantes enzimáticos (Reddy *et al.*, 2005). Por otro lado, los procesos relacionados con el deterioro de frutas y hortalizas, ya sea por ataque de fitopatógenos o por la senescencia, son factores que aumentan los niveles de las ERO en la célula (Reilly *et al.*, 2004).

En las plantas, las ERO son los subproductos de varias rutas metabólicas localizadas en diferentes compartimientos celulares (cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, principalmente). Bajo condiciones fisiológicas o basales, las ERO son eliminadas por diferentes componentes de defensa del sistema antioxidante (Alscher *et al.*, 2002). Sin

embargo, cuando las plantas se encuentran bajo el efecto de distintos factores bióticos y/o abióticos, la acción catalítica de diversos antioxidantes se afecta negativamente para combatir los efectos del estrés (Qadir *et al.*, 2004).

Una característica común entre los diferentes tipos de ERO es su capacidad de causar daño oxidativo en proteínas, lípidos y ADN. Sin embargo, dependiendo de su concentración a nivel celular, las ERO también pueden funcionar como moléculas de señalización relacionadas con la regulación de las respuestas de defensa ante patógenos (Apel y Hirt, 2004). Se ha propuesto que las ERO afectan las respuestas al estrés en dos diferentes formas. Los ERO actúan sobre una gran variedad de moléculas biológicas, causando daños irreversibles que conducen a la necrosis del tejido y en un caso extremo, a su muerte (Girotti, 2001). Por otro lado, las ERO afectan la expresión de varios genes y rutas de transducción de señales relacionadas con la defensa de la planta (Apel y Hirt, 2004).

SISTEMA ANTIOXIDANTE EN PLANTAS

El cloroplasto es el compartimiento celular asociado con el sistema fotosintético de transporte de electrones de alta energía y un generoso proveedor de oxígeno, por lo que es una fuente rica en ERO (Asada, 1999). Un gran número de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos han evolucionado para detoxificar las ERO y/o prevenir la formación de radicales altamente reactivos y dañinos como el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Los antioxidantes no enzimáticos incluyen al ascorbato y glutatión (GSH), así como tocoferol, flavonoides, alcaloides, carotenoides y compuestos fenólicos. Existen tres antioxidantes enzimáticos

claves para la detoxificación de las ERO en el cloroplasto; superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1; SOD), ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11; APX) y catalasa (EC 1.11.1.6; CAT). La SOD cataliza la dismutación de dos moléculas de $O_2^{\bullet-}$ en O_2 y H_2O_2 . Por otro lado, utilizando ascorbato como donador de electrones, la enzima APX reduce el H_2O_2 en H_2O . La formación de los radicales hidroxilos por $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 puede ser controlada por la combinación de reacciones de dismutación llevadas a cabo por las enzimas SOD, APX y CAT (Tang *et al.*, 2006) (Figura 1).

La SOD es una de las principales enzimas secuestradora de ERO encontradas en los organismos aerobios. En las plantas, tres tipos de SOD se distinguen en base al cofactor de su sitio activo: manganeso SOD (MnSOD), cobre/zinc SOD (Cu/ZnSOD) y hierro SOD (FeSOD) (Reilly *et al.*, 2004). La CAT es un tetrámero que contiene 4 grupos hemo, localizada principalmente en peroxisomas (Apel y Hirt, 2004) y que elimina H_2O_2 . Se ha propuesto que CAT juega un papel en la mediación de la transducción de señales que relacionan al H_2O_2 como segundo mensajero, posiblemente vía un mecanismo relacionado con el ácido salicílico (Leon *et al.*, 1995).

Por otro lado, la enzima APX ha sido encontrada en plantas superiores, algas y en algunas cianobacterias, pero no en animales. Es necesario que las plantas posean elevados niveles de ascorbato endógeno para mantener funcionalmente viable la acción antioxidante de esta enzima (Shigeoka *et al.*, 2002). La actividad de APX en plantas se ha visto incrementada en respuesta a varias condiciones de estrés como la sequía, ozono, químicos, salinidad, calor, infecciones (Mittler y Zilinskas, 1994; López *et al.*, 1996). Con la

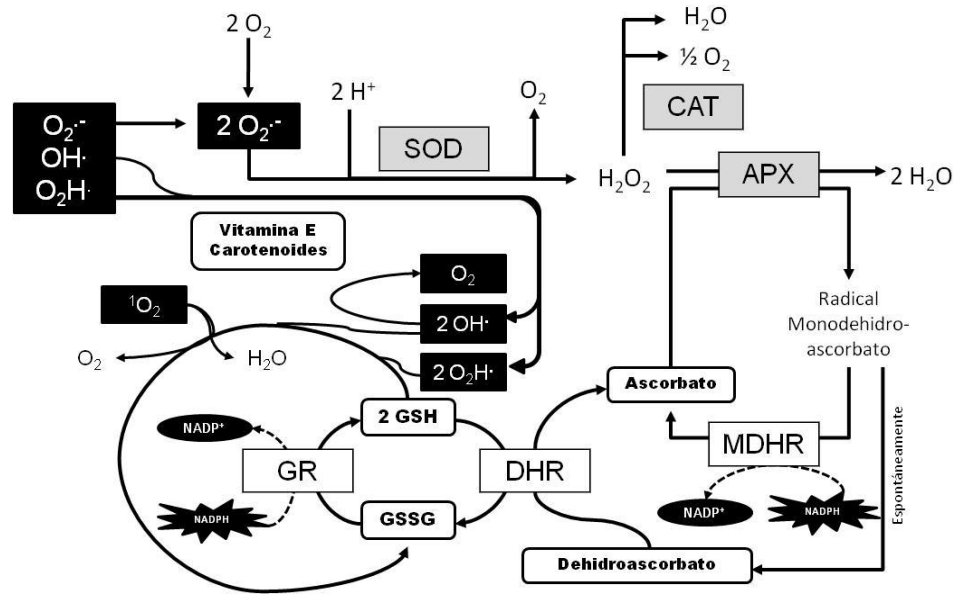


Figura 1. Sistema antioxidante enzimático y no enzimático en plantas. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) son las proteínas responsables de eliminar a las ERO. Mientras que la eliminación de las ERO mediante procesos no enzimáticos es llevada a cabo por vitamina E, carotenoides, ascorbato, glutatión oxidado (GSH) y reducido (GSSG). Las enzimas que promueven la eliminación de las ERO a través del ciclo ascorbato-glutatión son monodehidroascorbato reductasa (MDHR), dehidroascorbato reductasa (DHR) y glutatión reductasa (GR) (Modificado de Halliwell, 2006).

secuenciación de *Arabidopsis thaliana* se ha revelado la presencia de 9 genes de APX (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Diferentes isoenzimas de APX han sido identificadas en células vegetales: citosólica (Ishikawa *et al.*, 1995), peroxisomal (Ishikawa *et al.*, 1998), dos APX cloroplasmáticas (en el estroma y en el tilacoide) (Ishikawa *et al.*, 1996) y mitocondrial (De Leonardis *et al.*, 2000). Cada una de ellas con un rol específico, siendo activadas o inhibidas en respuesta a diferentes señales celulares. La isoenzima APX citosólica ha sido considerada una de las más importantes enzimas de defensa contra el H₂O₂. Debido a su localización celular, es la primera en recibir las señales producidas durante el estrés, actuando de manera muy rápida con el fin de prevenir severos daños en la célula y/o en el tejido completo. Existen reportes del aislamiento de cDNAs de APX citosólica en diversas plantas como chícharo (Mittler y Zilinskas, 1992), *Arabidopsis* (Jespersen *et al.*, 1997), arroz (Morita *et al.*, 1999), espinaca (Webb y Allen, 1995), tabaco (Orvar y Ellis, 1995) y papa (Park *et al.*, 2004; Kawakami *et al.*, 2002). Sin embargo, la información acerca de la organización genómica de la APX citosólica es escasa, ya que solo existe esta información completa para genes de APX en tomate (Gadea *et al.*, 1999) y chícharo (Mittler y Zilinskas, 1992).

RESPUESTAS DE DEFENSA DURANTE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLANTAS

Las ERO generadas durante el daño oxidativo juegan un papel clave que facilita la defensa de las plantas. Esto puede ser resumido en los siguientes puntos: (1) el reforzamiento de la pared celular, (2) la inducción de genes relacionados con la defensa y (3) provocando la muerte celular en una región particular de la planta (Reilly *et al.*, 2004).

Durante la respuesta de defensa contra fitopatógenos, las ERO son producidas por la célula vegetal mediante el incremento de la actividad de las enzimas NADPH-oxidasas unidas a las membranas plasmáticas, peroxidasas unidas a la pared celular y amino oxidasas en el apoplasto (Hammond-Kosack y Jones, 2000). El reforzamiento de la pared celular desempeña un papel muy importante en los mecanismos de defensa contra la penetración de hongos fitopatógenos (Bolwell *et al.*, 2001). Debido a que durante las respuestas de defensa por el ataque de fitopatógenos, la planta produce más ERO mientras decrece la capacidad para su eliminación, entonces la acumulación de ERO y la activación de la muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés) ocurre. La supresión de los mecanismos de eliminación de ERO es crucial para el establecimiento de la PCD. La producción de ERO en el apoplasto únicamente sin la supresión de la detoxificación de ERO no resulta en la inducción de la PCD (Delledonne *et al.*, 2001).

Las ERO pueden ser situadas entre las principales moléculas de señalización en la célula. Estas moléculas son pequeñas y pueden difundirse a corta distancia, y existen varios mecanismos para su producción, muchos de los cuales son rápidos y controlables. La generación de H₂O₂ ocurre de manera local y sistémica en respuesta al daño mecánico o heridas (Orozco-Cardenas y Ryan, 1999). Otras investigaciones muestran que el H₂O₂ funciona como segundo mensajero mediando la expresión sistemática de varios genes relacionados con la defensa en plantas de tomate (Orozco-Cardenas *et al.*, 2001).

ELICITORES EN PLANTAS

Un “elicitor” puede definirse como una molécula que, cuando se introduce en concentraciones pequeñas en un sistema biológico, inicia o promueve la síntesis de metabolitos con actividad biológica (Radman *et al.*, 2003). El tipo y estructura de los elicitores varía enormemente, por lo tanto no existe un elicitor universal (Radman *et al.*, 2003). Existen diversos elicitores que han sido purificados: oligosacáridos, proteínas, glicoproteínas y compuestos lipofílicos (Coté y Hahn, 1994). Los oligosacáridos son los elicitores más estudiados en la actualidad. Existen cuatro tipos de oligosacáridos: oligoglucanos, oligoquitina, oligoquitosano (de origen predominantemente fúngico) y oligogalacturónidos de plantas (Coté y Hahn, 1994) (Figura 2). De la misma forma que los oligosacáridos de origen fúngico y vegetal han sido estudiados, los oligosacáridos obtenidos de algas y animales han presentado una gran potencialidad como moléculas de señalización (Delattre *et al.*, 2005).

RESPUESTAS BIOQUÍMICAS ELICITADAS POR OLIGOSACÁRIDOS

De las principales respuestas bioquímicas (Radman *et al.*, 2003) que ocurren cuando una planta o un cultivo celular se confronta con un elicitor se encuentran:

- Unión del elicitor al receptor de la membrana plasmática
 - Cambios en el flujo de iones a través de la membrana
 - Cambios rápidos en los patrones de fosforilación de proteínas
 - Activación del complejo enzimático NADPH oxidasa responsable de producir ERO y la acidificación citosólica
- Reorganización del citoesqueleto

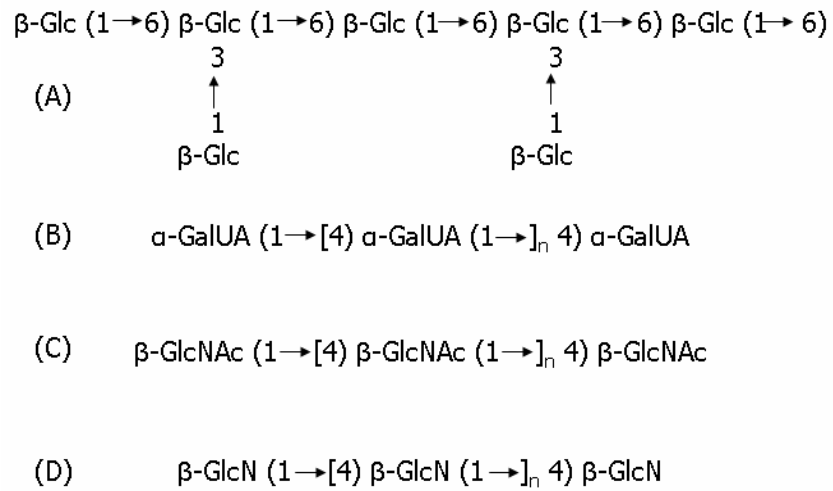


Figura 2. Principales oligosacáridos reconocidos por las plantas: (A) oligoglucano, (B) oligogalacturónido, (C) oligómero de quitina, (D) oligómero de quitosano. Glc, glucosa; GalUA, ácido galacturónico; GlcNAc, N-acetil glucosamina; GlcN, N-glucosamina.

- Acumulación de proteínas relacionadas con la defensa
- Muerte celular en el sitio de infección (respuesta hipersensible)
- Cambios estructurales de la pared celular (lignificación, deposición de calosa)
- Activación transcripcional de los correspondientes genes de defensa
- Síntesis de ácido jasmónico y salicílico como segundos mensajeros
- Resistencia adquirida sistémicamente

OLIGOGLUCANOS

Muchos hongos fitopatógenos poseen β -glucanos como los principales componentes de sus paredes celulares, los cuales son reconocidos por diferentes especies de plantas (Yoshikawa *et al.*, 1993). El grupo de trabajo de Albersheim, a mediados de la década de los 70's, fueron los primeros en extraer glucanos elicitores de fitoalexinas en soya a partir de las paredes del micelio de *Phytophthora megasperma* mediante tratamiento térmico. Estas estructuras procedentes de la pared fúngica fueron analizadas por Sharp *et al.*, (1984) detallando la estructura primaria del sitio activo de glucanos de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* (Pmg) obtenidos mediante hidrólisis ácida parcial, siendo el hepta- β -glucosido la subunidad activa del elicitor.

La caracterización parcial de la fracción con actividad elicitora de las paredes de Pmg resultaron ser β -glucanos con residuos terminales de enlaces glucosídicos 1-3 (42%), 1-6 (26%) y 1-3, 1-6 (27%) (Sharp *et al.*, 1984; Waldmüller *et al.*, 1992). Además se observó que la forma de obtener los fragmentos de pared celular influye en el tipo de enlaces que presente el elicitor fúngico. Si el elicitor es liberado naturalmente o por un tratamiento

térmico, éste diferirá sustancialmente de aquellos glucanos obtenidos por hidrólisis ácida parcial. Mientras que los glucanos liberados naturalmente presentan ramificaciones β -(1-3;1-6), las proporciones de enlaces β -(1-6) se encuentran en mayor proporción si el glucano fue liberado a partir de hidrólisis ácida (Waldmüller *et al.*, 1992).

RECEPTORES DE OLIGOGLUCANOS EN PLANTAS

Para que ocurra el reconocimiento de los elicitores por parte de las plantas, debe ocurrir la interacción del oligoglucano y su receptor (Yoshikawa *et al.*, 1993). En plantas, los receptores para los elicitores fúngicos se encuentran en la superficie celular, mientras que para los elicitores de bacterias, sus receptores se encuentran al interior de la célula (Ebel y Scheel, 1997). Otros sitios de unión para oligosacáridos, glicopéptidos, péptidos y proteínas se localizan en la superficie celular y en las membranas (Cosio *et al.*, 1990). Se han reportado proteínas unidoras en membranas de soya para los hepta- β -glucósidos (1-3, 1-6) ramificados y para sus fracciones (Cosio *et al.*, 1992). Otros sitios de unión para glicopéptidos de levaduras han sido reportados en células de tomate (Basse *et al.*, 1993); para quito-oligosacáridos en células de tomate y de arroz (Baureithel *et al.*, 1994) y en células de perejil para tridecapéptidos obtenidos de glicoproteínas de pared celular de *Phytophthora sojae* (Nürnbergger *et al.*, 1994). Por otro lado, la inducción de fitoalexinas por los β -glucanos fúngicos presenta una buena correlación con la presencia o ausencia de sitios de unión de alta afinidad en varios géneros de plantas de la familia Fabaceae (Cosio *et al.*, 1996). Un método clave para evaluar la presencia de receptores en las membranas es mediante los ensayos de unión de ligandos homogéneos en membranas aisladas (Yoshikawa *et al.*, 1993). Los experimentos de competición con radioligandos usando

hepta- β -glucanos no derivatizados como agente competitivo mostraron la existencia de unión específica en al menos cuatro (alfalfa, frijol, lupino y chícharo) de seis especies de plantas de la familia Fabaceae analizadas por Cosio *et al.*, (1996).

Los oligoglucanos activos pueden ser obtenidos de la pared celular de algas, así como de hongos fitopatógenos (Shinya *et al.*, 2006). El oligoglucano laminarina es un β -1,3-glucano con ramificaciones β -1,6-glucosa, que estimula de manera importante las respuestas de defensa en diversos cultivos incluido el tabaco. El elicitor fúngico mejor conocido es el heptaglicosido (penta β -1,6-glucosa con dos ramificaciones β -1,3-glucosa) que fue aislado de las paredes celulares de *Phytophthora megasperma*. Este oligoglucano elicita respuestas de defensa en cultivos celulares de soya pero no en cultivos celulares de tabaco o arroz (Cheong y Hahn, 1991; Klarzinsky *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2000). Un oligoglucano ramificado aislado de *Pyricularia oryzae* induce fitoalexinas en arroz pero no en soya (Yamaguchi *et al.*, 2000). Mientras que oligoglucanos lineales resultan ser activos en tabaco (Klarzinsky *et al.*, 2000), pero no en arroz (Yamaguchi *et al.*, 2000) o en soya (Cheong y Hanh, 1991). Otro oligoglucano obtenido de la pared celular de *Colletotrichum lindemuthianum* que produce daño oxidativo, frecuente respuesta de las plantas ante la invasión de fitopatógenos, ha sido estudiado ampliamente en cultivos celulares de *Phaseolus vulgaris* (Sudha y Ravishankar, 2002). Lo anterior, claramente expone la gran diversidad de oligoglucanos así como los diversos efectos biológicos que pueden generar en la planta o cultivo a evaluar.

MECANISMO DE ACCIÓN DE OLIGOGLUCANOS EN PLANTAS

Doke *et al.*, (1996) propusieron un mecanismo del daño oxidativo en células de plantas en respuesta a elicitores obtenidos de pared celular fúngica. La molécula elicitora del hongo invasor es reconocida por su receptor en la membrana plasmática, este reconocimiento estimula el influjo de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} . El incremento de Ca^{2+} libre en la célula actúa como segundo mensajero junto con la activación de calmodulina (CaM) y proteínas cinasas para activar factores proteicos mediante fosforilación. Entonces la NADPH-oxidasa se activa, y provee electrones a través de la oxidación del NADPH y por el sistema de transporte de electrones, reduce moléculas de O_2 y se genera $\text{O}_2\bullet^-$ (Figura 3).

CONCLUSIÓN

Los factores bióticos y abióticos ejercen un efecto negativo sobre las plantas, favoreciendo la acumulación de ERO para generar posteriormente el estrés oxidativo. Las múltiples respuestas bioquímicas generadas por el uso de oligoglucanos de diferentes hongos como elicitores de respuestas de defensa ante el estrés oxidativo marcan claramente un efecto elicitor del oligoglucano, que es reconocido de manera diferente en las plantas. La señalización que puede provocar el oligoglucano al ser reconocido por sus receptores específicos, permite la generación de señales secundarias que promueven en la planta una defensa más activa en contra de diversos agentes bióticos y/o abióticos mediante la acumulación de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas y la activación de genes relacionados con la defensa de la plantas, inclusive podría favorecerse el fortalecimiento del sistema antioxidante. Sin embargo, aun es escasa la investigación acerca de la interacción planta-oligoglucano, por lo que muchas preguntas continúan sin responderse.

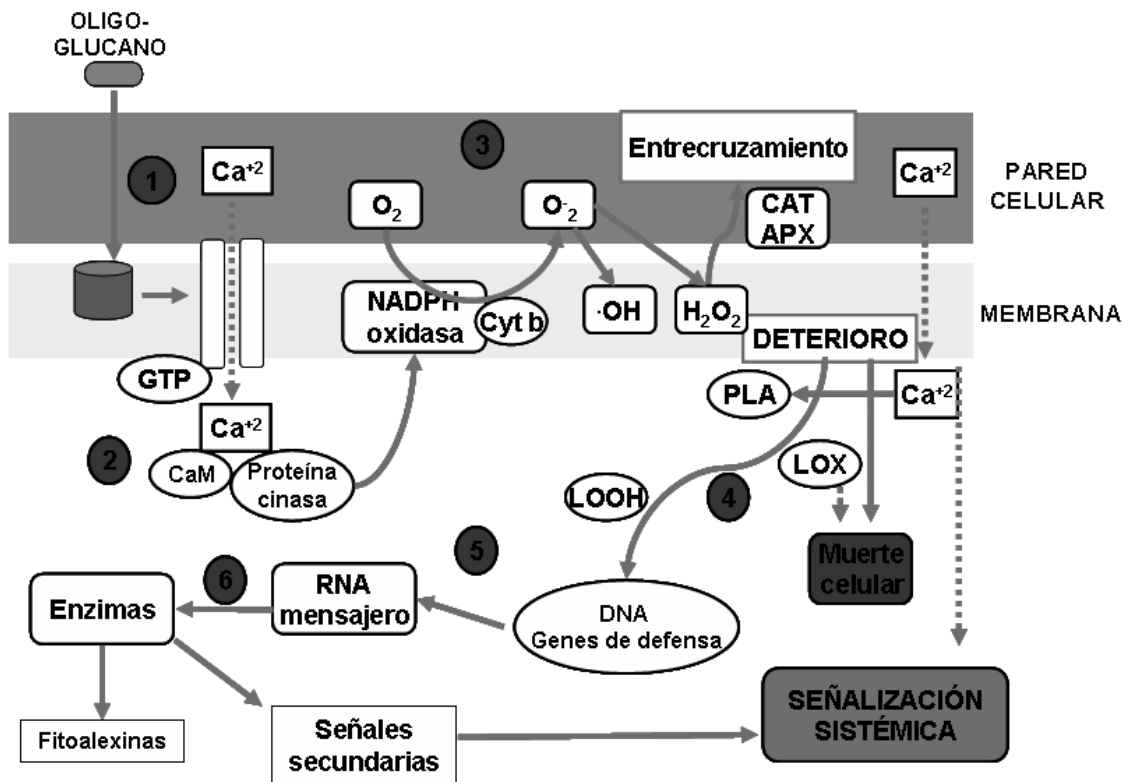


Figura 3. Mecanismo de acción del efecto elicitor de oligoglucanos en plantas (modificado de Doke *et al.*, 1996).

BIBLIOGRAFÍA

- Alscher R G, N Erturk, L S Heath (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental botany* 53:1331-1341.
- Apel K, H Hirt (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review in Plant Biology* 55:373-399.
- Asada K (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:601-639.
- Basse C W, A Fath, T Boller (1993) High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *The Journal of Biological Chemistry* 268:14724-14731.
- Baureithel K, G Félix, T Boller (1994) Specific high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 269:17931-17938.
- Bolwell G P, A Page, M Pislewska, P Wojtaszek (2001) Pathogenic infection and the oxidative defenses in plant apoplast. *Protoplasma* 217:20-32.
- Cheong J J, M G Hahn (1991) A specific, high affinity binding site for the hepta- β -glucoside elicitor exists in soybean membranes. *The Plant Cell* 3:137-147.
- Cosio E G, M Feger, C J Miller, L Antelo, J Ebel (1996) High-affinity binding of fungal β -glucan elicitors to cell membranes of species of the plant family Fabaceae. *Planta* 200:92-99.

- Cosio E G, T Frey, J Ebel (1992) Identification of a high-affinity binding protein for a hepta- β -glucoside phytoalexin elicitor in soybean. *European Journal of Biochemistry* 204:1115-1123.
- Cosio E G, T Frey, R Verduyn, J Van Boom, J Ebel (1990) High-affinity binding of a synthetic heptaglucoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Letters* 271:223-226.
- Coté F, M G Hahn (1994) Oligosaccharins: Structure and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26:1379-1411.
- De Leonardis S, N Dipierro, S Dipierro (2000) Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:773-779.
- Delattre C, P Michaud, J Lion, J Courtois (2005) Production of glucuronan oligosaccharides using a new glucuronan lyase activity from a *Trichoderma* sp. strain. *Journal of Biotechnology* 118:448-457.
- Delledonne M, A Marocco, C Lamb (2001) Signal interactions between NO and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:13454-13459.
- Doke N, Y Miura, L M Sanchez, H J Park, T Noritake, H Yoshioka, K Kawakita (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defense – a review. *Gene* 179:45-51.

- Ebel J, D Scheel (1997) Signals in host-parasite interactions. In: *The Mycota V Part A. Plant Relationships*. G C Carroll, T Tudzynski (eds). Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. pp. 85-105.
- Gadea J, V Conejero, P Vera (1999) Developmental regulation of a cytosolic ascorbate peroxidase gene from tomato plants. *Molecular Genomics and Genetics* 262:212-219.
- Girotti A W (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry & Photobiology* 63:103-113.
- Hammond-Kosack K, J D G Jones (2000) Responses to plant pathogens. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. B B Buchanan, W Gruissem, R L Jones (eds). American Society of Plant Physiologist. Rockville, MD. pp. 1102-1156.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology in fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Ishikawa T, K Sakai, T Takeda, S Shigeoka (1995) Cloning and expression of cDNA encoding a new type of ascorbate peroxidase from spinach. *FEBS Letters* 367:28-32.
- Ishikawa T, K Sakai, K Yoshimura, T Takeda, S Shigeoka (1996) cDNAs encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding regions. *FEBS Letters* 384:289-293.
- Ishikawa T, K Yoshimura, K Sakai, M Tamoi, T Takeda, S Shigeoka (1998) Molecular characterization and physiological role of a glyoxisome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant Cell Physiology* 30:23-34.

- Jespersen H, I Kjaersgard, L Ostergaard, K Welinder (1997) From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochemical Journal* 326:305-310.
- Kawakami S, Y Matsumoto, A Matsunaga, S Mayama, M Mizuno (2002) Molecular cloning of ascorbate peroxidase in potato tubers and its response during storage at low temperature. *Plant Science* 163:829-836.
- Klarzinsky O, B Plesse, J M Joubert, J C Yvin, M Kopp, B Kloareg, B Fritig (2000) Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* 124:1027-1037.
- Leon J, M Lawton, I Raskin (1995) Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 108:1673-1678.
- López F, G Vansuyt, F Case-Delbart, P Fourcroy (1996) Ascorbate peroxidase activity, not the mRNA level, is enhanced in salt stressed *Raphanus sativas* plants. *Physiological Plantarum* 97:13-20.
- Mittler R, B A Zilinskas (1992) Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 267:21802-21807.
- Mittler R, B A Zilinskas (1994) Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal* 5:397-405.

- Morita S, H Kaminaka, T Masumura, K Tanaka (1999) Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative signal. *Plant and Cell Physiology* 40:417-422.
- Nürnberg T, D Nennstiel, T Jabs, W R Sacks, K Hahlbrock, D Scheel (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78:449-460.
- Orozco-Cardenas M L, J Narvaez-Vasquez, C A Ryan (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell* 13:179-191.
- Orozco-Cardenas M L, C Ryan (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6553-6557.
- Orvar B, B Ellis (1995) Isolation of a cDNA encoding cytosolic ascorbate peroxidase in Tobacco. *Plant Physiology* 108:839-840.
- Park S Y, S H Ryu, I C Jang, S Y Kwon, J G Kim, S S Kwak (2004) Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweetpotato and its expression in response to stress. *Molecular Genetics and Genomics* 271:339-346
- Qadir S, M I Qureshi, S Javed, M Z Abdin (2004) Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica juncea* cultivars exposed to Cd-stress. *Plant Science* 167:1171-1181.
- Radman R, T Saez, C Bucke, T Keshavarz (2003) Elicitation of plant and microbial cell systems. *Biotechnology Applied Biochemistry* 37:91-102.

- Reddy A M, S G Kumar, G Jyothsnakumari, S Thimmanaik, C Sudhakar (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bangalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere* 60: 97-104.
- Reilly K, R Gomez-Vasquez, H Buschmann, J R Beeching (2004) Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* 56: 625-641.
- Sharp J K, B Valent, P Albersheim (1984) Purification and partial characterization of a β -Glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *The Journal of Biological Chemistry* 259:11312-11320.
- Shigeoka S, T Ishikawa, M Tamoi, Y Miyagawa, T Takeda, K Yoshimura (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53:1305-1319.
- Shinya T, R Ménard, I Kozone, H Matsuoka, N Shibuya, S Kauffmann, K Matsuoka, M Saito (2006) Novel β -1,3-, 1,6-oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco. *FEBS Journal* 273:2421-2431.
- Sudha G, G A Ravishankar (2002) Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71:181-212.
- Tang L, S Y Kwon, S H Kim, J S Kim, J S Choi, K Y Cho, C K Sung, S S Kwak, H S Lee (2006) Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Report* 25:1380-1386.

- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequences of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.
- Tsugane K, K Kobayashi, Y Niwa, Y Ohba, K Wada, H Kobayashi (1999) A recessive Arabidopsis mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11:1195-206.
- Waldmüller T, E G Cosio, H Grisebach, J Ebel (1992) Release of highly elicitor-active glucans by germinating zoospores of *Phytophthora megasperma glycinea*. *Planta* 188:498-505.
- Webb R, R Allen (1995) Isolation and characterization of a cDNA for spinach cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* 108:1325.
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322:681–692.
- Yamaguchi T, A Yamada, N Hong, T Ogawa, T Ishii, N Shibuya (2000) Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *The Plant Cell* 12:817-826.
- Yoshikawa M, N Yamaoka, Y Takeuchi (1993) Elicitors: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant Cell Physiology* 34:1163-1173.

2

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

Manuscrito enviado a la Revista Interciencia

RESUMEN

Las plantas son vulnerables al estrés por temperatura provocado por el cambio climático. Bajo estrés por calor, el sistema antioxidante enzimático en plantas presenta inconsistencias para protegerlas de la oxidación, desencadenando una serie de procesos oxidativos, mediados por especies reactivas de oxígeno, que afectan funciones metabólicas y fisiológicas. En climas cálidos, resulta indispensable promover la inducción del sistema antioxidante enzimático en plantas. En este trabajo, se evaluó el efecto de la aplicación exógena de oligoglucanos (OG) obtenidos por hidrólisis enzimática de paredes celulares de *Trichoderma harzianum*, en la actividad de superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) del sistema antioxidante de calabaza zucchini (*Cucurbita pepo* L.) sometidos a condiciones de estrés a 45 °C. Los OG se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y de intercambio aniónico. Una fracción purificada de OG de *T. harzianum* indujo incrementos significativos ($p \leq 0.05$) en la actividad de SOD, APX y CAT. Los OG de *T. harzianum* presentan potencialidad para reducir los efectos del estrés a 45 °C en cotiledones de calabaza zucchini incrementando la actividad del sistema antioxidante enzimático.

ABSTRACT

Plants are highly vulnerable to thermal stress due to the global warming. Under heat stress, the plant enzymatic antioxidant system is affected leading to the beginning of oxidative processes by reactive oxygen species that affect metabolic and physiological functions. In warm climates, it is necessary to induce the plant enzymatic antioxidant system. In this paper, we evaluated the effect of the exogenous application of oligoglucans

(OG) obtained by an enzymatic hydrolysis of *Trichoderma harzianum* cell-wall, on the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in heat-stressed (45 °C) zucchini squash cotyledons (*Cucurbita pepo* L.). Fungal oligoglucans were isolated sequentially using size-exclusion and anion-exchange chromatography. One of the oligoglucan isolated fraction induced the enhancing of SOD, APX and CAT enzymatic activities significantly ($p \leq 0.05$). *Trichoderma harzianum* oligoglucans exhibited the ability to increase the activity of the enzymatic antioxidant system in heat-stressed zucchini cotyledons.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático es un fenómeno a nivel mundial caracterizado por el incremento simultáneo de CO₂ y temperatura, que afectan considerablemente el metabolismo de las plantas, limitando su desarrollo y sobrevivencia (Rennenberg *et al.*, 2006). El estrés por calor en plantas, se define como el aumento de temperatura por encima de un nivel tolerable y durante un periodo de tiempo suficiente, para producir daños severos a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico (Wahid *et al.*, 2007; Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008). Las plantas cuentan con sistemas regulatorios para múltiples rutas bioquímicas y mecanismos defensivos que evitan, en lo posible, el daño celular por altas temperaturas (Apel y Hirt, 2004). A pesar de esto, bajo condiciones de estrés por calor, muchas enzimas clave de los procesos bioquímicos de producción de energía, respiración y síntesis de proteínas son afectadas negativamente (Suzuki y Mittler, 2006). En consecuencia, se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) como anión superóxido (O₂^{•-}), radical hidróxilo (HO•) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que en altas concentraciones resultan

perjudiciales para ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, comprometiendo la funcionalidad celular y por lo tanto la productividad de la planta (Mittler, 2006).

Las plantas controlan la acumulación de las ERO mediante la acción del sistema antioxidante, compuesto de la parte enzimática por superóxido dismutasa, (SOD, EC. 1.15.1.1), catalasa, (CAT, EC. 1.11.1.6) y ascorbato peroxidasa, (APX, EC. 1.11.1.11) y la parte no-enzimática por glutatión, ascorbato, tocoferol y compuestos fenólicos (Halliwell, 2006). Sin embargo, el estrés por calor puede afectar las enzimas que componen al sistema antioxidante de las plantas (Tang *et al.*, 2006), por lo que éstas, crecidas en zonas donde las temperaturas alcanzan los 40 °C o más, requieren del reforzamiento de éste sistema defensivo para contrarrestar el estrés oxidativo.

El impacto económico debido a altas temperaturas, manifestadas como estrés por calor y sequía, generaron daños en la agricultura de los Estados Unidos valorados en más de \$4.2 billones de dólares (Mittler, 2006). Lo que ha motivado diversas investigaciones enfocadas a potenciar el sistema antioxidante en plantas, ya sea mediante manipulación genética (Tang *et al.*, 2006; Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008) o acondicionamiento térmico (Kreslavski *et al.*, 2008). Sin embargo, existe poca información de trabajos sobre el fortalecimiento del sistema antioxidante a través de la inducción exógena utilizando inductores de origen fúngico. Estos últimos se han utilizado para fortalecer el sistemas defensivos contra diferentes tipos de estrés (Radwan *et al.*, 2006; Wahid *et al.*, 2007), destacando el empleo de oligoglucanos (OG) derivados de la pared fúngica para fortalecer sistemas relacionados con el metabolismo de los fenilpropanoides (Nita-Lazar *et al.*, 2004),

y de proteínas relacionadas con la patogénesis (Chivasa *et al.*, 2006; Shinya *et al.*, 2006).

Los OG han mostrado en diversas especies de plantas, la capacidad para inducir la expresión de genes codificantes para enzimas del metabolismo primario y secundario, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; EC. 1.2.1.12) (Tanaka *et al.*, 1982; Laxalt *et al.*, 1996), la fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC. 4.3.1.5) (Kombrink y Hahlbrock, 1986; Nita-Lazar *et al.*, 2004; Shinya *et al.*, 2006) y la enzima 4-coumarato-CoA ligasa (4CL; EC. 6.2.1.12) (Kombrink y Hahlbrock, 1986; Uhlmann y Ebel, 1993). Los OG obtenidos del alga verde *Ulva* spp, fueron capaces de incrementar los niveles de expresión de genes codificantes para SOD y APX en plantas de *Medicago truncatula* (Cluzet *et al.*, 2004). Por lo que, en este trabajo evaluamos la inducción del sistema antioxidante enzimático por efecto de los OG aislados de paredes celulares de *Trichoderma harzianum* determinando la actividad de SOD, APX y CAT en cotiledones de calabaza zucchini bajo estrés a 45 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se obtuvieron plántulas de calabaza zucchini (*Cucurbita pepo* L.) cv. “Raven” a partir de semillas certificadas (Asgrow®, México) crecidas durante 10 d en cámara de crecimiento de plantas a 25 °C, fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica y 80 % de humedad relativa (HR).

Establecimiento de la condición de estrés por calor

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

Marcadores biológicos de estrés térmico

Pérdida iónica relativa (PIR)

La estabilidad de las membranas celulares se determinó mediante los valores de PIR, siguiendo el método propuesto por Friedman y Rot (2006). Se colectaron plántulas de calabaza con diferentes tiempos de estrés (2, 6, 12, 24 y 48 h). Tres cotiledones (1 g) fueron cortados de las plántulas, lavados con H₂O destilada y colocados en tubo de vidrio con tapa de rosca (16 x 150 mm). A cada tubo se le adicionó D-manitol 0.3 M (20 mL) y se agitaron durante 2 h en un agitador de alícuotas Speci-Mix M26125 (Thermolyne, EU). Posteriormente, se midió la conductividad eléctrica inicial (V_i) en la solución, usando un conductímetro EC-METER 1481-61 (Cole-Palmer, EU). Inmediatamente, las muestras fueron sometidas a 121 °C durante 30 min y se dejaron enfriar hasta alcanzar los 25 °C para medir la conductividad eléctrica final (V_f). El nivel de PIR se calculó con la siguiente ecuación:

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

Producción de H₂O₂

Para determinar el efecto del estrés por calor (45 °C) en cotiledones de calabaza zucchini, se cuantificó el H₂O₂ acumulado siguiendo el método propuesto por Cervilla *et al.*, (2007). Tres cotiledones (1 g) se retiraron de las plántulas expuestas al estrés por calor durante 2, 6, 12, 24 y 48 h e inmediatamente, fueron triturados en mortero con 10 mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 6.8) frío, conteniendo 1 % de polivinil pirrolidona (PVP). La mezcla se homogenizó durante 30 s y se centrifugó a 7500 rpm (Sorval RC, EU) por 20 min a 25 °C. Al sobrenadante (1 mL) se le añadió 0.3 mL de solución de dióxido de titanio al 0.1 % en H₂SO₄ al 20 %. La mezcla resultante fue homogenizada vigorosamente durante 1 min y posteriormente centrifugada a 8100 rpm (Sorval RC, EU) durante 30 min a 25 °C. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 415 nm en un espectrofotómetro Bio-Spec1601 (Shimadzu, Japón). La concentración de H₂O₂ formado por efecto del estrés térmico se calculó usando una curva estándar de H₂O₂ (1-10 mM).

Recuperación del estrés en plántulas de calabaza

El material vegetal expuesto al estrés por calor durante 2, 6, 12, 24 y 48 h (tres plántulas por cada punto de análisis) permanecieron en una cámara de crecimiento de plantas a temperatura de aclimatación (25 °C) durante 3 d. Posteriormente, se determinó el valor de PIR y la producción de H₂O₂ a cada grupo de plántulas como se describió en la sección anterior. Al evaluar el grado de daño producido por el estrés a 45 °C, se estableció un nivel máximo de recuperación al estrés de 50 % de PIR (Inaba y Crandall, 1988) y 10 mmoles de H₂O₂ formado g⁻¹ PF (Levine *et al.*, 1994). Por lo que, las plántulas estresadas durante un determinado tiempo en donde superaban estos valores máximos de

recuperación, no fueron seleccionadas para los ensayos de inducción del sistema antioxidante, ya que sus células difícilmente se recuperarían del daño provocado.

Obtención e hidrólisis de pared celular de *T. harzianum*

A partir de micelio de *T. harzianum* crecido en caldo dextrosa-papa (Difco, Co.) a 27 °C por 20 d, se aisló la pared celular del hongo (ver Anexo 3) de acuerdo al método propuesto por Nita-Lazar *et al*, (2004). La pared recuperada fue secada a temperatura ambiente (25 °C), posteriormente, molida finamente usando un mortero estéril. El hidrolizado de pared celular (ver Anexo 5) se obtuvo siguiendo el método propuesto por Okinaka *et al.*, (1995) utilizando una mezcla de glucanasas y quitinasas (GlucanexTM, Sigma, México) a una concentración de 20 mg g⁻¹ de pared fúngica. La fracción soluble resultante fue denominada como mezcla de OG derivados enzimáticamente (ME).

Purificación de oligoglucanos activos

Los OG presentes en ME fueron fraccionados por cromatografía de exclusión por tamaño (CET), en un cromatógrafo de líquidos de baja presión (FPLC System, Pharmacia, Suecia). Se utilizó una columna (2.6 x 50 cm) empacada con matriz de poliacrilamida (Biogel P-6) con límite de exclusión de 6 kDa. La fase móvil consistió de H₂O destilada (250 mL) a un flujo de 1 mL min⁻¹ y se colectaron fracciones de 2.5 mL. A cada fracción obtenida, se le cuantificaron los carbohidratos totales (Bailey, 1958). Para facilitar la evaluación biológica, las fracciones colectadas se juntaron en tres fracciones con el siguiente orden de elución: antes del volumen de vacío (F1), dentro del volumen de

exclusión (F2) y después del volumen de exclusión (F3). La fracción de los OG que resultó activa, fue sub-fraccionada por cromatografía de intercambio aniónico (CIA) en el sistema FPLC (Pharmacia, Suecia) mediante un intercambiador aniónico fuerte (Q-sefarosa, columna de 2.5 x 45 cm). Las condiciones de elución fueron: gradiente lineal (0-0.3 M) de formato de amonio 0.3 M (pH 6.8) en NaCl 1 M durante 2 h, flujo de 2 mL min⁻¹ y se colectaron fracciones de 10 mL (ver Anexo 5). En cada sub-fracción colectada se cuantificaron los carbohidratos totales, expresados como equivalentes de hexosas (Bailey, 1958).

Las sub-fracciones obtenidas por CIA se agruparon en tres grupos, el primer grupo contiene las sub-fracciones que no interaccionaron con la matriz, el segundo y tercer grupo contienen las sub-fracciones con interacción media y fuerte, respectivamente. Para la selección de los OG activos, se estableció como criterio de selección que los diferentes OG promovieran los mayores incrementos de actividad en las enzimas del sistema antioxidante enzimático en cotiledones de calabaza zucchini bajo estrés a 45 °C.

Análisis de carbohidratos en los oligoglucanos activos

Se determinaron los carbohidratos presentes en la fracción de OG que mostró el mayor efecto inductor de actividad enzimática del sistema antioxidante de cotiledones de calabaza. Para obtener los azúcares neutros, los OG activos fueron sometidos a hidrólisis ácida con HCl 1 M a 121 °C durante 2.5 h. Los monosacáridos resultantes fueron analizados cuantitativamente por cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia acoplada a un detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) en un Sistema DIONEX

DX-500 (Sunnyvale, California, EU) equipado con una columna Carbo-Pac PA-1 (4 x 250 mm). Se utilizó H₂O grado HPLC como eluyente a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹ en modo isocrático y NaOH 30 mM como eluyente post-columna. Los tiempos de elución y concentraciones de cada monosacárido se compararon contra estándares puros (Sigma, México).

Aplicación de tratamientos en plantas

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

Evaluación enzimática de SOD

La actividad SOD se determinó de acuerdo a lo propuesto por Wu *et al.*, (2008) basándose en la capacidad que presenta esta enzima para inhibir la reducción química del azul de nitro-tetrazolio (NBT) inducida por luz. Tres cotiledones de calabaza (1 g), fueron homogenizados en un mortero junto con 2 mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.5), que contenía EDTA 1 mM y 5 % de PVP. El homogenizado fue centrifugado a 9100 rpm (Sorval RC, EU) por 15 min a 4 °C. El sobrenadante recuperado, denominado como

extracto proteico, se usó para determinar la actividad SOD. La mezcla de ensayo (1 mL) contenía buffer de fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.8), L-metionina 0.01 M, 0.025 % de Tritón X-100, EDTA 0.11 mM, NBT 57 μ M y 50 μ g de extracto proteico. La reacción de reducción del NBT inicio simultáneamente, al adicionar riboflavina 1.3 μ M y al exponer los tubos de ensayo que contenían la mezcla bajo un haz de luz blanca (lámparas de 30 W) durante 10 min. La actividad de la enzima se determinó a 560 nm en espectrofotómetro (Bio-Spec 1601, Shimadzu, Japón). Una unidad de actividad SOD fue definida como la cantidad de enzima que inhibe en 50 % la reducción química del NBT inducida por luz.

Evaluación enzimática de APX

La actividad de APX fue determinada evaluando los cambios de absorbancia a 290 nm durante 3 min a 25 °C, de acuerdo al método propuesto por Nakano y Asada (1987). A partir de cotiledones de calabaza (1g), se homogenizaron en un mortero junto con 10 mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.8), que contenía ácido L-ascórbico 5 mM, EDTA 1 mM y 1 % de polivinil polipirrolidona (PVPP). El homogenizado fue centrifugado a 11150 rpm (Sorval RC, EU) durante 20 min a 4 °C y el sobrenadante recuperado se usó para evaluar la actividad APX. La mezcla de ensayo (0.5 mL) contenía buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0), ácido L-ascórbico 5 mM, H₂O₂ 0.1 M y 50 μ L del extracto proteico. La actividad APX fue calculada en base al coeficiente de extinción molar del ascorbato ($\epsilon=2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y reportada como milimoles de ascorbato oxidado $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Evaluación enzimática de CAT

La actividad CAT fue evaluada siguiendo la cinética de consumo del H₂O₂ a 240 nm durante 3 min a 30 °C, de acuerdo al método establecido por Aebi (1984). Cotiledones de calabaza (1 g) fueron homogenizados en un mortero junto con 10 mL de buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.8), que contenía 0.5 % de Tritón X-100, EDTA 0.5 mM y 1 % de PVPP. El homogenizado fue centrifugado a 11150 rpm (Sorval RC, EU) durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante recuperado fue usado para evaluar la actividad de CAT. La mezcla de ensayo (0.5 mL) contenía buffer de fosfatos 50 mM (pH 7.0), H₂O₂ 50 mM y 25 µL del extracto proteico. La actividad CAT fue calculada en base al coeficiente de extinción molar del H₂O₂ ($\epsilon=28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y reportada como milimoles de H₂O₂ reducido $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Determinación del contenido de proteína soluble

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

Análisis estadísticos

Los cambios en la actividad SOD, APX y CAT, así como en el contenido de carbohidratos de los OG activos, se determinaron por triplicado. Los datos obtenidos se analizaron mediante un ANOVA de una vía en el programa estadístico NCSS. En caso de encontrar diferencias significativas, se aplicó una prueba de diferencias de medias por el

método de Duncan ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del estrés térmico en plántulas de calabaza

En este trabajo se indujo el estrés por calor en plántulas de calabaza zucchini, manteniéndolas a 45 °C durante 2, 6, 12, 24 y 48 h. Las plántulas estresadas mostraron un incremento en la pérdida iónica relativa (PIR) de un valor basal cercano a 25 %, que permaneció constante en un periodo de 0-12 h, mientras que las plántulas estresadas por 24 y 48 h presentaron valores de PIR de 47 y 73 %, respectivamente (Figura 4A). Las plántulas en las que la exposición a 45 °C fue menor de 12 h, lograron tener una recuperación del estrés de acuerdo al criterio establecido por Inaba y Crandall (1988), quienes establecen como tolerancia máxima al estrés, valores de PIR menores de 50 %. Las plántulas con mayor tiempo de exposición al calor, presentaron valores de PIR superiores al 50 %, no logrando recuperarse después del estrés aplicado (Figura 4A), lo que significa que la exposición a 45 °C ocasionó daños celulares irreversibles, ya que las altas temperaturas afectan la integridad de las membranas plasmáticas, incrementando la fluidez y promoviendo su desintegración (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Este daño favorece la pérdida de K^+ y Ca^{2+} , afecta las proteínas de membrana e inactiva receptores, enzimas y canales iónicos (Halliwell, 2006).

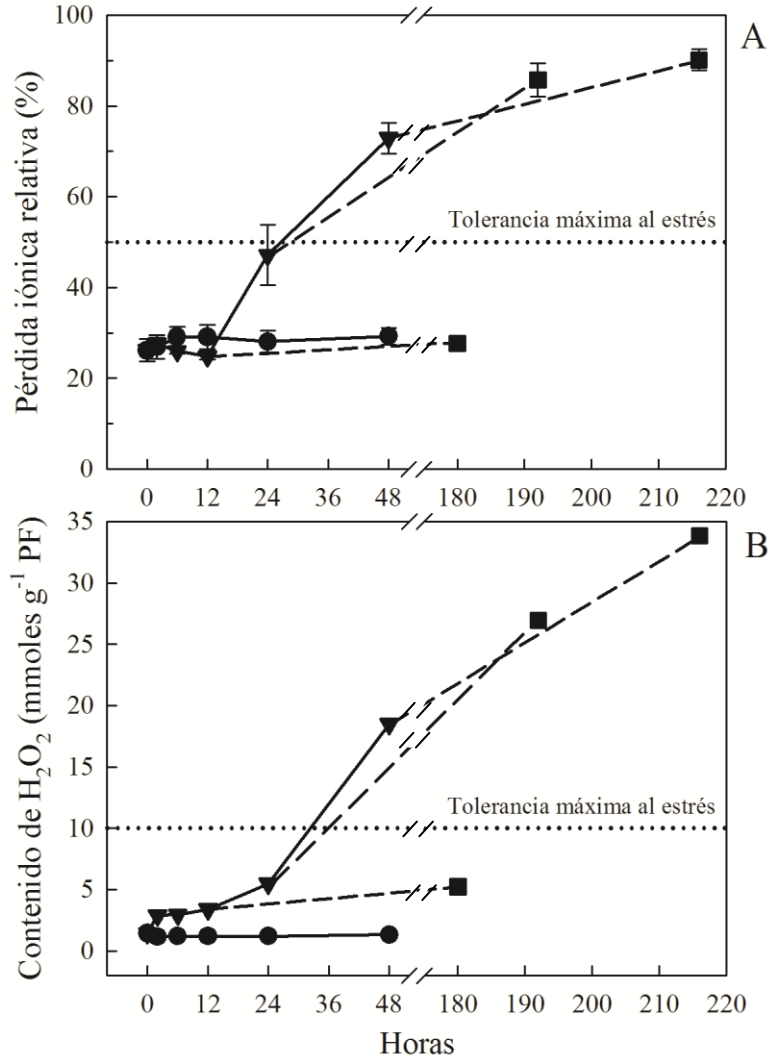


Figura 4. Pérdida iónica relativa (A) y contenido de H₂O₂ (B) en plántulas de calabaza zucchini bajo estrés a 45 °C: ●, control a 25 °C; ▼, plántulas con estrés a 45 °C; ■, plántulas recuperadas del estrés durante 3 días a 25 °C.

La formación de peróxido de hidrógeno en las plántulas estresadas, se incrementó en relación al tiempo de exposición al calor (Figura 4B), presentando valores desde 1.4-3.4 mmoles g^{-1} peso fresco (PF), durante el inicio de la evaluación y hasta 12 h de exposición al calor; a las 24 h, se presentaron 5.5 mmoles g^{-1} PF y a las 48 h el H_2O_2 alcanzó niveles de 18.5 mmoles g^{-1} PF, superando el límite de tolerancia máxima al estrés de 10 mmoles g^{-1} H_2O_2 PF establecido por Levine *et al.*, (1994). La recuperación del estrés por calor, solo fue posible en plántulas con tiempos de exposición menor de 12 h, ya que al ser transferidas a temperatura de 25 °C, mostraron valores de 5.24 mmoles g^{-1} H_2O_2 PF, mientras que a 24 y 48 h, los niveles de H_2O_2 formado después de la transferencia, fueron de 27 y 34 mmoles g^{-1} PF, respectivamente (Figura 4B). Incrementos similares de H_2O_2 fueron reportados en plantas de papa bajo estrés a 42 °C durante 10 h (Tang *et al.*, 2006) y en plántulas de mostaza y tabaco con estrés de 40 °C durante 4 h (Dat *et al.*, 2000), lo que puede significar que la exposición de plantas a temperaturas por arriba de 42 °C, puede ocasionar daños irreversibles en las membranas, por lo que la exposición de plantas a temperatura de 45 °C (ver Anexo 1) requieren del reforzamiento del sistema antioxidante enzimático para la protección de las membranas plasmáticas (Apel y Hirt, 2004).

La evaluación del sistema antioxidante enzimático de las plántulas de calabaza zucchini a las condiciones de estrés por calor durante 12 h, mostró que la actividad enzimática de SOD se incrementó ligeramente (Figura 5A), siendo este incremento no

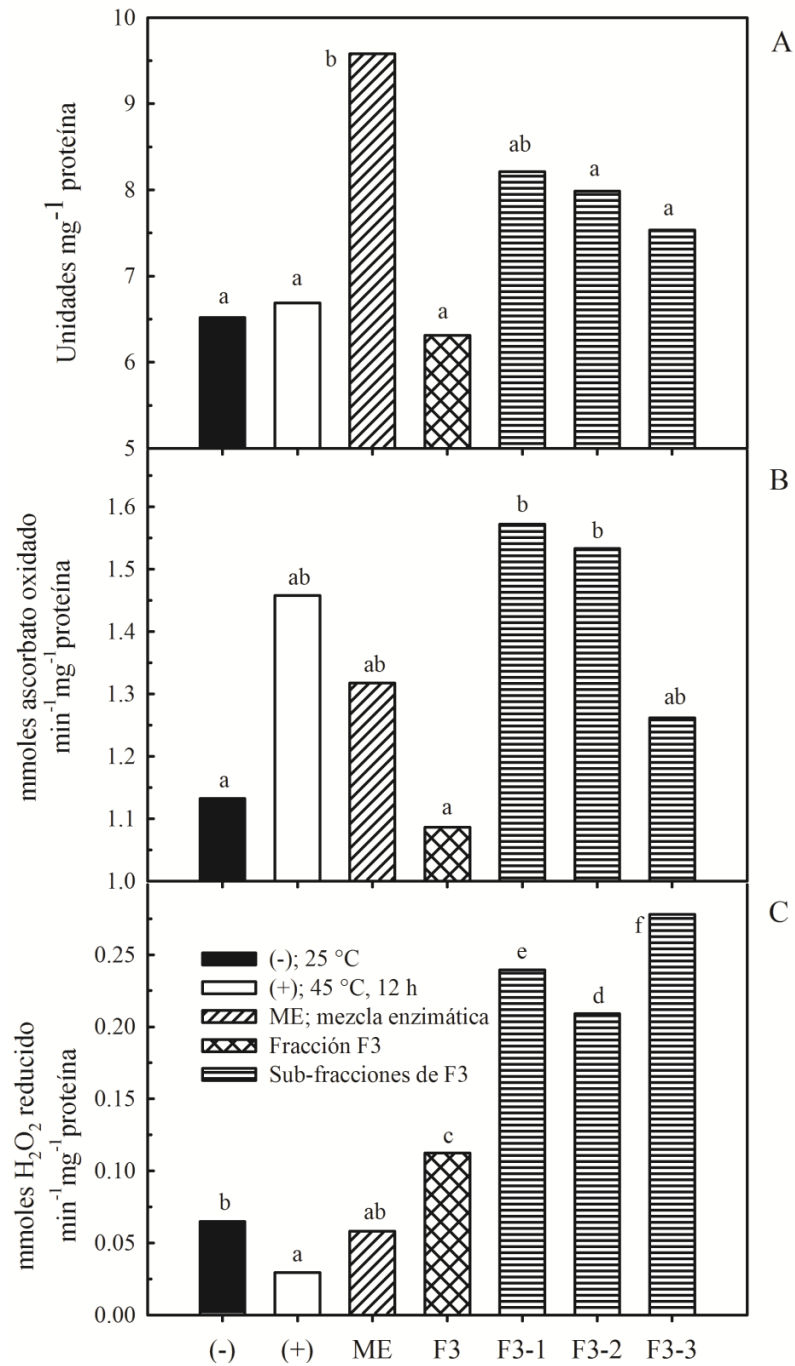


Figura 5. Efecto de los oligoglucanos de *T. harzianum* sobre el sistema antioxidante enzimático en cotiledones de calabaza zucchini con estrés por calor (45 °C, 12 h). Actividad enzimática de SOD (A), APX (B) y CAT (C). Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

significativo ($p \leq 0.05$). Este ligero incremento, concuerda con la acumulación de H_2O_2 que presentaron los cotiledones de calabaza zucchini estresados, la cual no superó el límite de tolerancia, cuando las plántulas se expusieron durante 12 h al estrés por calor (Figura 4B). En consecuencia, se pudo haber presentado un pequeño incremento en los niveles de $O_2^{\bullet-}$, que es el sustrato de la enzima SOD. Debido a lo anterior, la actividad SOD en los cotiledones de calabaza estresados por calor, no fue mucho mayor que la condición control (Figura 5A). En concordancia con estos resultados, Sato *et al.*, (2001) reportaron que plántulas de arroz sometidas a estrés (42 °C durante 24 h) no presentaron incrementos significativos en la actividad SOD, aun cuando se considera que la primera línea de defensa en células vegetales ante condiciones de estrés es comandada por la actividad SOD (Alscher *et al.*, 2002). Sin embargo, una completa protección celular, no depende únicamente de la actividad SOD, sino del incremento en conjunto del resto de enzimas del sistema antioxidante (Apel y Hirt, 2004), en donde la acción catalítica de APX y CAT es indispensable para la rápida eliminación del exceso de H_2O_2 que se genera por efecto del estrés por calor (Dat *et al.*, 2000).

En nuestro modelo vegetal, la cuantificación de APX y CAT en los cotiledones estresados a 45 °C durante 12 h, mostraron un incremento del 28 % en la actividad de APX (Figura 5B) y un decremento del 54 % en la actividad de CAT (Figura 5C), respecto al control (25 °C). Apel y Hirt (2004) reportan que cuando ocurre un desbalance en la actividad de las enzimas detoxificantes de las ERO, debido a una condición estresante, diversas especies de plantas inducen mecanismos compensatorios en el sistema antioxidante (aumento de actividad APX y disminución de la actividad CAT, o viceversa),

tal como ocurrió en este trabajo (Figura 5). Se ha reportado que la actividad CAT en diversas especies de plantas presenta sensibilidad diferencial al estrés por temperaturas extremas (Hertwig *et al.*, 1992). A pesar de esta situación, en plántulas de calabaza, los cotiledones estresados mostraron un incremento en la actividad APX que compensa la reducción en la actividad CAT. Este mismo efecto coincide con lo reportado por Sato *et al.*, (2001) en plántulas de arroz estresadas a 42 °C durante 24 h.

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

Aislamiento y caracterización de los oligoglucanos activos

La fracción soluble (ME) resultante del proceso de hidrólisis enzimática de la pared celular de *T. harzianum*, incrementó la actividad de las enzimas SOD y APX y no afectó la actividad CAT en los cotiledones de calabaza zucchini, sometidos a estrés a 45 °C durante 12 h (Figura 5), por lo que se inició un aislamiento biondirigido de los OG activos. El primer fraccionamiento de la ME se realizó por CET, obteniéndose 95 fracciones; de estas fracciones se formaron tres grupos que representaban los componentes de pared celular con masa molecular mayor (F1), igual (F2) y menor (F3) a 6 kDa, respectivamente (Figura 6A). El grupo de fracciones que integraron F3, incrementó únicamente la actividad de CAT en un 280 % (Figura 5C), mientras que el efecto sobre la actividad SOD y APX no fue significativo ($p \leq 0.05$). Aún con este resultado, se procedió a sub-fraccionar F3 por CIA, de

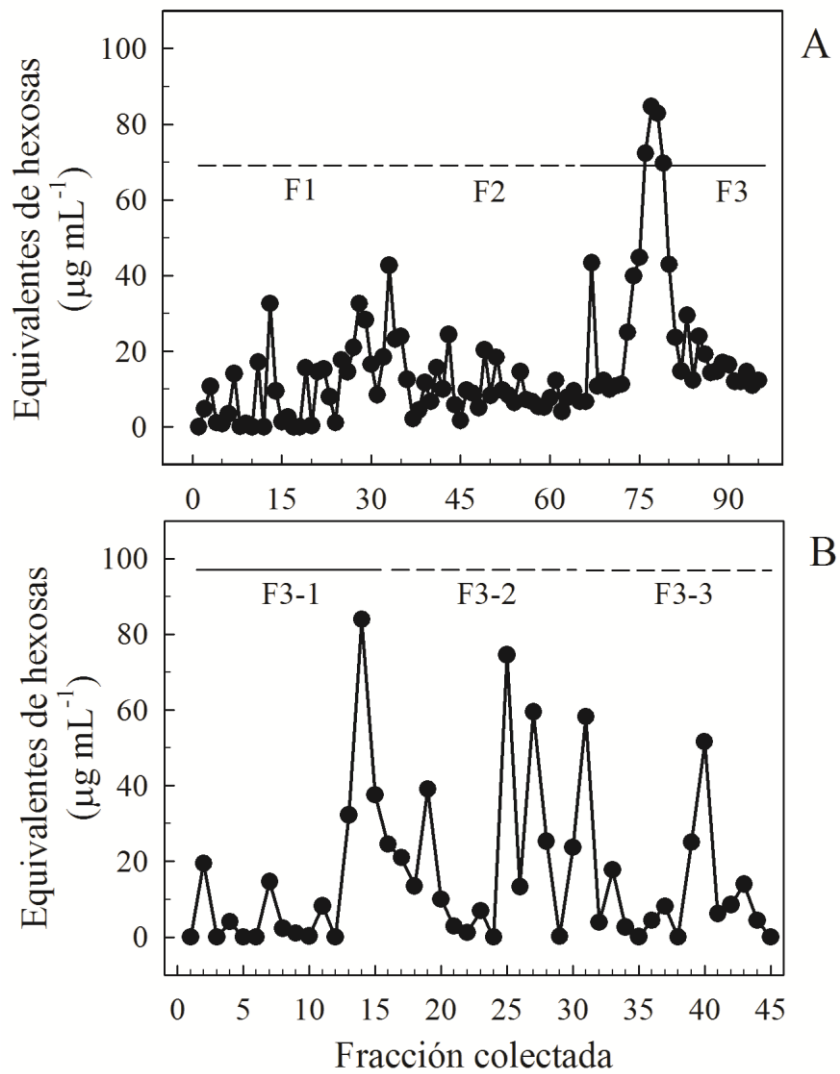


Figura 6. Purificación de los oligoglucanos activos derivados de la pared celular de *T. harzianum*. Fraccionamiento por cromatografía de exclusión por tamaño (A) y sub-fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico (B). —, fracción analizada; ---, fracción descartada.

la cual se obtuvieron 45 sub-fracciones que fueron agrupadas en base a su orden de elución (Figura 6B), en tres grupos (F3-1, F3-2 y F3-3). De estos grupos de sub-fracciones, F3-1 (Figura 6B) mostró tener la mayor capacidad para promover incrementos de actividad en el sistema antioxidante enzimático en nuestro modelo de estudio (Figura 5).

La caracterización y cuantificación de los carbohidratos presentes en los OG activos se realizó por HPAEC-PAD, este análisis mostró para la sub-fracción F3-1 una composición de 5 monosacáridos, que en orden cuantitativo fueron: glucosa, arabinosa, xilosa, galactosa y manosa (Tabla 1). La predominancia cuantitativa de glucosa en los OG de *T. harzianum*, es coincidente con lo cuantificado en OG derivados de paredes celulares de *Phytophthora megasperma* var. *sojae* (Ayers *et al.*, 1976), *Pyricularia oryzae* (Yamaguchi *et al.*, 2000) y *Alternaria alternata* (Shinya *et al.*, 2006), donde la glucosa es el monosacárido más abundante.

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

Tabla 1. Carbohidratos identificados en oligoglucanos activos de *T. harzianum*

Monosacárido [†]	Tiempo de retención [†] (min)	Sub-fracción CIA (%)
		F3-1
Arabinosa	14.58	17.78 ^c
Galactosa	18.54	13.99 ^b
Glucosa	22.19	49.26 ^d
Xilosa	26.80	17.57 ^c
Manosa	31.16	3.40 ^a

Medias con distinta letra son estadísticamente diferentes (Duncan, $p \leq 0.05$).

[†] La identidad y tiempo de retención fue determinado por HPAEC-PAD.

Actividad biológica de oligoglucanos en el sistema antioxidante enzimático

En los cotiledones de calabaza zucchini se observó un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en el incremento de la actividad de SOD por el tratamiento de inducción con ME, incrementando la actividad de SOD en 43 %, mientras que solo las sub-fracciones de los OG obtenidas por CIA incrementaron ésta respuesta entre un 13 y 23 % (Figura 5A). Lo anterior nos indica que el efecto inductor en la actividad SOD debido a los OG es mayor cuando éstos inductores son aplicados en una mezcla compleja que contenga OG de diversas características estructurales, que aplicando mezclas con OG de un peso molecular o carga eléctrica definida (Figura 6).

El aumento transitorio de la actividad SOD debida al efecto inductor de los diferentes OG evaluados proporciona a los cotiledones de calabaza estresados una protección parcial en contra de las ERO como el anión superóxido que deteriora las membranas plasmáticas (Allakhverdiev *et al.*, 2008).

En el modelo de estudio evaluado, la mezcla de los OG no presentó un incremento en la actividad APX, ya que la condición de estrés aplicada, por sí misma incrementa esta actividad enzimática e incluso, se aprecia un decremento de actividad APX al tratar los cotiledones estresados con los OG de la fracción F3 (Figura 5B). Este efecto mínimo en el incremento de la actividad APX es similar a lo reportado en plantas de pepino (Song *et al.*, 2005) y papa (Park *et al.*, 2004), así como en plántulas de arroz (Sato *et al.*, 2001) que fueron expuestas a condiciones similares de estrés por calor (42 °C durante 24 h y 40 °C durante 4 h, respectivamente). Así mismo, se observó que los OG de *T. harzianum*

purificados por CIA afectaron ligeramente la actividad APX, incrementándola en un rango de 5 a 8 %, respecto al valor de actividad APX detectado en los cotiledones de plántulas bajo estrés a 45 °C (Figura 5B).

A pesar de que APX y CAT presentan afinidad para degradar el H₂O₂, ambas enzimas se localizan en organelos celulares diferentes, además APX requiere del poder reductor del ascorbato (Dat *et al.*, 2000), por lo cual puede estar limitada su acción detoxificante bajo las condiciones de estrés evaluado. Se ha reportado la reducción en los niveles de ascorbato en diversas especies vegetales debida a condiciones de estrés por calor (Nishikawa *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2008), esto se podría relacionar con el efecto mínimo en el incremento de la actividad APX en cotiledones de calabaza zucchini encontrado en este trabajo (Figura 5B).

Respecto a las respuestas producidas en la actividad CAT por los OG en plántulas estresadas, se apreció un incremento gradual en la inducción de la actividad CAT, en donde la reducción de ésta actividad enzimática debida al estrés por calor fue restablecida por efecto de los OG (Figura 5C). La aplicación de los OG en forma de ME y una fracción purificada, incrementaron la actividad CAT en 96 y 280 %, respectivamente. Mientras que los mayores incrementos en la actividad CAT fueron para las sub-fracciones F3-2, F3-1 y F3-3 con incrementos de 845, 710 y 420 %, respectivamente, en comparación al control bajo estrés por calor (Figura 5C). Estos incrementos en la actividad de CAT compensan la actividad de APX en cotiledones de calabaza zucchini que resultó afectada mínimamente por los OG evaluados en este trabajo.

Comparando la función de la enzima APX en la eliminación de H₂O₂, CAT no requiere de poder reductor para su funcionamiento (Dat *et al.*, 2000). Además esta enzima posee una elevada velocidad de reacción, que le permite eliminar grandes cantidades de H₂O₂, a pesar de la baja afinidad por el peróxido (Willekens *et al.*, 1997). La velocidad de reacción de una enzima, se vuelve esencial cuando una planta se encuentra sometida a condiciones ambientales donde la sobreproducción de las ERO ocurre rápidamente, tal como se presentó en las plántulas de calabaza zucchini evaluadas en este trabajo y en general, en diversos cultivos que sufren los efectos directos del cambio climático. El incremento inducido por los OG en SOD, APX y CAT (Figura 5), en las plántulas con estrés por calor, muestra la especificidad de los OG como moléculas de señalización, particularmente estimulando incrementos en la actividad enzimática de CAT del sistema antioxidante de *Cucurbita pepo* L. Debido a las características estructurales que puede presentar este grupo de sub-fracciones, por lo que consideramos que ocurrió el reconocimiento de éstos inductores por parte de sus receptores específicos y en consecuencia un mayor incremento de la actividad enzimática del sistema antioxidante en el modelo de estudio analizado.

CONCLUSIONES

La aplicación exógena de una sub-fracción de oligoglucanos (F3-1) derivados enzimáticamente de la pared celular de *Trichoderma harzianum* incrementa en más de 700 % el nivel de actividad enzimática de catalasa en cotiledones de calabaza zucchini bajo estrés por calor a 45 °C durante 12 h. La elevada inducción de la actividad catalasa

compensa el efecto transitorio conseguido por las sub-fracciones de oligoglucanos en la actividad ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa. Esto permite un reforzamiento del sistema antioxidante enzimático en cotiledones de calabaza bajo condiciones de estrés por altas temperaturas, permitiendo con esto una mejor respuesta de la planta ante situaciones ambientales adversas generada por el incesante cambio climático.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Alscher RG, Erturk, N, Heath, LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, Mohanty P (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research* 98: 541-550.
- Ayers AJ, Valent B, Ebel J, Albersheim P (1976) Host-pathogen interactions. XI. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. *Plant Physiology* 57: 766-774.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Bailey RW (1958) The reaction of pentoses with anthone. *Biochemical Journal* 68: 669-672.
- Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Sharma KK (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports* 27(3): 411-424.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cervilla L, Blasco B, Ríos J, Romero L, Ruiz J (2007) Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. *Annals of Botany* 100(4): 747-756.
- Chivasa S, Hamilton JM, Pringle RS, Ndimba BK, Simon WJ, Lindsey K, Slabas AR (2006) Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures. *Journal of Experimental Botany* 57(7): 1553-1562.
- Cluzet S, Torregrosa C, Jacquet C, Lafitte C, Fournier J, Mercier L, Salamagne S, Briand X, Esquerre-Tugaye M, Dumas B (2004) Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant Cell and Environment* 27: 917-928.
- Dat J, Vandenaabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57(5): 779-795.
- Fliegmann J, Montel E, Djulic A, Cottaz S, Driguez H, Ebel MG (2005) Catalytic properties of the bifunctional soybean beta-glucan-binding protein, a member of family 81 glycoside hydrolases. *FEBS Letters* 579: 6647-6652.
- Friedman H, Rot I (2006) Characterization of chilling injury in *Heliotropium arborescens* and *Lantana camara* cuttings. *Postharvest Biology and Technology* 40(3): 244-249.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology in fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.

- Hertwig B, Streb P, Feierabend J (1992) Light dependence of CAT synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology* 100: 1547-1553.
- Inaba M, Crandall PG (1988) Electrolyte leakage as an indicator of high-temperature injury to harvested mature green tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113: 96-99.
- Kombrink E, Hahlbrock K (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi: timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. *Plant Physiology* 81: 216-221.
- Kreslavski V, Tatarinzev N, Shabnova N, Semenova G, Kosobryukhov A (2008) Characterization of the nature of photosynthetic recovery of wheat seedlings from short-term dark heat exposures and analysis of the mode of acclimation to different light intensities. *Journal of Plant Physiology* 165: 1592-1600.
- Latgé JP (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* 66(2): 279-290.
- Laxalt AM, Cassia RO, Sanllorenti PM, Madrid EA, Andreu BD, Daleo GR, Conde RD, Lamattina L (1996) Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Molecular Biology* 30: 961-972.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11: 15-19.

- Nakano Y, Asada K (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell & Physiology* 28(1): 131-140.
- Nishikawa F, Kato M, Hyodo H, Ikoma Y, Sugiura M, Yano M (2003) Ascorbate metabolism in harvested broccoli. *Journal of Experimental Botany* 54: 2439-2448.
- Nita-Lazar M, Heyraud A, Gey C, Braccini I, Lienart Y (2004) Novel oligosaccharides isolated from *Fusarium oxysporum* L. rapidly induce PAL activity in *Rubus* cells. *Acta Biochimica Polonica* 51(3): 625-634.
- Okinaka Y, Mimori K, Takeo K, Kitamura S, Takeuchi Y, Yamaoka N, Yoshikawa MA (1995) A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. *Plant Physiology* 109: 839-845.
- Park SY, Ryu SH, Jang IC, Kwon SY, Kim JG, Kwak SS (2004) Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweet potato and its expression in response to stress. *Molecular Genetics and Genomics* 271: 339-346.
- Radwan DEM, Fayez KA, Mahmoud SY, Hamad A, Lu G (2006) Salicylic acid alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by zucchini yellow mosaic virus infection in *Cucurbita pepo* leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69:172-181.
- Rennenberg H, Loreto F, Polle A, Brilli F, Fares S, Beniwal RS, Gessler A (2006) Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biology* 8: 556-571.
- Ruiz-Herrera J, Sentandreu R (1989) Fungal cell wall synthesis and assembly. *Current Topics in Medical Mycology* 3:168-217.

- Sato Y, Murakami T, Funatsuki H, Matsuba S, Saruyama H, Tanida M (2001) Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *Journal of Experimental Botany* 52(354): 145-151.
- Shao HB, Chu LY, Lu ZH, Kang CM (2008) Primary oxidant scavenging and redox signaling in higher plants. *International Journal of Biological Sciences* 4: 8-14.
- Shinya T, Menard R, Kozone I, Matsuoka H, Shibuya N, Kauffmann S, Matsuoka K, Saito M (2006) Novel β -1,3-, 1,6-oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco. *FEBS Journal* 273(11): 2421-2431.
- Song XS, Hu WH, Mao WH, Ogwenjo JO, Zhou YH, Yu JQ (2005) Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 1082-1088.
- Suzuki N, Mittler R (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126: 45-51.
- Tanaka K, Otsubo T, Kondo N (1982) Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin-cycle SH enzymes in SO₂-fumigated spinach leaves. *Plant and Cell Physiology* 23(6): 1009-1018.
- Tang L, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Choi JS, Cho KY, Sung CK, Kwak SS, Lee HS (2006) Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Reports* 25: 1380-1386.
- Uhlmann A, Ebel J (1993). Molecular cloning and expression of 4-coumarate: coenzyme A ligase, an enzyme involved in the resistance response of soybean (*Glycine max* L.) against pathogen attack. *Plant Physiology* 102(4):1147-1156.

- Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007) Heat tolerance in plants: An overview. *Environment and Experimental Botany* 61: 199-223.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal* 16: 4806-4816.
- Wu T, Cao J, Zhang Y (2008) Comparison of antioxidant activities and endogenous hormone levels between bush and vine-type tropical pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchense). *Scientia Horticulturae* 116: 27-33.
- Yamaguchi T, Yamada A, Hong N, Ogawa T, Ishii T, Shibuya N (2000) Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β -Glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *The Plant Cell* 12(5): 817-826.

**OLIGOGLUCANS AS ELICITORS OF AN ENZYMATIC
ANTIOXIDANT SYSTEM IN ZUCCHINI SQUASH (*Cucurbita pepo* L.)
SEEDLINGS AT LOW TEMPERATURE**

Manuscrito publicado en American Journal of Agricultural and Biological Sciences

6(1):52-61, 2011

ABSTRACT

Non-controlled low temperatures affect physiological and biochemical processes leading to Reactive Oxygen Species (ROS) accumulation in plants, which normally are stabilized by the antioxidant system. Superoxide Dismutase (SOD), Ascorbate Peroxidase (APX) and Catalase (CAT) are the most important ROS-detoxification enzymes in stressed plants. The activity of these enzymes were examined in response to fungal Oligoglucans (OG) in cold-stressed cotyledons of *Cucurbita pepo* L. Cold stress condition was settled in zucchini cotyledons using relative Ion Leakage (IL) and H₂O₂ accumulation. Then, OG were obtained from *Trichoderma harzianum* cell-wall by enzymatic and chemical hydrolysis. These elicitors were purified by size-exclusion and anion-exchange chromatography and tested in cold-stressed cotyledons. No significant changes on H₂O₂ content and IL were observed between treated and control cold-stressed cotyledons, during the first 7 days of storage at 5°C. Afterwards H₂O₂ values increased greatly after cold-stressed. Then, cold stress conditions were established (7 d, 5°C). The APX and CAT activities remained stable, but not SOD activity, which decreased about 42% in control cotyledons. When a chemical OG mixture (CM) was applied to cold-stressed cotyledons, APX and CAT activity levels increased. The SOD activity was only increased by an enzymatic OG mixture (EM). The APX activity level was increased in cold-stressed cotyledons using OG size-exclusion chromatography fractions from both CM and EM; however, changes in CAT activity were only possible using EM fractions and no changes were detected in SOD activity. The highest CAT activity levels were triggered using OG anion-exchange chromatography sub-fractions from both CM and EM fractions (120 and 119 % of enzymatic activity, respectively). The oxidative stress can be counteracted by the

triggering of APX and CAT activity in cold-stressed zucchini cotyledons mediated by *T. harzianum* cell-wall OG.

RESUMEN

Las bajas temperaturas afectan los procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas permitiendo con esto la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales son estabilizadas por el sistema antioxidante. Las principales enzimas detoxificantes de las ERO, son la enzima Superóxido dismutasa (SOD), Ascorbato peróxidasa (APX) y Catalasa (CAT). El efecto de los oligoglucanos fúngicos (OG) fue evaluado en la actividad antioxidante de estas enzimas en cotiledones de calabaza zucchini (*Cucurbita pepo* L.) estresados a baja temperatura. Las condiciones de estrés por frío se establecieron en cotiledones de calabaza por la medición de la pérdida iónica relativa (PIR) y la acumulación de H₂O₂. Los OG fueron obtenidos por hidrólisis química y enzimática de la pared celular de *Trichoderma harzianum*. Estos inductores fueron purificados por cromatografía de exclusión por tamaño y de intercambio aniónico, y aplicados en cotiledones de calabaza estresados. Durante los primeros 7 d de almacenamiento a 5 °C, no se observaron cambios significativos en el contenido de H₂O₂ y de PIR entre los cotiledones estresados y los no estresados. Tiempos de estrés por frío posteriores a 7 d incrementaron el H₂O₂ en los cotiledones. La actividad de APX y CAT permanecieron estables, no así la actividad SOD, la cual disminuyó cerca del 42 % respecto al control. Cuando la mezcla química de OG (CM) fue aplicada a los cotiledones estresados, se incrementó la actividad de APX y CAT. Mientras que solo la actividad SOD fue incrementada por la mezcla enzimática de OG (EM). Aplicando las fracciones químicas y

enzimáticas de OG obtenidas por cromatografía de exclusión por tamaño se incremento el nivel de actividad APX en los cotiledones estresados. Sin embargo, cambios en la actividad CAT solo fueron posibles aplicando las fracciones EM, mientras que no se observo ningún cambio en la actividad SOD. Los más altos niveles de inducción de la actividad CAT fueron generados por la aplicación de las sub-fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico de las fracciones CM y EM de OG (120 y 119 % de incremento, respectivamente). El estrés oxidativo puede ser contrarrestado por la inducción de la actividad APX y CAT, medida por oligoglucanos de la pared celular de *T. harzianum* en cotiledones de calabaza zucchini estresados por frío.

INTRODUCTION

Plant development is challenged by many environmentally and physiologically adverse conditions that produce Reactive Oxygen Species (ROS) (Quan *et al.*, 2008). An excess of these compounds affects plant growth and development resulting in low crop yields (Wahid *et al.*, 2007). Generally, if plants are in non-stress conditions, ROS production and scavenging processes are in equilibrium; however, this condition can be easily perturbed by extreme temperatures and several abiotic and biotic factors (Del Río *et al.*, 2006). For example, ROS accumulation begins in chloroplasts and mitochondria of plants, such as wheat, cucumber, corn, *Arabidopsis thaliana* and rice, due to low temperature condition (Dat *et al.*, 2000; Al-Taisan, 2010). To decrease the damage of ROS in biomolecular targets (proteins, nucleic acids and lipids), plants employ a complex antioxidant system that helps them restore cellular redox homeostasis. This antioxidant system is divided in two principal sub-systems (Halliwell *et al.*, 2006), the non-enzymatic

(glutathione, ascorbate, tocopherols and phenolic compounds) and the enzymatic [Superoxide dismutase, SOD (EC. 1.15.1.1); Catalase, CAT (EC. 1.11.1.6); Ascorbate peroxidase, APX (EC. 1.11.1.11)]. However, the protective role offered by basal plant antioxidants does not always respond accurately under stress conditions; therefore, plants need to enhance several defensive responses to counteract this problem.

Many treatments have been successfully applied with the aim to elicit plant antioxidant systems, such as genetic manipulation of crops, conditioning thermal treatments or triggering of plant defense systems by exogenous elicitation (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2009; Islas-Osuna *et al.*, 2010). Each has shown specific limitations due to sample heterogeneity or the different experimental strategies followed. There are many advantages to using Oligoglucans (OG) from fungal cell-walls as triggering molecules or elicitors; these molecules can be exploited to reduce the effects of oxidative stress (Nita-Lazar *et al.*, 2004; Shinya *et al.*, 2006). Several fungal OG have been tested under both *in vivo* and *in vitro* conditions and have shown an important relationship between the plant antioxidant system and their ability to induce changes in the activities of antioxidant enzymes (Chivasa *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2008). Thus, in this study we examined if the application of *T. harzianum* OG may reduce damage in plants, triggering the activity of the enzymatic antioxidant system in cold-stressed *Cucurbita pepo* L. (zucchini) cotyledons.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and stress conditions

Zucchini seedlings (*Cucurbita pepo* L. cv. “Raven”) were cultured in plastic bags (10×15×5 cm) with peat moss, with a 16 h light photoperiod (100 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{sec}^{-1}$, photosynthetic photon flux density) at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ and a relative humidity of 80% for 10 day. Subsequently, zucchini seedlings were subjected to low temperature experimental conditions involving a dark refrigeration chamber at 5°C during the entire time period (0-15 day) (see Anexo 2). All chemical reagents were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO., USA).

Ion Leakage (IL) and H₂O₂ content

Membrane damage was measured by a conductivity method (Friedman and Rot, 2006). Briefly, 1 g of zucchini cotyledons from squash seedlings were cut in small pieces (1 cm^2) and were immediately incubated with 20 mL of a 0.3 M D-mannitol solution. After 2 h of light mixing, an initial IL value (v_i) was measured with an EC-METER 1481-61 Conductivity Meter (Cole-Palmer Instruments Co.). Subsequently, each sample was subjected to thermal treatment (121°C , 30 min) and was allowed to warm to room temperature while being lightly mixed (approximately 2 h). A final IL value (v_f) was measured as previously described. The total IL value was derived from the following equation:

$$\text{IL} = [(v_i/v_f) \times 100]$$

Hydrogen peroxide content was determined using the colorimetric method (Cervilla *et al.*, 2007), where zucchini cotyledons were ground in extraction buffer [50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (pH 6.8), 1 % (v/w) polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)]. Samples were clarified by centrifugation (Sorvall RC, SM-24 rotor) for 20 min ($8,000 \times g$) at 25°C . An aliquot (1 mL) of the extracted solution was mixed with 0.3 mL of 0.1% titanium dioxide in 20 % (v/v) H_2SO_4 and the mixture was then centrifuged for 30 min ($9,500 \times g$). The intensity of the yellow color of the supernatant, as a consequence of the chemical reaction between H_2O_2 and titanium dioxide in acidic medium, was measured at 415 nm. The H_2O_2 concentration was calculated from a standard curve plotted within the range of 1-10 mM H_2O_2 .

Fungal cell-wall preparation

First, spores of *Trichoderma harzianum* maintained on PDA slant (potato dextrose agar, Difco Co.) were inoculated (10^8 spores mL^{-1}) in 2.5 L PDB medium (potato dextrose broth, Difco, Co.) in an orbital shaker (150 rpm) at 27°C . After 10 d of incubation, the mycelium was harvested by vacuum filtration (see Anexo 3). The collected mycelium was washed twice with ten volumes of distilled water and was homogenized three times with ten volumes of chloroform:methanol (v/v) for further vacuum filtration. Finally, the recovered material was homogenized with five volumes of acetone, vacuum filtrated and then dried at room temperature. This cell-wall (see Anexo 4) was used to isolate OG mixtures by chemical and enzymatic hydrolysis.

Isolation of OG mixtures

The chemical OG mixture (CM) hydrolyzed from fungal cell-walls was extracted (Nita-Lazar *et al.*, 2004). Briefly, fungal cell-wall powder (1 g) was constantly mixed in 1 M NaOH (100 mL) at 65°C for 2 h and the obtained extract was neutralized with 50% acetic acid and was clarified by centrifugation (Sorvall RC, SM-14 rotor) for 10 min (10,000 rpm) at 25°C (see Anexo 5). The enzymatic OG mixture (EM) was obtained using GlucanexTM (20 mg g⁻¹; Sigma Co.) and this enzymatic hydrolysis was conducted at 27°C over 6 h with constant mixing (Okinaka *et al.*, 1995). The enzymatic reaction was stopped by autoclaving at 121°C for 30 min (see Anexo 5).

Biological assays using OG mixtures

Each chemical and enzymatic OG mixture was tested in fifteen cold-stressed zucchini plants using a double spray method (500 ppm, 15 mL), with the first spray at the initial time (0 day) and the second at the final time of the treatment (7 day). Controls consisted of water-sprayed plants grown under ideal (25°C, steady-state activity level, the negative control) or stressed (5°C, positive control) temperature conditions. Sampling was performed 2 h after spraying OG, at which point zucchini cotyledons were cut from the seedlings and immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -40°C until the leaf extract was obtained.

Changes in SOD activity (Wu *et al.*, 2008) were expressed in units mg⁻¹ protein, where one unit of SOD was defined as the amount of enzyme capable of reducing nitroblue tetrazolium chloride (NBT) by 50 %. The leaf tissue (1 g) plus 5 % (w/w) PVPP was

homogenized in 2 mL of cold extraction buffer [50 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (pH 7.5), 1 mM EDTA] and was subsequently filtered and centrifuged for 15 min (12,000 x g) at 4°C. The recovery enzyme extract was kept in cold temperature (10°C) during SOD activity determination, which was monitored at 560 nm. One milliliter of the reaction mixtures was used, containing 0.1 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 7.8), 0.01 M L-methionine, 0.025 % (v/v) Triton X-100, 0.11 mM EDTA, 57 μ M NBT, 1.3 μ M riboflavin and 50 μ g of enzyme extract. Reaction mixtures were illuminated for 10 min with 30-W white light lamps (General Electric Co.). Non-illuminated mixtures were used to correct background absorbance.

Enzymatic activity of CAT (Aebi, 1984) was determined by following the consumption of H_2O_2 at 240 nm for 3 min at 30°C. The leaf tissue (1 g) was homogenized in 10 mL of cold extraction buffer [50 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (pH 7.8), 0.5 % (v/v) Triton X-100, 0.5 mM EDTA, 1 % (w/v) PVPP]. The homogenate was filtered and centrifuged for 20 min (18,000xg) at 4°C. The recovery enzyme extract was stored at 10°C during CAT activity determination. The reaction mixture (0.5 mL) consisted of 50 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (pH 7.0), 50 mM H_2O_2 and 25 μ L of enzyme extract. The H_2O_2 molar extinction coefficient (28 $mM^{-1} cm^{-1}$) was used to calculate CAT activity, which was expressed in mmols of reduced H_2O_2 $min^{-1} mg^{-1}$ protein.

Enzymatic activity of APX (Nakano and Asada, 1987) was determined by monitoring changes at 290 nm for 3 min at 25°C. The leaf tissue (1 g) was homogenized in 10 mL of cold extraction buffer [50 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (pH 7.8), 5 mM L-ascorbic acid, 1

mM EDTA, 1 % (w/v) PVPP]. The enzyme extract was obtained as previously described for the CAT enzyme extract. The reaction mixture (0.5 mL) consisted of 50 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (pH 7.0), 5 mM L-ascorbic acid, 0.1 M H_2O_2 and 50 μ L of enzyme extract. The ascorbate molar extinction coefficient ($2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was used to calculate APX activity, which was expressed in mmols of oxidized ascorbate $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. For all enzymatic extracts, total protein was measured using a colorimetric method (Bradford, 1976) with the Bio-Rad Protein Assay reagent and bovine serum albumin as a standard.

Biological assays using OG SEC fractions

Both OG mixtures (2 mg lyophilized powder mL^{-1} of each mixture) were fractionated by size-exclusion chromatography (SEC; Biogel P-6, column 2.6×50 cm, 6-kDa cut-off exclusion limit) previously equilibrated with distilled H_2O at a volumetric flow of 1 mL min^{-1} . Collected fractions were assayed for hexose content (Bailey, 1958) versus a D-glucose standard. These fractions were pooled into three main chemical (C1, C2 and C3) or enzymatic (E1, E2 and E3) fractions according to their retention time and were lyophilized before being applied to cold-stressed zucchini cotyledons using a double spray method (500 ppm, 15 mL each). Changes in the enzymatic antioxidant system activities were evaluated as described earlier for the OG mixtures.

Biological assays using OG AEC sub-fractions

The main chemical or enzymatic fractions obtained by SEC, which showed the most effective ability to trigger the activity of the enzymatic antioxidant system with respect to

control cotyledons, were chosen. These fractions were sub-fractionated using anion-exchange chromatography (AEC; Q-sepharose fast flow, column 2.5×45 cm) with a linear gradient of 0-0.3 M HCO₂NH₄ (pH 6.5) in 1 M NaCl for 2 h and a volumetric flow of 2 mL min⁻¹. Collected fractions were assayed for hexose content (Bailey, 1958) versus a D-glucose standard and were pooled into three sub-fractions (1, 2 and 3) for each chemical or enzymatic OG fraction according to their elution time. Changes in enzymatic antioxidant activities were evaluated as described earlier for both OG mixtures and their fractions.

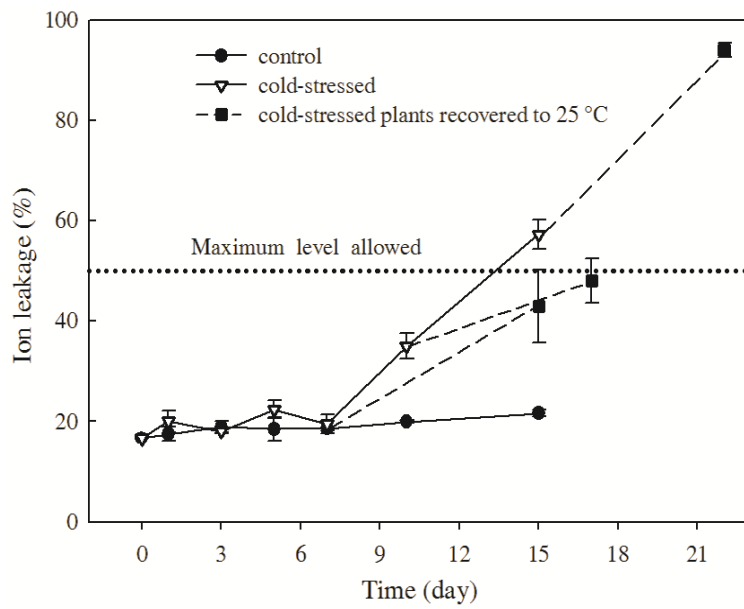
Statistical analysis

All enzymatic assays were repeated twice and compiled data were submitted to an ANOVA test using NCSS 2001 software (Kaysville, Utah, USA). To evaluate significant differences between OG, a Duncan test ($p \leq 0.05$) was conducted.

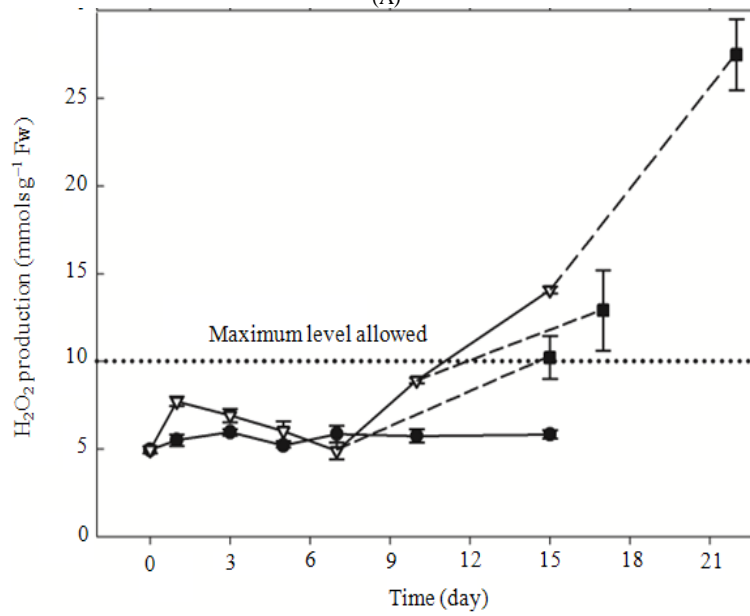
RESULTS

Establishment of cold stress condition

Control (25°C) zucchini cotyledons showed an IL value below 20% during the entire experimental time. For cold-stressed cotyledons, no changes in an IL values were appreciable during the first 7 day; however, after this time, gradual increments in damage of the cell membrane integrity were evident (Fig. 7A). The H₂O₂ content showed a similar trend in cold-stressed cotyledons, showing a high level of peroxide after 7 d of cold stress at 5°C (Fig. 7B). In both cases, when squash seedlings were transferred to a warmer environment (25°C) during 7 day for the promotion of the cell homeostasis recovery, only



(A)



(B)

Figure 7. Rate of ion leakage (A) and H₂O₂ production (B) in cold-stressed zucchini cotyledons (5°C). Results are mean ± SD of at least three replications

cold-stressed cotyledons for less than 7 day reached values below the maximum level allowed for these assays (IL of 50% and 10 mmols H₂O₂ g⁻¹ FW). Afterwards no recovery of cell homeostasis was observed.

Changes in SOD activity

To determine the potential biological activities of OG mixtures, these samples were assayed in cold-stressed zucchini cotyledons. SOD activity showed a decrease (42%) induced by cold stress with respect to basal SOD activity (Fig. 8). Only the enzymatic OG mixture (EM) had a significant effect ($p \leq 0.05$) in the enhancement of SOD activity (Fig. 8A).

The chemical OG mixture (CM) showed the same effect as the control cotyledons (Fig. 8B). In fact, the reduced SOD activity in cold-stressed cotyledons was increased by applying CM. Once evaluated the EM and CM triggering effects in the zucchini squash enzymatic antioxidant system, both chemical (C1, C2 and C3) and enzymatic (E1, E2 and E3) OG fractions were obtained by SEC and were applied to cold-stressed cotyledons. None of these fractions was capable of triggering SOD activity (Fig. 8). Every SEC OG fraction showed a similar effect to control cotyledons. The biological activity of OG mixtures diminished when SEC OG fractions were tested (Fig. 8). No triggering activity was detected when sub-fractions obtained by AEC were applied to cold-stressed cotyledons (data not shown).

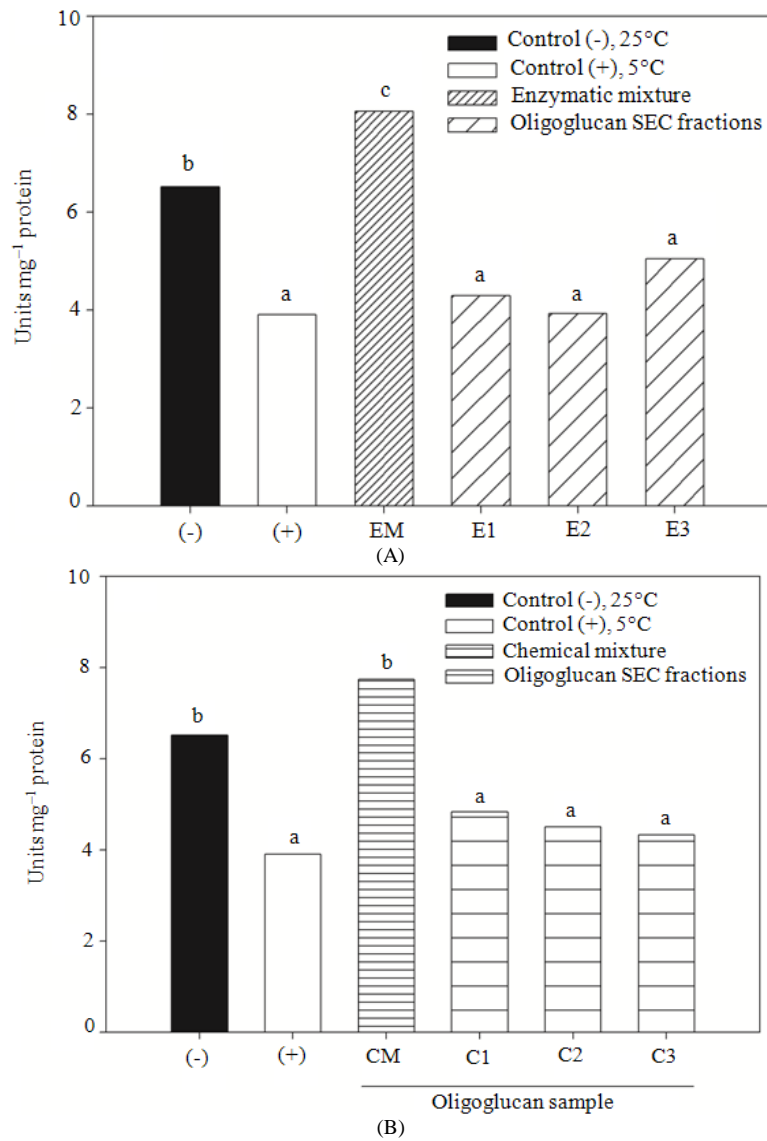


Figura 8. Changes in SOD activity in cold-stressed zucchini cotyledons elicited with enzymatic (A) and chemical (B) oligoglucan mixtures. Both mixtures include their respective SEC fractions. Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between values. Controls (-, +) correspond to non-elicited plants

Changes in APX activity

The CM was the most effective treatment for triggering APX activity in cold-stressed cotyledons (Fig. 9B), whereas EM-elicited cotyledons showed the least APX activity level (36% less than control cotyledons). Several fractions from chemical and enzymatic OG SEC displayed the ability to trigger APX activity when applied to cold-stressed cotyledons. All of the enzymatic SEC fractions induced increments in APX activity with respect to control cotyledons ($p \leq 0.05$) mainly the E2 fraction (7% more than controls) followed by E1 and E3 (Fig. 9A). Only the C1 and C2 fractions induced increments with APX activity above control cotyledons but below the APX activity level triggered by CM (Fig. 9B). Due to the high induction of APX activity achieved by fraction E2, this fraction was further purified by AEC; sub-fractions E2-1, E2-2 and E2-3 were obtained and applied to cold-stressed cotyledons. No increase in APX activity was detected by effects of these enzymatic AEC sub-fractions (Fig. 9C).

Changes in CAT activity

The chemical OG mixture (CM) was more effective than EM for CAT activity enhancement in cold-stressed zucchini cotyledons (Fig. 10B). No apparent enhancing effect was attributed to EM, but when enzymatic SEC fractions were tested in cold-stressed cotyledons, these tissues showed high CAT activity levels. The main triggering effect was attributed to E1 (55.6% more than controls) followed by the E3 fraction (Fig. 10A). The E1 fraction was subjected to fractionation using AEC and then E1 sub-fractions were applied to cold-stressed cotyledons. The CAT activity levels were above control cotyledons and the

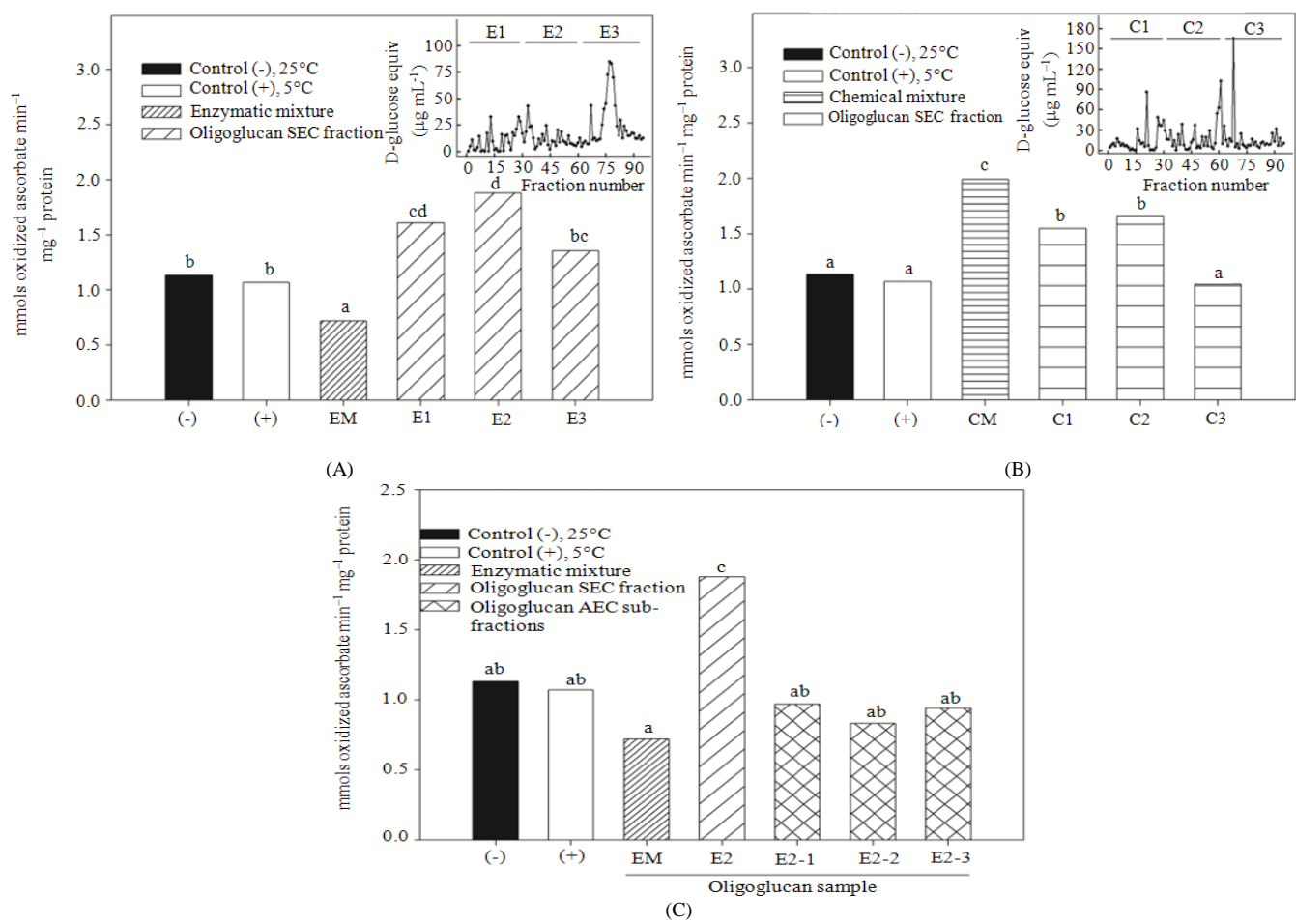


Figure 9. Changes in APX activity in cold-stressed cotyledons elicited with enzymatic (A) and chemical (B) oligoglucan mixtures. Both mixtures include their respective SEC fractions and their AEC sub-fractions (only C). Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between values. Controls (-, +) correspond to non-elicited plants. Inserts represent D-glucose contents from pooled enzymatic or chemical SEC fractions (A and B)

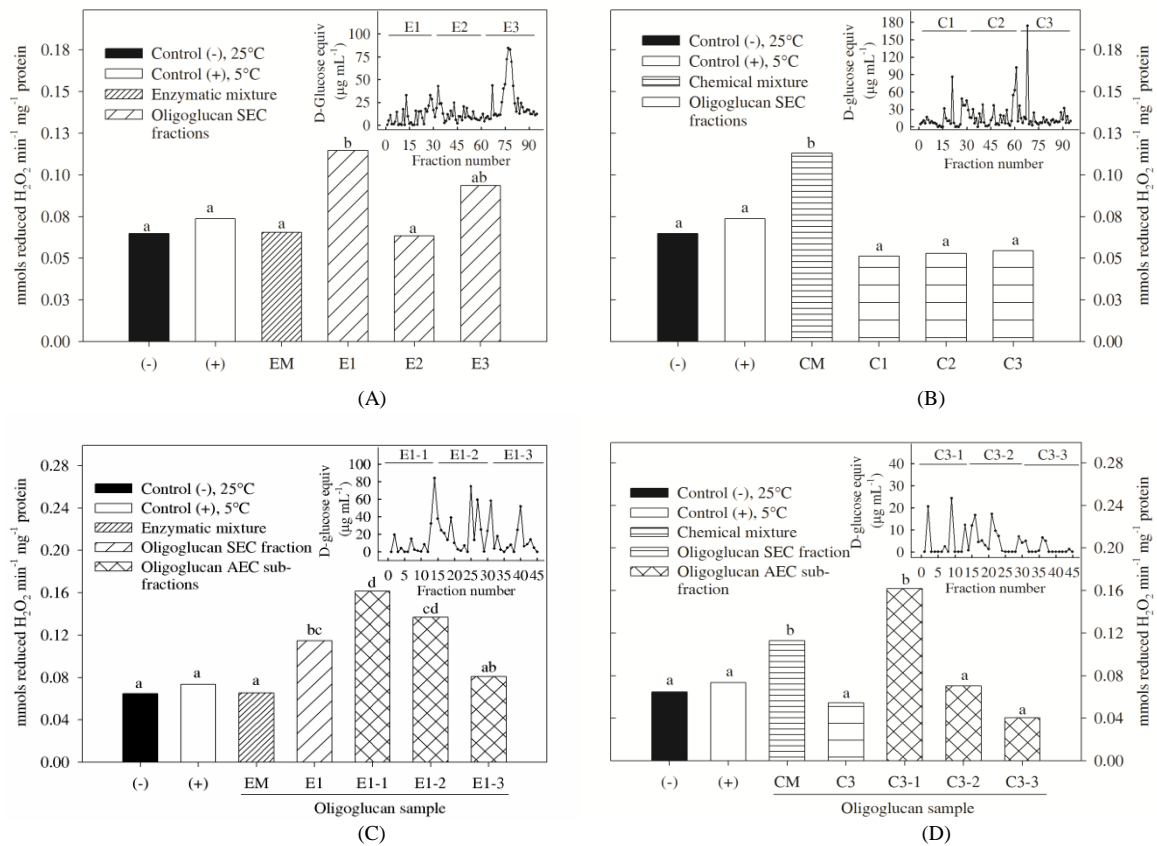


Figure 10. Changes in CAT activity in cold-stressed cotyledons elicited with enzymatic (A) and chemical (B) oligoglucan mixtures. Both mixtures include their respective SEC fractions and their AEC sub-fractions (only C and D). Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between values. Controls (-, +) correspond to non-elicited plants. Inserts represent D-glucose contents from pooled enzymatic or chemical SEC fractions (A and B) or AEC sub-fractions (C and D)

greatest effect was achieved by the E1-1 sub-fraction (119% more than control plants, $p \leq 0.05$) followed by E1-2 and E1-3 (Fig. 10C).

The same pattern was obtained in the CAT activity by the E3 sub-fractions (data not shown). In spite of the fact that CM was the most powerful OG mixture for triggering CAT activity, when this mixture was fractionated using SEC, no elicitor activity was detected by these chemical fractions. In contrast, when the chemical AEC sub-fractions were tested, the highest CAT activity level (120% more than control plants) was reached by the C3-1 OG sub-fraction (Fig. 10D).

DISCUSSION

World-crop production has been constantly influenced by detrimental effects of low temperature; this situation has been considered a serious problem because crop yields fell around fifty percent for several crops (Wahid *et al.*, 2007).

Important physiologic and metabolic plant processes are interrupted by cold-stressed conditions. Protein aggregation and denaturalization in chloroplasts and mitochondria, destruction of membrane lipids, production of toxic compounds and ROS overproduction (Howarth, 2005) are the most common responses of plant cells as a consequence of this type of thermal stress.

Zucchini cotyledons were subjected to cold-stressed treatment (5°C) to evaluate changes in the activity of antioxidant enzymes, such as SOD, APX and CAT, using fungal

OG isolated by chemical or enzymatic hydrolysis from *T. harzianum* cell-walls. The IL and H₂O₂ production were the parameters used to indicate the level of damage in zucchini squash seedlings. When seedlings that had been cold-stressed at least for 7 day were brought to 25°C, cellular homeostasis recovery was observed as indicated by a decrease in an IL and H₂O₂ production. When seedlings were cold-stressed for longer than 7 day, the plasma membrane integrity, measured as IL, decayed severely and there was no cellular recovery. Values of IL above 50 % reflect serious membrane damage in cold-stressed cucumber fruit (4°C, 7 day) (Deell *et al.*, 2000). At this level of membrane damage, important biochemical functions, such as the electron transport chain, the fixing of CO₂ or the electrolyte exchange between sub-cellular compartments, are irreversibly affected. Cold-stressed zucchini cotyledons showed an excessive IL value when stress exceeded 7 day.

Overproduction of ROS is an evident consequence of cold-stressed plants because the internal membrane damage directly affects mitochondrial respiratory activity and chloroplast CO₂ fixing is reduced (Esfandiari *et al.*, 2007). Indeed, H₂O₂ levels in cold-stressed zucchini cotyledons increased significantly after 7 d (see Anexo 2). This result reveals a typical response of low temperature treatments in stressed plants, such as cucumber, maize (Dat *et al.*, 2000) and Gramineae grasses (Al-Taisan, 2010). Zucchini cotyledons showed a linear correlation between H₂O₂ accumulation and membrane damage measured as IL, contrary to the same parameters evaluated in barley plants infected with powdery mildew (Harrach *et al.*, 2008). Even when biotic stress induced by phytopathogens varies in length and intensity, abiotic stress, such as low temperature,

results in similar intracellular damage. Disturbances between environmental conditions and plant fitness are uncontrollable consequences that appear under field conditions and it has been one of the reasons for the plant vulnerability to extreme temperatures and crop yields reduction. The recovery of health using a fungal OG application could be achieved by triggering plant defense responses, which would avoid important economic and agricultural losses.

Once the low temperature conditions in zucchini cotyledons were established, different OG samples were applied for triggering enzymatic antioxidant activity. With respect to changes in enzymatic activities, cold-stressed condition by itself reduced SOD activity in zucchini cotyledons. Similar results in SOD activity have been previously reported in several cold-stressed rice lines (Rozkowicz *et al.*, 2003). However, cold-stressed pre-flowering tobacco cv. “Petit Havana” plants (5°C for 4 day) showed an unaltered SOD activity level (Gechev *et al.*, 2003). Increments in SOD activity levels were found in cold-stressed barley seedlings (2°C for 1 day) (Radyuk *et al.*, 2009). Contrary to these contrasting results, under our experimental conditions, the low SOD activity level in cold-stressed zucchini cotyledons was reverted by application of OG mixtures, suggesting that the antioxidant system in cold-stressed zucchini cotyledons could be reinforced. These elicitors could have been recognized by non-specific OG receptors due to their complex chemical and structural composition, affecting the SOD activity. However, when the OG mixtures were subjected to SEC or AEC, no triggering was detected in cold-stressed cotyledons. We expected that the more purified the OG samples, the stronger the biological responses, but this was not observed regarding SOD activity. A different response was

observed with the enzymes that detoxify H₂O₂ in cold-stressed zucchini cotyledons. These results showed a selective biological response to fungal OG derived from *T. harzianum* cell-walls.

Contrary to the effect on SOD activity, no changes in APX were detected in cold-stressed cotyledons, which is in accordance with the APX activity level in cold-stressed pre-flowering tobacco plants (Gechev *et al.*, 2003). However, the fungal OG mixtures evaluated in this work display a well-differentiated effect in cold-stressed cotyledons. Clear differences between enzymatic and chemical OG mixtures (see inserts in Fig. 9A and B) may affect the recognizing process by zucchini cotyledons and, thus, display different APX activity levels. Some of the induced effects found in these experiments are an initial step in determining the complex role that these fungal elicitors play in up- or down-regulating the enzymatic antioxidant system activity in plants. First, differences in the effects of the fungal OG mixtures were evident under cold-stressed conditions. Moreover, significantly enhancements of APX and CAT activity levels were obtained by applying CM. These responses could be attributed to structural differences between *T. harzianum* OG mixtures and their accurate biological recognition by the host cell (Shinya *et al.*, 2006, Falcón-Rodríguez *et al.*, 2009). Because the isolation procedure for both CM and EC were performed using a random or site-specific β -1,3 and β -1,6 degradation of *T. harzianum* cell-wall, respectively, the remaining OG had different structural and chemical characteristics that greatly influence their possible biological recognition and activity (Mithofer *et al.*, 2001).

In cold-stressed zucchini cotyledons, both chemical and enzymatic OG SEC fractions triggered APX activity. An elicitor isolated from the cell-walls of *Fusarium* spp. up-regulated the gene expression of several antioxidant enzymes in an *Arabidopsis thaliana* suspension cell culture (Chivasa *et al.*, 2006), but many APX genes were simultaneously down-regulated. This fact is in disagreement with the global effects induced by *T. harzianum* OG in zucchini cotyledons, where both CAT and APX activity levels increased.

The most conclusive fact that OG mixtures have significant effects on the enhancement of the antioxidant system of cold-stressed zucchini cotyledons is the high CAT activity levels, similar to the effect in the enhancement of APX activity. A similar tendency was found in cold-stressed barley seedlings (Radyuk *et al.*, 2009). Significant increments of CAT activity were obtained with E1 and E3 OG SEC fractions, which could be helpful to the plant antioxidant enzymatic system when dealing with unfavorable environmental conditions. The recognition of specific structural carbohydrates from these SEC fractions and AEC sub-fractions showed that OG with different molecular weights have the ability to increase CAT activity significantly (see inserts in Fig. 10). Biosynthesis of CAT is inhibited by cold stress (Hertwig *et al.*, 1992); however, the fungal elicitors evaluated herein restored the CAT enzymatic levels in cold-stressed cotyledons.

The limited reports about the OG receptors, mainly involving soybean tissues, indicate that these elicitors are recognized by putative fungal glucan binding proteins anchored in the plasmatic membranes. In fact, the high specificity of these putative receptors reached nanomolar levels even when synthetic OG were evaluated (Fliegmann *et*

al., 2005). A few reports reveal that the most used fungal OG from *Phytophthora* spp., have direct effects on the antioxidant system of potato (Mizuno *et al.*, 2005) and soybean plants and cell cultures (Mithofer *et al.*, 2001). The differential effects found between these antioxidant enzymatic activities may be due to differential and specific recognition capabilities of OG putative receptors (Shinya *et al.*, 2006). The efficiency in biological recognition by specific membrane receptor could be affected by the structural and chemical composition of the fungal OG as a result of their isolation procedure (see Anexo 6).

In spite of the broad range of elicitation ability from different OG or even other types of oligosaccharides, there is not a rule that the same biological activity will be displayed upon different testing conditions in a selected model plant or tissues, such as suspension cell cultures, leaves, roots, seeds or fruits. Under stress conditions, squash seedlings must deal with the overproduction of ROS. The excessive accumulation of ROS could be the reason for transient inhibition of scavenging enzymes such as SOD. In cold-stressed zucchini cotyledons, peroxide production still continues along with other ROS enzymatic sources, such as NADPH oxidases, amino oxidase and flavin oxidases (De Gara *et al.*, 2003).

CONCLUSION

The oxidative stress caused by ROS overproduction can be counteracted by triggering APX and CAT enzymatic activities in cold-stressed zucchini cotyledons, mediated by *T. harzianum* OG exogenous elicitation. It would be of great interest to investigate whether chemical and structural properties of these OG modify the antioxidant

system activity in stressed plants. The results of this study could have important implications in restoring the adverse environmental effects in plants during their development, especially under non-controlled low temperatures.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Method. Enzymol., 105: 121-126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Al-Taisan, W.A., 2010. Comparative Effects of Drought and Salt Stress on Germination and Seedling Growth of *Pennisetum divisum* (Gmel.) Henr. Am. J. Applied Sci., 7: 640-646. DOI: 10.3844/2010.640.646
- Bailey, R.W., 1958. The reaction of pentoses with anthone. Biochem. J., 68: 669-672. PMID: 13522678.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye. Anal. Biochem., 72: 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cervilla, L.M., B. Blasco, J.J. Ríos, L. Romero and J.M. Ruiz, 2007. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. Ann. Bot., 100: 747-756. DOI: 10.1093/aob/mcm156
- Chivasa, S., J.M. Hamilton, R.S. Pringle, B.K. Ndimba and W.J. Simon *et al.*, 2006. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated arabidopsis cell cultures. J. Exp. Bot., 57: 1553-1562. DOI: 10.1093/jxb/erj149

- Dat, J., S. Vandenaabeele, E. Vranova, M.V. Montagu, D. Inze and F.V. Breusegem, 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cel. Mol. Life Sci.*, 57: 779-95. DOI: 10.1007/s000180050041
- De Gara, L., M.C. Pinto and F. Tommasi, 2003. The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol. Biochem.*, 41: 863-870. DOI: 10.1016/S0981-9428(03)00135-9
- Deell, J.R., C. Vigneault and S. Lemerre, 2000. Water temperature for hydrocooling field cucumbers in relation to chilling injury during storage. *Postharvest Biol. Tech.*, 18: 27-32. DOI: 10.1016/S0925-5214(99)00057-5
- Del Río, L.A., L.M. Sandalio, F.J. Corpas, J.M. Palma and J.B. Barroso, 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging and role in cell signaling. *Plant Physiol.*, 141: 330-335. DOI: 10.1104/pp.106.078204
- Esfandiari, E., M.R. Shakiba, S.A. Mahboob, H. Alyari and M. Toorchi, 2007. Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. *J. Food Agric. Environ.*, 5: 149-153. <http://www.world-food.net/scientificjournal/2007/issue1/pdf/agriculture/a5.pdf>
- Falcón-Rodríguez, A.B., J.C. Cabrera, E. Ortega and M.A. Martínez-Téllez, 2009. Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defense responses in roots and leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Am. J. Agric. & Biol. Sci.* 4(3):192-200. DOI: 10.3844/ajabssp.2009.192.200
- Fliegmann, J., E. Montel, A. Djulic, S. Cottaz, H. Driguez and J. Ebel, 2005. Catalytic properties of the bifunctional soybean β -glucan-binding protein, a member of family 81 glycoside hydrolases. *FEBS Lett.*, 579: 6647-6652. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.10.060

- Friedman, H. and I.Rot, 2006. Characterization of chilling injury in *Heliotropium arborescens* and *Lantana camera* cuttings. *Postharvest Biol. Tech.*, 40: 244-249. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2005.12.020
- Gechev, T., H. Willekens, M.V. Montagu, D. Inze and W.V. Camp *et al.*, 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J. Plant Physiol.*, 160: 509-515. DOI: 10.1078/0176-1617-00753
- Halliwell, B., 2006. Redox Species and Antioxidants. *Redox biology in fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol.*, 141: 312-322. DOI: 10.1104/pp.106.077073
- Harrach, B.D., J. Fodor, M. Pogány, J. Preuss and B. Barna, 2008. Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur. J. Plant Pathol.*, 121: 21-33. DOI: 10.1007/s10658-007-9236
- Hertwig, B., P. Streb and J. Feierabend, 1992. Light dependence of cat synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.*, 100: 1547-1553. PMID: PMC1075818
- Howarth, C.J., 2005. Genetic Improvements of Tolerance to High Temperature. In: *Abiotic stresses: Plant resistance through breeding and molecular approaches*, Ashraf, M. and P.J.C. Harris (Eds.). Howarth Press Inc., New York, ISBN: 1-56022-965-9, pp: 725.
- Islas-Osuna, M.A., N.A. Stephens-Camacho, C.A. Contreras-Vergara, M. Rivera Dominguez, E. Sanchez Sanchez, M.A. Villegas-Ochoa and G.A. Gonzalez Aguilar, 2010. Novel postharvest treatment reduces ascorbic acid losses in mango (*Mangifera indica* L.) Var. Kent. *Am. J. Agric. & Biol. Sci.* 5(3): 342-349. DOI: 10.3844/ajabssp.2010.342.349

- Mithofer, A., J. Fliegmann, A. Daxberger, C. Ebel and G. Neuhaus-Url *et al.*, 2001. Induction of H₂O₂ synthesis by β -glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS Lett.*, 508: 191-195. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)03054-X
- Mizuno, M., Y. Tada, K. Uchii, S. Kawakami and S. Mayama, 2005. Catalase and alternative oxidase cooperatively regulate programmed cell death induced by β -glucan elicitor in potato suspension cultures. *Planta*, 220: 849-853. DOI: 10.1007/s00425-004-1402-7
- Nakano, Y. and K. Asada, 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts, its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, 28: 131-140. ISSN: 0032-0781. <http://pcp.oxfordjournals.org/content/28/1/131.abstract>
- Nita-Lazar, M., A. Heyraud, C. Gey, I. Braccini and Y. Lienart, 2004. Novel oligosaccharides isolated from *Fusarium oxysporum* L. Rapidly induce PAL activity in *Rubus* cells. *Acta Biochim. Pol.*, 51: 625-634. PMID: 15448725
- Okinaka, Y., K. Mimori, K. Takeo, S. Kitamura and Y. Takeuchi *et al.*, 1995. A structural model for the mechanisms of Elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. *Plant Physiol.* 109: 839-845. PMID: 8552716
- Quan, L.J., B. Zhang, W.W. Shi and H.Y. Li, 2008. Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* 50: 2-18. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x
- Radyuk, M.S., I.N. Domanskaya, R.A. Shcherbakov and N.V. Shalygo, 2009. Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of

antioxidant enzymes in green barley leaves. *Russ. J. Plant Physiol.*, 56: 175-180. DOI: 10.1134/S1021443709020058

Rozkowicz, A., A.M. Picco, M. Rodolfi, S. Pinamonti and G. Forlani, 2003. Differential responses *in vitro* of rice cultivars to italian lineages of the blast pathogen *Pyricularia grisea* (Cooke) sacc. 1. Oxidative burst. *J. Plant Physiol.*, 160: 1033-1040. DOI: 10.1078/0176-1617-00941

Shinya, T., R. Menard, I. Kozone, H. Matsuoka and N. Shibuya *et al.*, 2006. Novel β -1,3-, 1,6-oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco. *FEBS J.*, 273: 2421-2431. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05249.x

Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf and M.R. Foolad, 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.*, 61: 199-223. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2007.05.011

Wu, T., J. Cao and Y. Zhang, 2008. Comparison of antioxidant activities and endogenous hormone levels between bush and vine-type tropical pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchense). *Sci. Hortic.*, 116: 27-33. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.04.002

Zheng, Y., R.W.M. Fung, S.Y. Wang and C.Y. Wang, 2008. Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to superatmospheric oxygen. *Postharvest Biol. Tech.*, 47: 151-158. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2007.06.016

CONCLUSIONES GENERALES

La aplicación exógena de oligoglucanos derivados de la pared celular de *Trichoderma harzianum* induce incrementos de la actividad catalasa en cotiledones de calabaza zucchini bajo estrés térmico.

Los diferentes oligoglucanos derivados química o enzimáticamente de la pared celular de *Trichoderma harzianum* son capaces de restablecer la actividad enzimática del sistema antioxidante que se reduce por efecto del estrés térmico.

Los cotiledones de calabaza zucchini responden de manera diferencial ante condiciones ambientales adversas (altas y bajas temperaturas), por lo que los tratamientos de inducción de la actividad del sistema antioxidante enzimático depende de la condición de estrés evaluada, así como del grado de purificación que presente el inductor de origen fúngico.

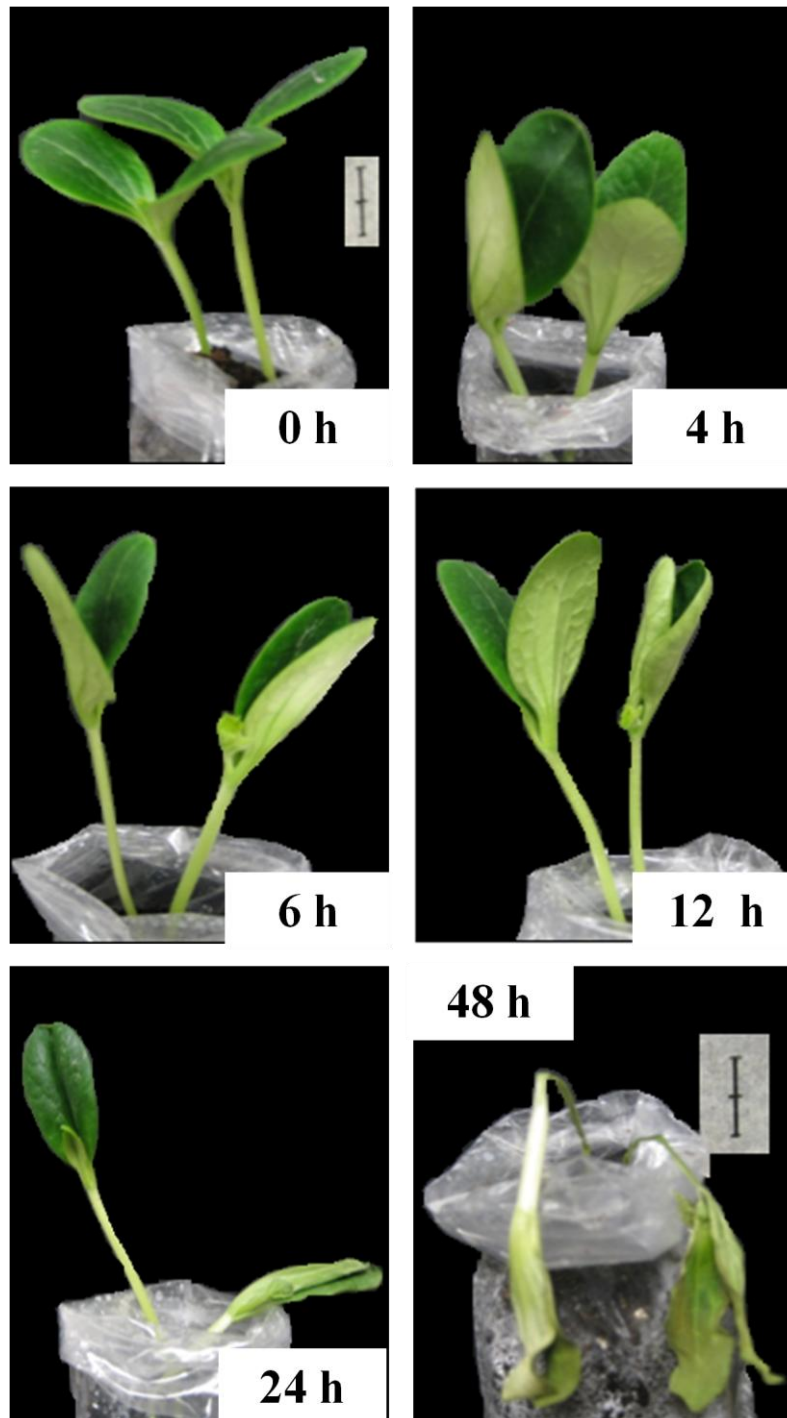
PERSPECTIVAS

En base a los hallazgos anteriormente expuestos, surgen desafíos de investigación que requieren ser abordados, con la finalidad de responder a los complejos mecanismos defensivos de las plantas ante situaciones ambientalmente desfavorables como el estrés térmico, siendo este hecho decisivo para una correcta respuesta defensiva, o reajuste del sistema antioxidante. Así mismo, resulta relevante incrementar el conocimiento en cuanto al sistema de reconocimiento de estos inductores en plantas bajo condiciones de estrés.

Encontrar respuesta a estos desafíos, sin duda aportará grandes avances al conocimiento en la respuesta de la interacción planta-oligoglucano-condición de estrés. Los desafíos son:

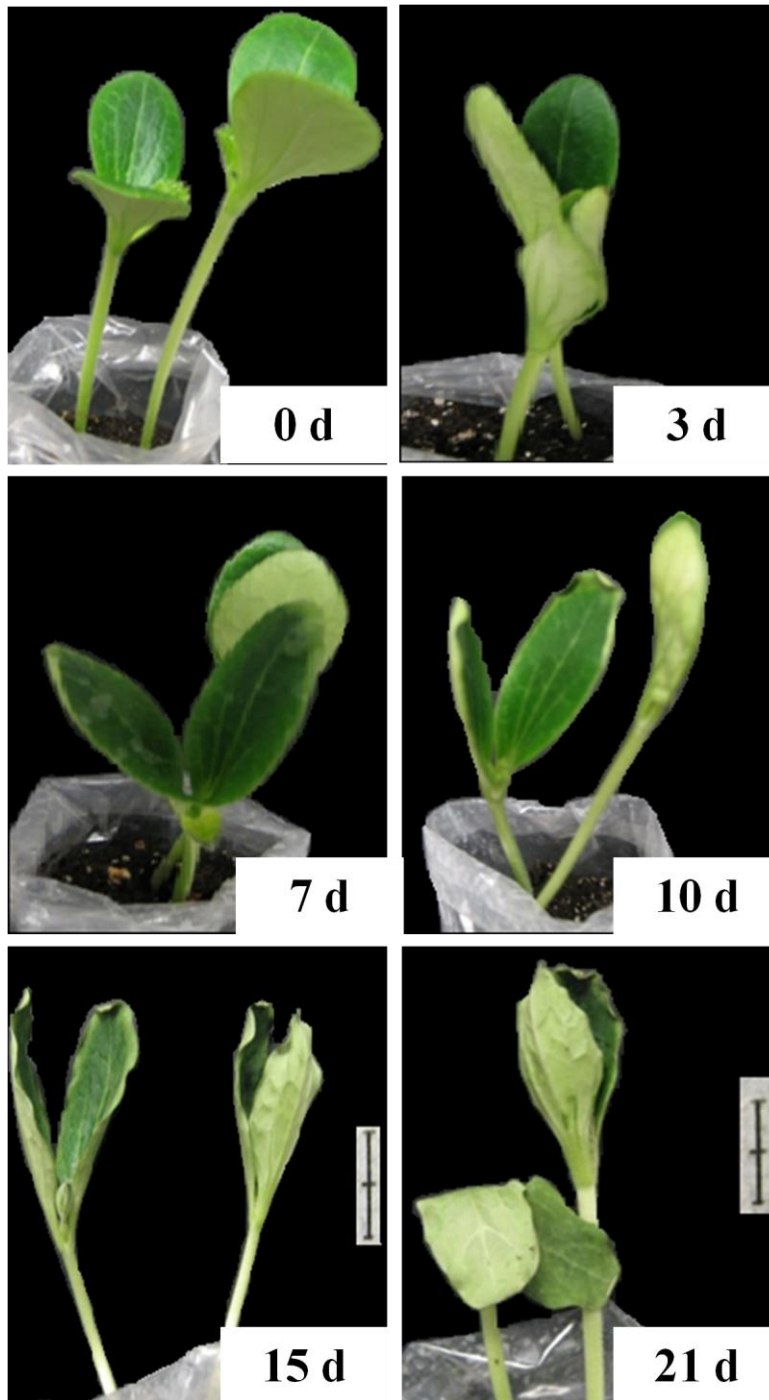
- ¿Cómo afecta determinada condición de estrés térmico al reconocimiento de estos inductores del sistema antioxidante enzimático?
- ¿Cuál es el efecto a nivel de expresión génica producido por la aplicación de estos inductores fúngicos?
- ¿Cuál es la secuencia de monosacáridos que promueve la mayor inducción del sistema antioxidante enzimático?

Anexo 1



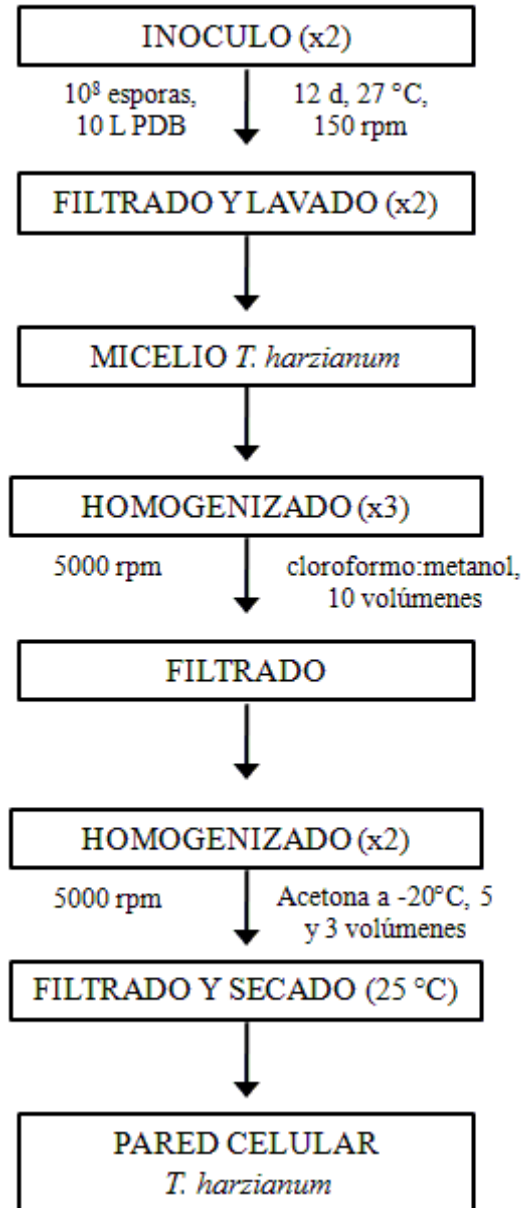
Daños producidos en plántulas de calabaza zucchini bajo condiciones de estrés por calor (45 °C).

Anexo 2



Daños producidos en plántulas de calabaza zucchini bajo estrés por frío (5 °C).

Anexo 3



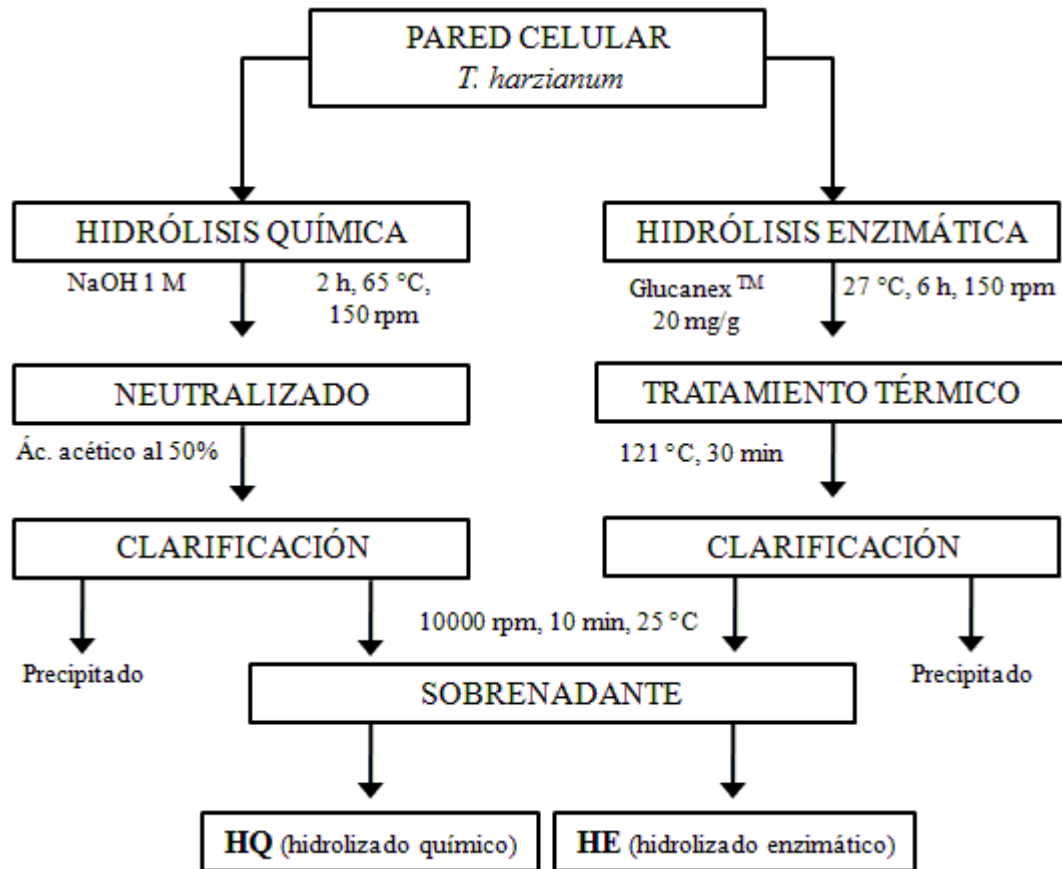
Obtención de pared celular a partir de micelio de *T. harzianum*.

Anexo 4

Rendimiento del aislamiento de pared celular de *T. harzianum*

Medio PDB (L)	Micelio filtrado (g)	Pared celular (g)	Rendimiento (%)
20	287.3	15.1	5.25

Anexo 5



Obtención de mezclas de oligoglucanos mediante hidrólisis química y enzimática de la pared celular de *T. harzianum*.

Anexo 6

Carbohydrate analysis in active oligoglucans

Monosaccharide [†]	Retention time (min) [†]	AEC Sub-fraction (%)		
		E1-1	E3-1	C3-1
Arabinose	14.58	16.27 ^b	17.78 ^c	17.26 ^b
Galactose	18.54	15.59 ^b	13.99 ^b	16.91 ^b
Glucose	22.19	58.46 ^c	49.26 ^d	26.46 ^c
Xylose	26.80	5.55 ^a	17.57 ^c	29.87 ^d
Mannose	31.16	4.03 ^a	3.40 ^a	9.51 ^a

Values with different letters are statistically different (Duncan, $p \leq 0.05$). E, enzymatic; C, chemical oligoglucan sub-fraction.

[†] Identity and retention time of monosaccharides were analyzed by HPAEC-PAD using the DX-500 system.

Oligoglucans as Elicitors of an Enzymatic Antioxidant System in Zucchini Squash (*Cucurbita pepo* L.) Seedlings at Low Temperature

Abel Ceron-Garcia, Gustavo Adolfo Gonzalez-Aguilar, Irasema Vargas-Arispuro, Maria Auxiliadora Islas-Osuna and Miguel Angel Martinez-Tellez
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Km 0.6, Carretera a la Victoria, AP 1735, 83000, Hermosillo, Sonora, México

Abstract: Problem statement: Non-controlled low temperatures affect physiological and biochemical processes leading to Reactive Oxygen Species (ROS) accumulation in plants, which normally are stabilized by the antioxidant system. Superoxide Dismutase (SOD), Ascorbate Peroxidase (APX) and Catalase (CAT) are the most important ROS-detoxification enzymes in stressed plants. **Approach:** The activity of these enzymes were examined in response to fungal Oligoglucans (OG) in cold-stressed cotyledons of *Cucurbita pepo* L. Cold stress condition was settled in zucchini cotyledons using relative Ion Leakage (IL) and H₂O₂ accumulation. Then, OG were obtained from *Trichoderma harzianum* cell-wall by enzymatic and chemical hydrolysis. These elicitors were purified by size-exclusion and anion-exchange chromatography and tested in cold-stressed cotyledons. **Results:** No significant changes on H₂O₂ content and IL were observed between treated and control cold-stressed cotyledons, during the first 7 days of storage at 5°C. Afterwards H₂O₂ values increased greatly after cold-stressed. Then, cold stress conditions were established (7 d, 5°C). The APX and CAT activities remained stable, but not SOD activity, which decreased about 42% in control cotyledons. When a chemical OG mixture (CM) was applied to cold-stressed cotyledons, APX and CAT activity levels increased. The SOD activity was only increased by an enzymatic OG mixture (EM). The APX activity level was increased in cold-stressed cotyledons using OG size-exclusion chromatography fractions from both CM and EM; however, changes in CAT activity were only possible using EM fractions and no changes were detected in SOD activity. The highest CAT activity levels were triggered using OG anion-exchange chromatography sub-fractions from both CM and EM fractions (120 and 119 % of enzymatic activity, respectively). **Conclusion:** The oxidative stress can be counteracted by the triggering of APX and CAT activity in cold-stressed zucchini cotyledons mediated by *T. harzianum* cell-wall OG.

Key words: Antioxidant response, cold stress, fungal oligoglucans, Reactive Oxygen Species (ROS), Superoxide Dismutase (SOD), Ascorbate Peroxidase (APX), Catalase (CAT), Oligoglucans (OG), *Cucurbita pepo* L

INTRODUCTION

Plant development is challenged by many environmentally and physiologically adverse conditions that produce Reactive Oxygen Species (ROS) (Quan *et al.*, 2008). An excess of these compounds affects plant growth and development resulting in low crop yields (Wahid *et al.*, 2007). Generally, if plants are in non-stress conditions, ROS production and scavenging processes are in equilibrium; however, this condition can be easily perturbed by extreme temperatures and several abiotic and biotic factors (Del Río *et al.*, 2006). For example,

ROS accumulation begins in chloroplasts and mitochondria of plants, such as wheat, cucumber, corn, *Arabidopsis thaliana* and rice, due to low temperature condition (Dat *et al.*, 2000; Al-Taisan, 2010). To decrease the damage of ROS in biomolecular targets (proteins, nucleic acids and lipids), plants employ a complex antioxidant system that helps them restore cellular redox homeostasis. This antioxidant system is divided in two principal sub-systems (Halliwell *et al.*, 2006), the non-enzymatic (glutathione, ascorbate, tocopherols and phenolic compounds) and the enzymatic [Superoxide dismutase, SOD (EC. 1.15.1.1); Catalase, CAT (EC. 1.11.1.6); Ascorbate peroxidase,

Corresponding Author: Miguel Angel Martinez-Tellez, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Km. 0.6, Carretera a la Victoria, AP 1735, 83000, Hermosillo, Sonora, México
Fax: +52(662) 280-04-22

APX (EC. 1.11.1.7)]. However, the protective role offered by basal plant antioxidants does not always respond accurately under stress conditions; therefore, plants need to enhance several defensive responses to counteract this problem.

Many treatments have been successfully applied with the aim to elicit plant antioxidant systems, such as genetic manipulation of crops, conditioning thermal treatments or triggering of plant defense systems by exogenous elicitation (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2009; Islas-Osuna *et al.*, 2010). Each has shown specific limitations due to sample heterogeneity or the different experimental strategies followed. There are many advantages to using Oligoglucans (OG) from fungal cell-walls as triggering molecules or elicitors; these molecules can be exploited to reduce the effects of oxidative stress (Nita-Lazar *et al.*, 2004; Shinya *et al.*, 2006). Several fungal OG have been tested under both *in vivo* and *in vitro* conditions and have shown an important relationship between the plant antioxidant system and their ability to induce changes in the activities of antioxidant enzymes (Chivasa *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2008). Thus, in this study we examined if the application of *T. harzianum* OG may reduce damage in plants, triggering the activity of the enzymatic antioxidant system in cold-stressed *Cucurbita pepo* L. (zucchini) cotyledons.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and stress conditions: Zucchini seedlings (*Cucurbita pepo* L. cv. "Raven") were cultured in plastic bags (10×15×5 cm) with peat moss, with a 16 h light photoperiod (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, photosynthetic photon flux density) at $25 \pm 3^\circ\text{C}$ and a relative humidity of 80% for 10 day. Subsequently, zucchini seedlings were subjected to low temperature experimental conditions involving a dark refrigeration chamber at 5°C during the entire time period (0-15 day). All chemical reagents were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO., USA).

Ion Leakage (IL) and H₂O₂ content: Membrane damage was measured by a conductivity method (Friedman and Rot, 2006). Briefly, 1 g of zucchini cotyledons from squash seedlings were cut in small pieces (1 cm²) and were immediately incubated with 20 mL of a 0.3 M D-mannitol solution. After 2 h of light mixing, an initial IL value (*vi*) was measured with an EC-METER 1481-61 Conductivity Meter (Cole-Palmer Instruments Co.). Subsequently, each sample was subjected to thermal treatment (121°C, 30 min) and was allowed to warm to room temperature while being

lightly mixed (approximately 2 h). A final IL value (*vf*) was measured as previously described. The total IL value was derived from the following equation: [(*vi/vf*) ×100]. Hydrogen peroxide content was determined using the colorimetric method (Cervilla *et al.*, 2007), where zucchini cotyledons were ground in extraction buffer [50 mM K₂HPO₄·3H₂O (pH 6.8), 1 % (v/w) polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)]. Samples were clarified by centrifugation (Sorvall RC, SM-24 rotor) for 20 min (8,000×g) at 25°C. An aliquot (1 mL) of the extracted solution was mixed with 0.3 mL of 0.1% titanium dioxide in 20 % (v/v) H₂SO₄ and the mixture was then centrifuged for 30 min (9,500×g). The intensity of the yellow color of the supernatant, as a consequence of the chemical reaction between H₂O₂ and titanium dioxide in acidic medium, was measured at 415 nm. The H₂O₂ concentration was calculated from a standard curve plotted within the range of 1-10 mM H₂O₂.

Fungal cell-wall preparation: First, spores of *Trichoderma harzianum* maintained on PDA slant (potato dextrose agar, Difco Co.) were inoculated (10⁸ spores mL⁻¹) in 2.5 L PDB medium (potato dextrose broth, Difco, Co.) in an orbital shaker (150 rpm) at 27°C. After 10 d of incubation, the mycelium was harvested by vacuum filtration. The collected mycelium was washed twice with ten volumes of distilled water and was homogenized three times with ten volumes of chloroform:methanol (v/v) for further vacuum filtration. Finally, the recovered material was homogenized with five volumes of acetone, vacuum filtrated and then dried at room temperature. This cell-wall was used to isolate OG mixtures by chemical and enzymatic hydrolysis.

Isolation of OG mixtures: The chemical OG mixture (CM) hydrolyzed from fungal cell-walls was extracted (Nita-Lazar *et al.*, 2004). Briefly, fungal cell-wall powder (1 g) was constantly mixed in 1 M NaOH (100 mL) at 65°C for 2 h and the obtained extract was neutralized with 50% acetic acid and was clarified by centrifugation (Sorvall RC, SM-14 rotor) for 10 min (10,000 rpm) at 25°C. The enzymatic OG mixture (EM) was obtained using GlucanexTM (20 mg g⁻¹; Sigma Co.) and this enzymatic hydrolysis was conducted at 27°C over 6 h with constant mixing (Okinaka *et al.*, 1995). The enzymatic reaction was stopped by autoclaving at 121°C for 30 min.

Biological assays using OG mixtures: Each chemical and enzymatic OG mixture was tested in fifteen cold-stressed zucchini plants using a double spray method

(500 ppm, 15 mL), with the first spray at the initial time (0 day) and the second at the final time of the treatment (7 day). Controls consisted of water-sprayed plants grown under ideal (25°C, steady-state activity level, the negative control) or stressed (5°C, positive control) temperature conditions. Sampling was performed 2 h after spraying OG, at which point zucchini cotyledons were cut from the seedlings and immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -40°C until the leaf extract was obtained.

Changes in SOD activity (Wu *et al.*, 2008) were expressed in units mg^{-1} protein, where one unit of SOD was defined as the amount of enzyme capable of reducing nitroblue tetrazolium chloride (NBT) by 50%. The leaf tissue (1 g) plus 5% (w/w) PVPP was homogenized in 2 mL of cold extraction buffer [50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.5), 1 mM EDTA] and was subsequently filtered and centrifuged for 15 min (12,000 \times g) at 4°C. The recovery enzyme extract was kept in cold temperature (10°C) during SOD activity determination, which was monitored at 560 nm. One milliliter of the reaction mixtures was used, containing 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.8), 0.01 M L-methionine, 0.025% (v/v) Triton X-100, 0.11 mM EDTA, 57 μM NBT, 1.3 μM riboflavin and 50 μg of enzyme extract. Reaction mixtures were illuminated for 10 min with 30-W white light lamps (General Electric Co.). Non-illuminated mixtures were used to correct background absorbance.

Enzymatic activity of CAT (Aebi, 1984) was determined by following the consumption of H_2O_2 at 240 nm for 3 min at 30°C. The leaf tissue (1 g) was homogenized in 10 mL of cold extraction buffer [50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.8), 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5 mM EDTA, 1% (w/v) PVPP]. The homogenate was filtered and centrifuged for 20 min (18,000 \times g) at 4°C. The recovery enzyme extract was stored at 10°C during CAT activity determination. The reaction mixture (0.5 mL) consisted of 50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.0), 50 mM H_2O_2 and 25 μL of enzyme extract. The H_2O_2 molar extinction coefficient (28 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) was used to calculate CAT activity, which was expressed in mmols of reduced H_2O_2 $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

Enzymatic activity of APX (Nakano and Asada, 1987) was determined by monitoring changes at 290 nm for 3 min at 25°C. The leaf tissue (1 g) was homogenized in 10 mL of cold extraction buffer [50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.8), 5 mM L-ascorbic acid, 1 mM EDTA, 1% (w/v) PVPP]. The enzyme extract was obtained as previously described for the CAT enzyme extract. The reaction mixture (0.5 mL) consisted of 50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.0), 5 mM L-ascorbic acid,

0.1 M H_2O_2 and 50 μL of enzyme extract. The ascorbate molar extinction coefficient (2.8 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) was used to calculate APX activity, which was expressed in mmols of oxidized ascorbate $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein. For all enzymatic extracts, total protein was measured using a colorimetric method (Bradford, 1976) with the Bio-Rad Protein Assay reagent and bovine serum albumin as a standard.

Biological assays using OG SEC fractions: Both OG mixtures (2 mg lyophilized powder mL^{-1} of each mixture) were fractionated by size-exclusion chromatography (SEC; Biogel P-6, column 2.6 \times 50 cm, 6-kDa cut-off exclusion limit) previously equilibrated with distilled H_2O at a volumetric flow of 1 mL min^{-1} . Collected fractions were assayed for hexose content (Bailey, 1958) versus a D-glucose standard. These fractions were pooled into three main chemical (C1, C2 and C3) or enzymatic (E1, E2 and E3) fractions according to their retention time and were lyophilized before being applied to cold-stressed zucchini cotyledons using a double spray method (500 ppm, 15 mL each). Changes in the enzymatic antioxidant system activities were evaluated as described earlier for the OG mixtures.

Biological assays using OG AEC sub-fractions: The main chemical or enzymatic fractions obtained by SEC, which showed the most effective ability to trigger the activity of the enzymatic antioxidant system with respect to control cotyledons, were chosen. These fractions were sub-fractionated using anion-exchange chromatography (AEC; Q-sepharose fast flow, column 2.5 \times 45 cm) with a linear gradient of 0-0.3 M HCO_2NH_4 (pH 6.5) in 1 M NaCl for 2 h and a volumetric flow of 2 mL min^{-1} . Collected fractions were assayed for hexose content (Bailey, 1958) versus a D-glucose standard and were pooled into three sub-fractions (1, 2 and 3) for each chemical or enzymatic OG fraction according to their elution time. Changes in enzymatic antioxidant activities were evaluated as described earlier for both OG mixtures and their fractions.

Statistical analysis: All enzymatic assays were repeated twice and compiled data were submitted to an ANOVA test using NCSS 2001 software (Kaysville, Utah, USA). To evaluate significant differences between OG, a Duncan test ($p \leq 0.05$) was conducted.

RESULTS

Establishment of cold stress condition: Control (25°C) zucchini cotyledons showed an IL value below

20% during the entire experimental time. For cold-stressed cotyledons, no changes in an IL values were appreciable during the first 7 day; however, after this time, gradual increments in damage of the cell membrane integrity were evident (Fig. 1A). The H₂O₂ content showed a similar trend in cold-stressed cotyledons, showing a high level of peroxide after 7 d of cold stress at 5°C (Fig. 1B). In both cases, when squash seedlings were transferred to a warmer environment (25°C) during 7 day for the promotion of the cell homeostasis recovery, only cold-stressed cotyledons for less than 7 day reached values below the maximum level allowed for these assays (IL of 50% and 10 mmols H₂O₂ g⁻¹ FW). Afterwards no recovery of cell homeostasis was observed.

Changes in SOD activity: To determine the potential biological activities of OG mixtures, these samples were assayed in cold-stressed zucchini cotyledons. SOD activity showed a decrease (42%) induced by cold

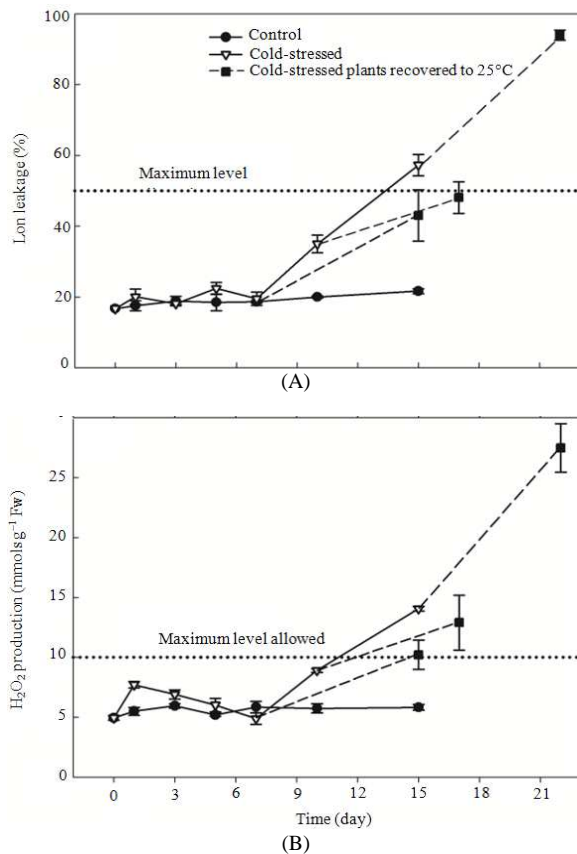


Fig. 1: Rate of ion leakage (A) and H₂O₂ production (B) in cold-stressed zucchini cotyledons (5°C). Results are mean ± SD of at least three replications

stress with respect to basal SOD activity (Fig. 2). Only the enzymatic OG mixture (EM) had a significant effect ($p \leq 0.05$) in the enhancement of SOD activity (Fig. 2A).

The chemical OG mixture (CM) showed the same effect as the control cotyledons (Fig. 2B). In fact, the reduced SOD activity in cold-stressed cotyledons was increased by applying CM. Once evaluated the EM and CM triggering effects in the zucchini squash enzymatic antioxidant system, both chemical (C1, C2 and C3) and enzymatic (E1, E2 and E3) OG fractions were obtained by SEC and were applied to cold-stressed cotyledons. None of these fractions was capable of triggering SOD activity (Fig. 2). Every SEC OG fraction showed a similar effect to control cotyledons. The biological activity of OG mixtures diminished when SEC OG fractions were tested (Fig. 2). No triggering activity was detected when sub-fractions obtained by AEC were applied to cold-stressed cotyledons (data not shown).

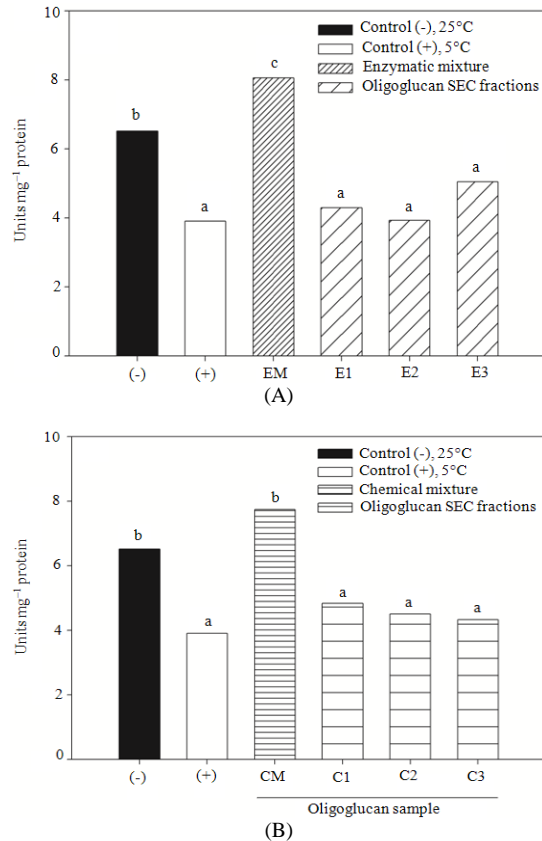


Fig. 2: Changes in SOD activity in cold-stressed zucchini cotyledons elicited with enzymatic (A) and chemical (B) oligoglucan mixtures. Both mixtures include their respective SEC fractions. Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between values. Controls (-, +) correspond to non-elicited plants

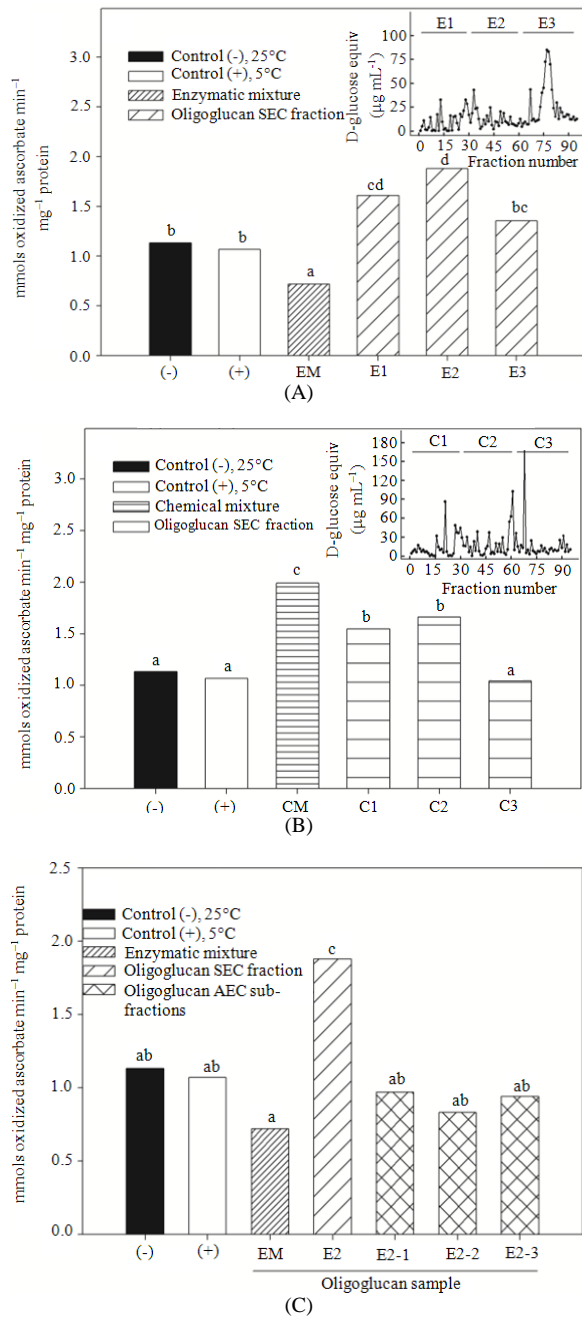


Fig. 3: Changes in APX activity in cold-stressed cotyledons elicited with enzymatic (A) and chemical (B) oligoglucan mixtures. Both mixtures include their respective SEC fractions and their AEC sub-fractions (only C). Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between values. Controls (-, +) correspond to non-elicited plants. Inserts represent D-glucose contents from pooled enzymatic or chemical SEC fractions (A and B)

Changes in APX activity: The CM was the most effective treatment for triggering APX activity in cold-stressed cotyledons (Fig. 3B), whereas EM-elicited cotyledons showed the least APX activity level (36% less than control cotyledons). Several fractions from chemical and enzymatic OG SEC displayed the ability to trigger APX activity when applied to cold-stressed cotyledons. All of the enzymatic SEC fractions induced increments in APX activity with respect to control cotyledons ($p \leq 0.05$) mainly the E2 fraction (7% more than controls) followed by E1 and E3 (Fig. 3A). Only the C1 and C2 fractions induced increments with APX activity above control cotyledons but below the APX activity level triggered by CM (Fig. 3B). Due to the high induction of APX activity achieved by fraction E2, this fraction was further purified by AEC; sub-fractions E2-1, E2-2 and E2-3 were obtained and applied to cold-stressed cotyledons. No increase in APX activity was detected by effects of these enzymatic AEC sub-fractions (Fig. 3C).

Changes in CAT activity: The chemical OG mixture (CM) was more effective than EM for CAT activity enhancement in cold-stressed zucchini cotyledons (Fig. 4B). No apparent enhancing effect was attributed to EM, but when enzymatic SEC fractions were tested in cold-stressed cotyledons, these tissues showed high CAT activity levels. The main triggering effect was attributed to E1 (55.6% more than controls) followed by the E3 fraction (Fig. 4A). The E1 fraction was subjected to fractionation using AEC and then E1 sub-fractions were applied to cold-stressed cotyledons. The CAT activity levels were above control cotyledons and the greatest effect was achieved by the E1-1 sub-fraction (119% more than control plants, $p \leq 0.05$) followed by E1-2 and E1-3 (Fig. 4C). The same pattern was obtained in the CAT activity by the E3 sub-fractions (data not shown). In spite of the fact that CM was the most powerful OG mixture for triggering CAT activity, when this mixture was fractionated using SEC, no elicitor activity was detected by these chemical fractions. In contrast, when the chemical AEC sub-fractions were tested, the highest CAT activity level (120% more than control plants) was reached by the C3-1 OG sub-fraction (Fig. 4D).

DISCUSSION

World-crop production has been constantly influenced by detrimental effects of low temperature; this situation has been considered a serious problem because crop yields fell around fifty percent for several crops (Wahid *et al.*, 2007).

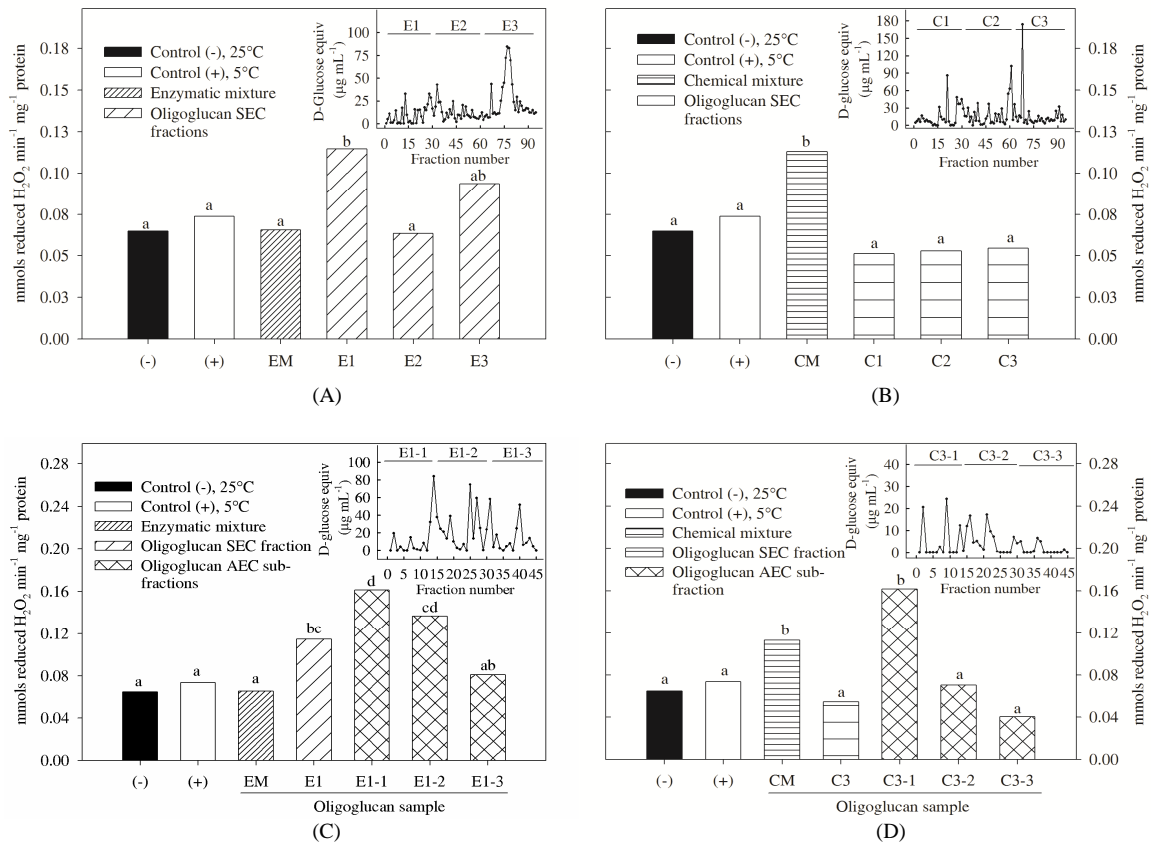


Fig. 4: Changes in CAT activity in cold-stressed cotyledons elicited with enzymatic (A) and chemical (B) oligoglucan mixtures. Both mixtures include their respective SEC fractions and their AEC sub-fractions (only C and D). Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between values. Controls (-, +) correspond to non-elicited plants. Inserts represent D-glucose contents from pooled enzymatic or chemical SEC fractions (A and B) or AEC sub-fractions (C and D)

Important physiologic and metabolic plant processes are interrupted by cold-stressed conditions. Protein aggregation and denaturalization in chloroplasts and mitochondria, destruction of membrane lipids, production of toxic compounds and ROS overproduction (Howarth, 2005) are the most common responses of plant cells as a consequence of this type of thermal stress.

Zucchini cotyledons were subjected to cold-stressed treatment (5°C) to evaluate changes in the activity of antioxidant enzymes, such as SOD, APX and CAT, using fungal OG isolated by chemical or enzymatic hydrolysis from *T. harzianum* cell-walls. The IL and H₂O₂ production were the parameters used to indicate the level of damage in zucchini squash seedlings. When seedlings that had been cold-stressed at least for 7 day were brought to 25°C, cellular homeostasis recovery was observed as indicated by a

decrease in an IL and H₂O₂ production. When seedlings were cold-stressed for longer than 7 day, the plasma membrane integrity, measured as IL, decayed severely and there was no cellular recovery. Values of IL above 50 % reflect serious membrane damage in cold-stressed cucumber fruit (4°C, 7 day) (Deell *et al.*, 2000). At this level of membrane damage, important biochemical functions, such as the electron transport chain, the fixing of CO₂ or the electrolyte exchange between sub-cellular compartments, are irreversibly affected. Cold-stressed zucchini cotyledons showed an excessive IL value when stress exceeded 7 day.

Overproduction of ROS is an evident consequence of cold-stressed plants because the internal membrane damage directly affects mitochondrial respiratory activity and chloroplast CO₂ fixing is reduced (Esfandiari *et al.*, 2007). Indeed, H₂O₂ levels in cold-stressed zucchini cotyledons increased significantly

after 7 d. This result reveals a typical response of low temperature treatments in stressed plants, such as cucumber, maize (Dat *et al.*, 2000) and Gramineae grasses (Al-Taisan, 2010). Zucchini cotyledons showed a linear correlation between H₂O₂ accumulation and membrane damage measured as IL, contrary to the same parameters evaluated in barley plants infected with powdery mildew (Harrach *et al.*, 2008). Even when biotic stress induced by phytopathogens varies in length and intensity, abiotic stress, such as low temperature, results in similar intracellular damage. Disturbances between environmental conditions and plant fitness are uncontrollable consequences that appear under field conditions and it has been one of the reasons for the plant vulnerability to extreme temperatures and crop yields reduction. The recovery of health using a fungal OG application could be achieved by triggering plant defense responses, which would avoid important economic and agricultural losses.

Once the low temperature conditions in zucchini cotyledons were established, different OG samples were applied for triggering enzymatic antioxidant activity. With respect to changes in enzymatic activities, cold-stressed condition by itself reduced SOD activity in zucchini cotyledons. Similar results in SOD activity have been previously reported in several cold-stressed rice lines (Rozkowicz *et al.*, 2003). However, cold-stressed pre-flowering tobacco cv. "Petit Havana" plants (5°C for 4 day) showed an unaltered SOD activity level (Gechev *et al.*, 2003). Increments in SOD activity levels were found in cold-stressed barley seedlings (2°C for 1 day) (Radyuk *et al.*, 2009). Contrary to these contrasting results, under our experimental conditions, the low SOD activity level in cold-stressed zucchini cotyledons was reverted by application of OG mixtures, suggesting that the antioxidant system in cold-stressed zucchini cotyledons could be reinforced. These elicitors could have been recognized by non-specific OG receptors due to their complex chemical and structural composition, affecting the SOD activity. However, when the OG mixtures were subjected to SEC or AEC, no triggering was detected in cold-stressed cotyledons. We expected that the more purified the OG samples, the stronger the biological responses, but this was not observed regarding SOD activity. A different response was observed with the enzymes that detoxify H₂O₂ in cold-stressed zucchini cotyledons. These results showed a selective biological response to fungal OG derived from *T. harzianum* cell-walls.

Contrary to the effect on SOD activity, no changes in APX were detected in cold-stressed cotyledons, which is in accordance with the APX

activity level in cold-stressed pre-flowering tobacco plants (Gechev *et al.*, 2003). However, the fungal OG mixtures evaluated in this work display a well-differentiated effect in cold-stressed cotyledons. Clear differences between enzymatic and chemical OG mixtures (see inserts in Fig. 3A and B) may affect the recognizing process by zucchini cotyledons and, thus, display different APX activity levels. Some of the induced effects found in these experiments are an initial step in determining the complex role that these fungal elicitors play in up- or down-regulating the enzymatic antioxidant system activity in plants. First, differences in the effects of the fungal OG mixtures were evident under cold-stressed conditions. Moreover, significantly enhancements of APX and CAT activity levels were obtained by applying CM. These responses could be attributed to structural differences between *T. harzianum* OG mixtures and their accurate biological recognition by the host cell (Shinya *et al.*, 2006, Falcón-Rodríguez *et al.*, 2009). Because the isolation procedure for both CM and EC were performed using a random or site-specific β-1,3 and β-1,6 degradation of *T. harzianum* cell-wall, respectively, the remaining OG had different structural and chemical characteristics that greatly influence their possible biological recognition and activity (Mithofer *et al.*, 2001). In cold-stressed zucchini cotyledons, both chemical and enzymatic OG SEC fractions triggered APX activity. An elicitor isolated from the cell-walls of *Fusarium* spp. up-regulated the gene expression of several antioxidant enzymes in an *Arabidopsis thaliana* suspension cell culture (Chivasa *et al.*, 2006), but many APX genes were simultaneously down-regulated. This fact is in disagreement with the global effects induced by *T. harzianum* OG in zucchini cotyledons, where both CAT and APX activity levels increased.

The most conclusive fact that OG mixtures have significant effects on the enhancement of the antioxidant system of cold-stressed zucchini cotyledons is the high CAT activity levels, similar to the effect in the enhancement of APX activity. A similar tendency was found in cold-stressed barley seedlings (Radyuk *et al.*, 2009). Significant increments of CAT activity were obtained with E1 and E3 OG SEC fractions, which could be helpful to the plant antioxidant enzymatic system when dealing with unfavorable environmental conditions. The recognition of specific structural carbohydrates from these SEC fractions and AEC sub-fractions showed that OG with different molecular weights have the ability to increase CAT activity significantly (see inserts in Fig. 4). Biosynthesis of CAT is inhibited by cold stress (Hertwig *et al.*, 1992); however, the fungal elicitors evaluated herein restored the CAT enzymatic levels in cold-stressed cotyledons.

The limited reports about the OG receptors, mainly involving soybean tissues, indicate that these elicitors are recognized by putative fungal glucan binding proteins anchored in the plasmatic membranes. In fact, the high specificity of these putative receptors reached nanomolar levels even when synthetic OG were evaluated (Fliegmann *et al.*, 2005). A few reports reveal that the most used fungal OG from *Phytophthora* spp., have direct effects on the antioxidant system of potato (Mizuno *et al.*, 2005) and soybean plants and cell cultures (Mithofer *et al.*, 2001). The differential effects found between these antioxidant enzymatic activities may be due to differential and specific recognition capabilities of OG putative receptors (Shinya *et al.*, 2006). The efficiency in biological recognition by specific membrane receptor could be affected by the structural and chemical composition of the fungal OG as a result of their isolation procedure.

In spite of the broad range of elicitation ability from different OG or even other types of oligosaccharides, there is not a rule that the same biological activity will be displayed upon different testing conditions in a selected model plant or tissues, such as suspension cell cultures, leaves, roots, seeds or fruits. Under stress conditions, squash seedlings must deal with the overproduction of ROS. The excessive accumulation of ROS could be the reason for transient inhibition of scavenging enzymes such as SOD. In cold-stressed zucchini cotyledons, peroxide production still continues along with other ROS enzymatic sources, such as NADPH oxidases, amino oxidase and flavin oxidases (De Gara *et al.*, 2003).

CONCLUSION

The oxidative stress caused by ROS overproduction can be counteracted by triggering APX and CAT enzymatic activities in cold-stressed zucchini cotyledons, mediated by *T. harzianum* OG exogenous elicitation. It would be of great interest to investigate whether chemical and structural properties of these OG modify the antioxidant system activity in stressed plants. The results of this study could have important implications in restoring the adverse environmental effects in plants during their development, especially under non-controlled low temperatures.

ACKNOWLEDGMENT

Abel Ceron-García thanks the fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). The authors would like to thank Olivia Briceño-Torres, Francisco Soto-Cordova and Socorro Vallejo-Cohen for technical assistance. We also thank Emmanuel Aispuro-Hernández for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. Method. Enzymol., 105: 121-126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Al-Taisan, W.A., 2010. Comparative Effects of Drought and Salt Stress on Germination and Seedling Growth of *Pennisetum divisum* (Gmel.) Henr. Am. J. Applied Sci., 7: 640-646. DOI: 10.3844/2010.640.646
- Bailey, R.W., 1958. The reaction of pentoses with anthone. Biochem. J., 68: 669-672. PMID: 13522678.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye. Anal. Biochem., 72: 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cervilla, L.M., B. Blasco, J.J. Ríos, L. Romero and J.M. Ruiz, 2007. Oxidative stress and antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to boron toxicity. Ann. bot., 100: 747-756. DOI: 10.1093/aob/mcm156
- Chivasa, S., J.M. Hamilton, R.S. Pringle, B.K. Ndimba and W.J. Simon *et al.*, 2006. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated arabidopsis cell cultures. J. Exp. Bot., 57: 1553-1562. DOI: 10.1093/jxb/erj149
- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranova, M.V. Montagu, D. Inze and F.V. Breusegem, 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cel. Mol. Life Sci., 57: 779-95. DOI: 10.1007/s000180050041
- De Gara, L., M.C. Pinto and F. Tommasi, 2003. The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interactions. Plant physiol. Biochem., 41: 863-870. DOI: 10.1016/S0981-9428(03)00135-9
- Deell, J.R., C. Vigneault and S. Lemerre, 2000. Water temperature for hydrocooling field cucumbers in relation to chilling injury during storage. Postharvest Biol. Tech., 18: 27-32. DOI: 10.1016/S0925-5214(99)00057-5
- Del Río, L.A., L.M. Sandalio, F.J. Corpas, J.M. Palma and J.B. Barroso, 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging and role in cell signaling. Plant physiol., 141: 330-335. DOI: 10.1104/pp.106.078204

- Esfandiari, E., M.R. Shakiba, S.A. Mahboob, H. Alyari and M. Toorchi, 2007. Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. *J. Food Agric. Environ.*, 5: 149-153. <http://www.world-food.net/scientificjournal/2007/issue1/pdf/agriculture/a5.pdf>
- Falcón-Rodríguez, A.B., J.C. Cabrera, E. Ortega and M.A. Martínez-Téllez, 2009. Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defense responses in roots and leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, 4: 192-200. DOI: 10.3844/ajabssp.2009.192.200
- Fliegmann, J., E. Montel, A. Djulic, S. Cottaz, H. Driguez and J. Ebel, 2005. Catalytic properties of the bifunctional soybean β -glucan-binding protein, a member of family 81 glycoside hydrolases. *FEBS Lett.*, 579: 6647-6652. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.10.060
- Friedman, H. and I. Rot, 2006. Characterization of chilling injury in heliotropium arborescens and lantana camera cuttings. *Postharvest Biol. Tech.*, 40: 244-249. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2005.12.020
- Gechev, T., H. Willekens, M.V. Montagu, D. Inze and W.V. Camp *et al.*, 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J. Plant Physiol.*, 160: 509-515. DOI: 10.1078/0176-1617-00753
- Halliwell, B., R. Species and Antioxidants., 2006. Redox biology in fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, 141: 312-322. DOI: 10.1104/pp.106.077073
- Harrach, B.D., J. Fodor, M. Pogány, J. Preuss and B. Barna, 2008. Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *Eur. J. Plant Pathol.*, 121: 21-33. DOI: 10.1007/s10658-007-9236
- Hertwig, B., P. Streb and J. Feierabend, 1992. Light dependence of cat synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.*, 100: 1547-1553. PMID: PMC1075818
- Howarth, C.J., 2005. Genetic Improvements of Tolerance to High Temperature. In: *Abiotic stresses: Plant resistance through breeding and molecular approaches*, Ashraf, M. and P.J.C. Harris (Eds.). Howarth Press Inc., New York, ISBN: 1-56022-965-9, pp: 725.
- Islas-Osuna, M.A., N.A. Stephens-Camacho, C.A. Contreras-Vergara, M. Rivera Dominguez, E. Sanchez Sanchez, M.A. Villegas-Ochoa and G.A. Gonzalez Aguilar, 2010. Novel postharvest treatment reduces ascorbic acid losses in mango (*Mangifera indica* L.) Var. Kent. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, 5: 342-349. DOI: 10.3844/ajabssp.2010.342.349
- Mithofer, A., J. Fliegmann, A. Daxberger, C. Ebel and G. Neuhaus-Url *et al.*, 2001. Induction of H₂O₂ synthesis by β -glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. *FEBS Lett.*, 508: 191-195. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)03054-X
- Mizuno, M., Y. Tada, K. Uchii, S. Kawakami and S. Mayama, 2005. Catalase and alternative oxidase cooperatively regulate programmed cell death induced by β -glucan elicitor in potato suspension cultures. *Planta*, 220: 849-853. DOI: 10.1007/s00425-004-1402-7
- Nakano, Y. and K. Asada, 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts, its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant cell Physiol.*, 28: 131-140. ISSN: 0032-0781. <http://pcp.oxfordjournals.org/content/28/1/131.abstract>
- Nita-Lazar, M., A. Heyraud, C. Gey, I. Braccini and Y. Lienart, 2004. Novel oligosaccharides isolated from fusarium oxysporum L. Rapidly induce pal activity in rubus cells. *Acta Biochim. Pol.*, 51: 625-634. PMID: 15448725
- Okinaka, Y., K. Mimori, K. Takeo, S. Kitamura and Y. Takeuchi *et al.*, 1995. A structural model for the mechanisms of Elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. *Plant Physiol.* 109: 839-845. PMID: 8552716
- Quan, L.J., B. Zhang, W.W. Shi and H.Y. Li, 2008. Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* 50: 2-18. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x
- Radyuk, M.S., I.N. Domanskaya, R.A. Shcherbakov and N.V. Shalygo, 2009. Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of antioxidant enzymes in green barley leaves. *Russ. J. Plant Physiol.*, 56: 175-180. DOI: 10.1134/S1021443709020058
- Rozkowicz, A., A.M. Picco, M. Rodolfi, S. Pinamonti and G. Forlani, 2003. Differential responses *in vitro* of rice cultivars to italian lineages of the blast pathogen *Pyricularia grisea* (Cooke) sacc. 1. Oxidative burst. *J. Plant Physiol.*, 160: 1033-1040. DOI: 10.1078/0176-1617-00941

- Shinya, T., R. Menard, I. Kozone, H. Matsuoka and N. Shibuya *et al.*, 2006. Novel β -1,3-, 1,6-oligoglucan elicitor from *alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco. *FEBS J.*, 273: 2421-2431. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05249.x
- Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf and M.R. Foolad, 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.*, 61: 199-223. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2007.05.011
- Wu, T., J. Cao and Y. Zhang, 2008. Comparison of antioxidant activities and endogenous hormone levels between bush and vine-type tropical pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchense). *Sci. Hortic.*, 116: 27-33. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.04.002
- Zheng, Y., R.W.M. Fung, S.Y. Wang and C.Y. Wang, 2008. Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to superatmospheric oxygen. *Postharvest Biol. Tech.*, 47: 151-158. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2007.06.016