

Rev. Colomb. Quím., 2009, 38(1):25-42

INDUCCIÓN DE ACTIVIDAD PEROXIDASA Y DE FENOLES TOTALES COMO RESPUESTA DEL FRUTO DE LULO (*Solanum quitoense* L.) AL PATÓGENO CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS

INDUCTION OF PEROXIDASE AND TOTAL PHENOLS AS A RESPONSE OF LULO (*Solanum quitoense* L.) FRUIT TO PATHOGEN CAUSING ANTHRACNOSE

INDUÇÃO DA ACTIVIDADE PEROXIDASA E FENÓIS TOTAIS COMO RESPOSTA DO FRUTO DE LULO (*Solanum quitoense* L.) AO PATÓGENO QUE CAUSA ANTRACNOSE

Obradith Caicedo, Blanca L. Higuera¹, Sixta Martínez

Recibido: 14/10/08 – Aceptado: 04/03/09

RESUMEN

Se evaluó la inducción de peroxidasa en frutos de lulo con el fin de determinar su participación en las respuestas bioquímicas hacia el patógeno *Colletotrichum acutatum*, causante de la antracnosis. Se establecieron como mejores condiciones para su extracción y para determinación de la actividad: buffer fosfatos 100 mM pH 7, 1% SDS y 1% PVPP; sustrato guayacol 15 mM, peróxido de hidrógeno 10 mM, pH 6,5, 55 °C y 30 μ L de extracto. Se realizó un ensayo *in vivo* usando frutos verdes, pintones y maduros, inoculados con el hongo o con agua estéril. Se determinó la actividad peroxidasa a diferentes horas a partir de la inoculación, encontrándose una respuesta diferencial con el tiempo por efecto de la presencia del patógeno, y según el estado de madurez de

los frutos. En lulos verdes inoculados con el hongo se observó aumento en la actividad al cabo de 6 y 144 horas. En lulos pintones no se observó efecto notable, mientras que en maduros el aumento en actividad fue prácticamente a todos los tiempos. Los resultados del contenido de fenoles totales mostraron que hubo acumulación a 96 y 144 horas por efecto del patógeno, para lulos en estado verde y maduro, mientras que para pintones, en los que se presentaron más rápido y con mayor severidad los síntomas de la antracnosis, no se observó aumento a ninguno de los tiempos. En los frutos más enfermos, el cambio en actividad peroxidasa y en contenido total de fenoles fue menos evidente, por lo que se sugiere una relación inversa de estos con el desarrollo de la antracnosis.

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá, Colombia. blhiguerad@unal.edu.co

Palabras clave: lulo, *Colletotrichum acutatum*, peroxidasa, fenóles, defensa vegetal, *Solanum quitoense*.

ABSTRACT

The induction of peroxidase in lulo fruits was evaluated in order to determine its participation in the biochemical responses towards the pathogen *Colletotrichum acutatum*, which causes the antrachnosis disease. For extraction and activity determination, these conditions were established as the best: buffer phosphates 100 mM pH 7, 1% SDS y 1% PVPP; substrate guaiacol 15 mM, hydrogen peroxide 10 mM, pH 6,5, 55 °C and 30 μ L of the extract. An *in vivo* test was developed using unripe, semi-ripe and ripe fruits, inoculated with the fungus or sterile water. The peroxidase activity was measured at different hours starting from the inoculation, finding a time differential response caused by the pathogen presence and according to the maturity state of fruits; in unripe lulo fruits inoculated with the fungus, an increase of the activity was observed after 6 and 144 hours. In semi-ripe fruits no considerable effect was seen, while in ripe fruits the increase of the activity was found practically at all times. The results of the measured total phenol content, showed accumulation at 96 and 144 hours as a result of the pathogen presence in unripe and ripe fruits, while for semi-ripe fruits, in which the antrachnosis symptoms were noticed faster and more severely, no phenol increase was found at any time. The less evident changes seen in peroxidase and phenol content, using severely affected fruits by the disease, suggest an inverse relationship

between these parameters and the development of the antrachnosis.

Key words: lulo, *Colletotrichum acutatum*, peroxidase, phenolics, *Solanum quitoense*, plant defence.

RESUMO

A indução da peroxidasa foi avaliada na casca de frutos de lulo com a finalidade de determinar a sua possível participação em reacções de defesa contra o patógeno *Colletotrichum acutatum*, causador da doença antracnose. Foram estabelecidas as melhores condições para a sua extracção e para medir a actividade da enzima extraída, encontrando-se que com tampão fosfato 100 mM pH 7, 1% SDS y 1% PVPP, substrato guaicol 15 mM, peróxido de hidrogeno 10 mM, pH 6,5, 55 °C y 30 μ L de extracto enzimático se conseguiram as actividades enzimáticas mais elevadas. Foi realizado um ensaio *in vivo* usando frutos verdes, em processo de maturação e maduros, inoculados com o fungo ou com água estéril. A actividade peroxidasa foi determinada a diferentes horas a partir da inoculação encontrando-se uma resposta diferencial com o tempo pelo efeito da presença ao patógeno e de acordo ao estado de madurez dos frutos. Em lulos verdes observou-se um aumento da actividade nos frutos inoculados com o fungo ao fim de 6 e 144 horas. Em lulos em processo de maturação, o patógeno não teve maior efeito, enquanto que em lulos maduros o aumento na actividade da enzima, como resposta à presença do patógeno, foi praticamente a todos os tempos avaliados. Os resultados do conteúdo de fenóis totais mostraram que houve uma acumulação significativa a 96 e 144 horas por efeito da inoculação com o

patógeno para lulos em estado verde e maduro, enquanto que para os lulos em processo de maturação, nos quais se apresentaram mais rápido e com maior severidade os sintomas de antracnose, não se observou aumento em nenhum dos tempo avaliados. Nos frutos mais afectados pelos sintomas, a mudança na actividade POD e no conteúdo total de fenóis foi menos evidente, motivo pelo qual se sugere uma relação inversa de estes com o desenvolvimento de antracnose.

Palavras-chave: lulo, *Colletotrichum acutatum*, peroxidasa, fenóis, defesa vegetal, *Solanum quitoense*.

INTRODUCCIÓN

Colletotrichum es un género de hongos responsable de la enfermedad conocida como antracnosis, la cual constituye uno de los problemas más significativos para los agricultores y consumidores. Las antracnosis causadas por *Colletotrichum* son devastadoras y destruyen los alimentos muy rápidamente, antes de que los consumidores puedan usarlos. Unas pocas especies de *Colletotrichum* atacan buena parte de los cultivos tropicales y subtropicales, y causan grandes pérdidas por daño principalmente en los frutos. La enfermedad se presenta tanto sobre tejidos y órganos de las plantas en desarrollo, como en las etapas de precosecha y poscosecha. En estudios realizados por el SENA y la Universidad Nacional de Colombia (1), se postula que la antracnosis es la enfermedad más limitante durante la etapa de poscosecha en frutos. El lulo (*Solanum quitoense* Lam.), considerado uno de los frutos promisorios para el mercado internacional, es uno de los productos atacados por esta enfermedad, la cual se manifiesta con una mancha

circular, de apariencia húmeda y color negro, que aumenta hasta cubrir gran cantidad del fruto, formando depresiones que posteriormente se cubren de una masa de conidias color salmón (2). En investigaciones recientes (3) se logró establecer que en el fruto de lulo la especie causal de la enfermedad antracnosis es *Colletotrichum acutatum*.

Para defenderse de los patógenos, las plantas están equipadas con una serie de mecanismos de resistencia, entre los cuales están diversos arreglos metabólicos que se desencadenan una vez el patógeno entra en contacto con la planta. En algunos modelos de interacción hospedero-patógeno se ha demostrado el papel de enzimas como peroxidasas, polifenoloxidasas y glucanasas. Las peroxidasas (E.C. 1.11.1.7) no presentan por lo general actividad anti-fúngica por sí mismas, pero están involucradas en respuesta a enfermedades porque catalizan, entre otras, la oxidación de fenólicos para la formación de lignina. Estas enzimas se involucran además en reacciones oxidativas de la superficie celular como generadoras de radicales libres y peróxido de hidrógeno, los cuales son tóxicos para muchos organismos, y por ende, desempeñan una función importante en defensa vegetal.

Algunos modelos de interacción hospedero-patógeno han aportado evidencias del papel de la enzima peroxidasa como parte de los mecanismos de defensa. En estudios realizados en manzanas se encontró que el aumento en su actividad es un factor especialmente importante a través de la lignificación, la cual está relacionada con la resistencia del fruto frente a la infección con *Penicillium expansum* (4). Así mismo, se ha encontrado que al-

gunas isoenzimas de peroxidasa están involucradas en defensa en el modelo papa-*Pectobacterium chrysanthemi* (5).

Aunque hay diversos reportes de interacciones hospedero-patógeno en los que enzimas del tipo peroxidasa han estado involucradas como posible mecanismo de defensa, hasta la fecha no existen reportes conocidos de estudios en el modelo lulo (*Solanum quitoense* Lam)- *Colletotrichum acutatum*, que permitan aportar al conocimiento de esta interacción particular. Elucidar los mecanismos bioquímicos en la interacción hospedero-patógeno contribuye al entendimiento de cómo la planta responde a la presencia del hongo, información básica para llegar a manejar la enfermedad antracnosis, limitante en este y otros cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inóculo y material vegetal

Se utilizó un aislamiento del hongo *Colletotrichum acutatum* (*C. acutatum*) proporcionado por el Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, el cual fue sembrado en medio PDA (papa, dextrosa, agar). El inóculo se preparó a partir de dicho aislamiento, transfiriendo parte del micelio a medio líquido papa-dextrosa y manteniéndolo por 7 días a 17 °C con agitación (80 rpm) en la oscuridad. Posteriormente se filtró el micelio a través de gasa estéril y se preparó una suspensión de aproximadamente 1×10^6 conidias/mL. El material vegetal consistió en frutos de lulo (*Solanum quitoense*) variedad *quitoense*, recolectados en tres estados de madurez (verde, pintón y maduro, clasificados según su índice de madurez), provenientes todos de una finca

semi-tecnificada ubicada en el municipio de Junín (Cundinamarca), situado a 2.300 msnm y con temperatura promedio de 17 °C. Una muestra del material vegetal usado fue remitida al Instituto de Ciencias Naturales para su clasificación, y reposa bajo el No. COL 513823.

Selección de las condiciones adecuadas para la extracción de la enzima peroxidasa (E. C. 1.11.1.7)

Se planteó un diseño experimental cuadrado latino con el fin de seleccionar un sistema de buffer adecuado para la extracción de peroxidasa a partir de corteza de frutos de lulo (6). Tomando como base preliminar lo reportado por Cortés (7), se evaluaron nueve sistemas buffer, los cuales presentaron la composición que se muestra en la Tabla 1. La muestra consistió en 500 mg de corteza de lulo, la cual se maceró en presencia de nitrógeno líquido, seguido de tres lavados, cada uno con 3 mL, de acetona fría (4 °C). Las muestras fueron cada vez centrifugadas por 10 min (10000 x g). Sobre el *pellet* obtenido se evaluaron las diferentes soluciones de extracción. A los extractos crudos obtenidos se les midió la actividad peroxidasa con el fin de establecer el buffer con el cual se logra la mayor actividad enzimática.

Selección de los parámetros adecuados para la medida de actividad enzimática peroxidasa

Como parámetros para la medida de actividad se evaluaron: pH (6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0); temperatura (25, 35, 45, 55, 65 y 70 °C); concentración de guayacol (3,5, 10, 15, 25 y 40 mM); concentración de peróxido de hidrógeno (8, 9, 10 y 12 mM) y volumen de extracto enzimático

Tabla 1. Características de los nueve sistemas evaluados para establecer las condiciones de extracción de peroxidasa a partir de corteza de lulo. Buffer base: fosfatos de sodio 100 mM pH 7

Buffer*	Tiempo de agitación (min)	% SDS	% PVPP
1	90	0,2	1
2	60	0,2	3
3	30	0,2	6
4	30	1	1
5	90	1	3
6	60	1	6
7	60	2	1
8	30	2	3
9	90	2	6

* Para cada sistema evaluado se contó con nueve determinaciones.

crudo (10, 15, 20 y 30 μL), teniendo en cuenta lo reportado por Cortés (7). La mezcla de reacción estuvo constituida por buffer fosfatos 100 mM, guayacol, H_2O_2 y extracto enzimático, según valores por evaluar. La actividad enzimática se midió realizando un seguimiento espectrofotométrico (Genesys UV 10[®]) a 470 nm durante 2 min y se expresó como actividad específica ($\Delta A_{470\text{nm}}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de proteína). Los parámetros se evaluaron siguiendo un diseño experimental escalonado, es decir, que al evaluar una de las variables, las demás permanecieron constantes. Una vez se estableció cada variable, este valor se utilizó para estudiar el siguiente parámetro. Para cada condición experimental se contó con nueve determinaciones.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La cuantificación de proteína en los extractos enzimáticos crudos se realizó por

el método de Lowry (8). Se utilizó albúmina bovina sérica (BSA) como patrón, y cada determinación se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

Los análisis realizados a lo largo de la investigación contaron con nueve determinaciones para cada muestra. Los resultados obtenidos se analizaron usando análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de rango múltiple ($\alpha = 0,05$), usando el programa StatGraphics plus 5.1[®].

Ensayo *in vivo* para establecer el comportamiento de la enzima peroxidasa por efecto de la inoculación con el patógeno *C. acutatum*

Los lulos utilizados para el ensayo *in vivo* fueron clasificados teniendo en cuenta como criterio de madurez la relación °Brix/acidez titulable (índice de madu-

rez, IM). Los valores IM para clasificarlos como verde, pintón y maduro en esta investigación fueron 1,44, 2,83 y 3,02, respectivamente. Una vez clasificados, se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (1%) y se enjuagaron con agua estéril. Posteriormente se separaron al azar en tres grupos o tratamientos. El primer grupo, denominado control, se almacenó sin ningún otro tratamiento. El segundo grupo, denominado testigo, consistió en lulos a los que se les realizó una pequeña incisión (1 cm) con bisturí en forma de cruz en dos lados opuestos y se inocularon con 15 μ L de agua estéril, y el tercer grupo fue denominado frutos inoculados, a los cuales se les realizó herida igual a los testigos pero se inocularon con 15 μ L de la suspensión del hongo. Una vez inoculados, se almacenaron en frascos de vidrio provistos con una servilleta humedecida con agua (todo el sistema previamente esterilizado) con el fin de mantener una adecuada humedad relativa. Se taparon con vinilpel® y se almacenaron en las mismas condiciones de temperatura (ambiente) y luz (día/noche). Se realizaron muestreos de todos los tratamientos al inicio y a las 6, 12, 24, 30, 36, 48, 72, 96 y 144 horas, tomando al azar tres frutos por cada tratamiento y por cada estado de madurez, a los que se retiró la corteza en el área de inoculación (cuadrado de 1 cm de lado). Sobre estas muestras se realizó la extracción y determinación de actividad peroxidasa, teniendo en cuenta los parámetros establecidos previamente, y se cuantificó proteína. Durante todo el tiempo de muestreo los frutos fueron observados diariamente para detectar la presencia de algún síntoma visible de la enfermedad antracnosis, y se registró su estado de sanidad general.

Evaluación por electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción específica peroxidasa

Los extractos enzimáticos obtenidos durante el ensayo *in vivo* fueron dializados contra tres cambios de agua desionizada, usando membranas de celulosa (12 kDa). Una vez dializados, se les determinó el contenido de proteína (8). Los extractos seleccionados para los análisis por electroforesis consistieron en muestras en las que se obtuvo inducción de actividad enzimática peroxidasa como consecuencia de la inoculación con *C. acutatum*, así como sus respectivos controles y testigos.

Se realizó electroforesis en condiciones nativas con dichos extractos, empleando un equipo Mini Vertical Gel System EC 120®. Se usaron geles del 12,5% a 150 V. Se aplicaron volúmenes de las muestras tal que correspondieran todos a 25 μ g de proteína. Una vez se sobrepasó el gel de concentración, se aplicó 100 V durante el gel de separación. Los geles fueron luego sometidos a tinción específica para peroxidasa. Para ello se sumergieron en una solución de *o*-dianisidina 1,8 mM y peróxido de hidrógeno al 1,2% preparada en buffer fosfatos 100 mM pH 6,5 hasta que aparecieron las bandas (9). Posteriormente se sumergieron los geles en una solución de ácido acético al 10%.

Determinación del contenido de fenoles totales

Para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, se tomaron 500 mg de las muestras de corteza y se macearon en presencia de nitrógeno líquido. Luego se realizó la extracción por agitación durante 30 s con 3 mL de acetona a 4

°C. Se centrifugó por 10 min (10000 x g) y se retiró el sobrenadante. Este procedimiento se realizó tres veces consecutivas. Los sobrenadantes se reunieron y se almacenaron en frascos ámbar bajo refrigeración (4 °C) para su posterior análisis. La cuantificación se realizó usando el reactivo de Folin-Ciocalteu's (10). Cada extracto se llevó a 10 mL con agua. A partir de esta solución se tomó un volumen de 300 μ L, se le adicionó 200 μ L de carbonato de sodio (22%), 900 μ L de agua y 100 μ L de reactivo, de tal forma que la concentración final fue 0,125N. La mezcla anterior se homogeneizó y se leyó a 500 nm después de 30 min de reacción, usando un equipo Genesys UV-10[®]. Se realizaron curvas de calibración usando ácido gálico como patrón en un intervalo de concentración entre 0 y 25 mg/L. El contenido de fenoles totales se expresó como mg/L de ácido gálico por mg de material vegetal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del buffer adecuado para la extracción de peroxidasa

Los resultados de actividad enzimática específica peroxidasa, obtenidos al evaluar los nueve sistemas de buffer de extracción, se muestran en la Figura 1.

El ANDEVA de los resultados indicó que el sistema No. 4, compuesto por buffer fosfatos 100 mM, pH 7,0, 1% SDS (dodecil sulfato de sodio), 1% PVPP (polivinilpolipirrolidona) y agitación durante 30 min, permitió obtener la mayor actividad. Se pudo establecer que existen diferencias estadísticamente significativas, al nivel de confianza del 95%, entre el buffer No. 4 y los demás sistemas estudiados. Por tanto, se seleccionó este como el más adecuado para la extracción de peroxidasa a partir de corteza del fruto de lulo.

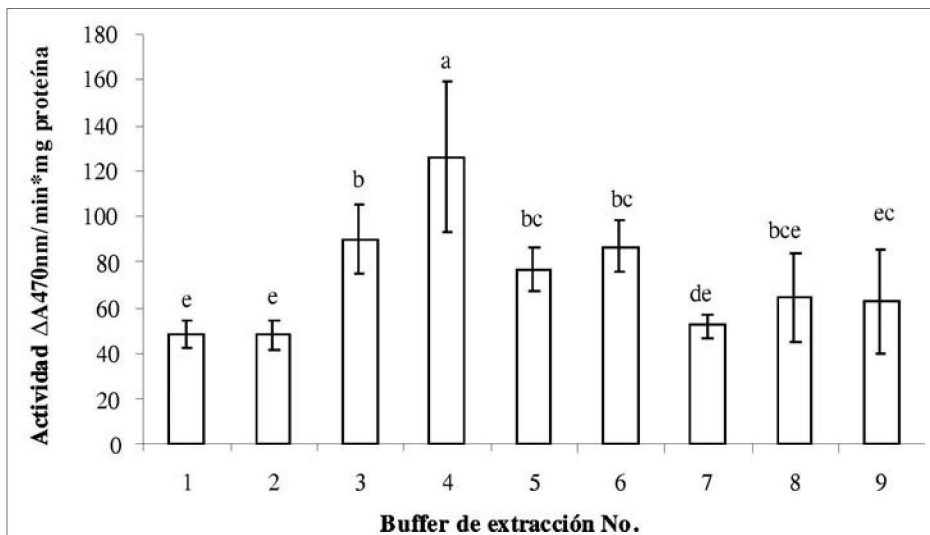


Figura 1. Actividad de peroxidasa en extractos de corteza de lulo obtenidos empleando diferentes sistemas de extracción, descritos según la Tabla 1. Letras distintas indican diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%. Cada valor es el promedio de nueve determinaciones.

Selección de los parámetros adecuados para la medida de actividad enzimática peroxidasa

A partir de las medidas de actividad, obtenidas usando las diferentes condiciones experimentales evaluadas, se realizaron gráficas de tiempo de reacción contra absorbancia y se tomó la pendiente de la curva. Con el dato del contenido de pro-

teína, determinado para cada extracto, se expresó la actividad como actividad específica. En las gráficas de la Figura 2 se presentan los resultados obtenidos para cada parámetro experimental evaluado.

Con base en los resultados obtenidos, y usando ANDEVA para cada grupo de datos, se logró establecer que los parámetros adecuados para la medida de la acti-

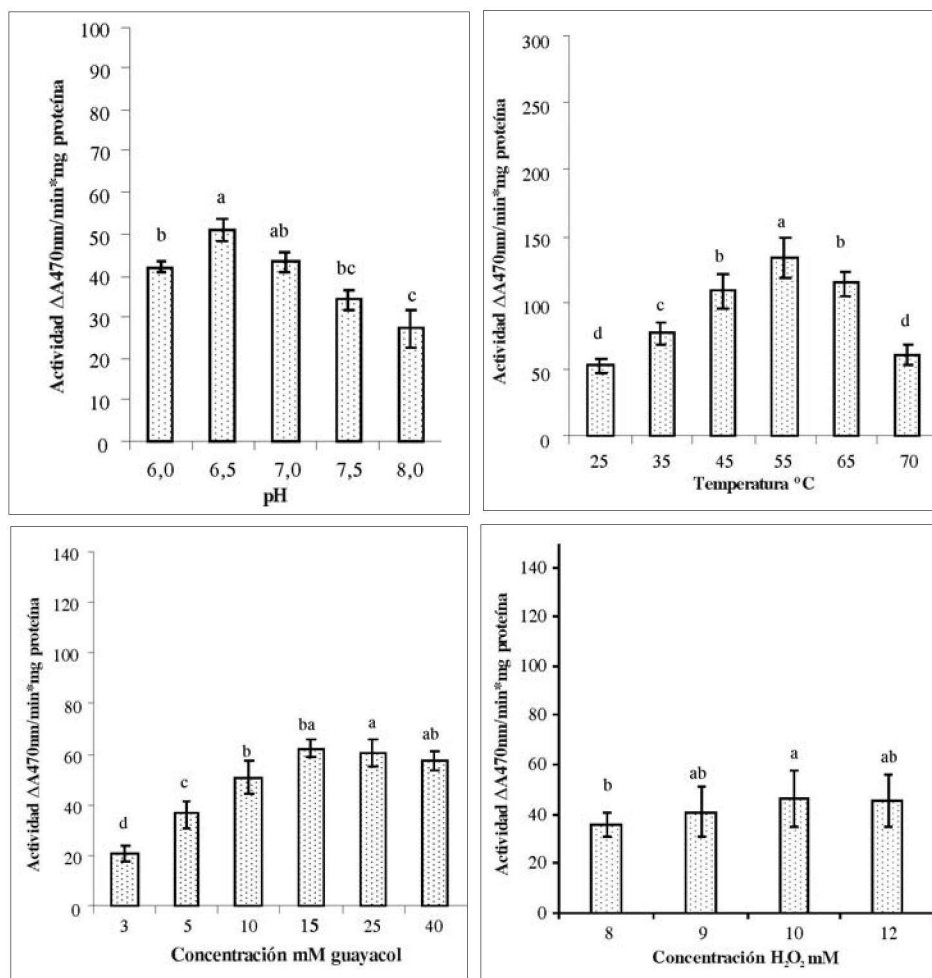


Figura 2. Actividad peroxidasa obtenida de corteza de lulo utilizando diferentes valores de pH, temperatura, concentración de peróxido de hidrógeno y guayacol. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza de 95%. Cada resultado es el promedio de nueve determinaciones.

vidad de la enzima peroxidasa, extraída a partir de corteza de lulo, son: pH 6,5, sustrato guayacol 15 mM, H_2O_2 , 10 mM, y temperatura 55 °C usando 30 μ L de extracto crudo, con los cuales se obtuvieron los mayores valores de actividad específica. Los parámetros obtenidos fueron, en general, similares a los encontrados en estudios previos para lulo en los que el pH fue 6,3 y la temperatura 63 °C (7). Para pepinillo se reportó pH 7 (11) y para pepino pH, entre 5,5 y 7,5 (12). La temperatura óptima tanto en pepino como en pepinillo se determinó en el intervalo de 25 °C a 45 °C.

Estudio *in vivo*: evaluación de síntomas de antracnosis

A los lulos inoculados con el hongo, así como a los lulos testigo y controles, se les realizó un seguimiento diario con el fin de evaluar su estado y la aparición de los síntomas visibles de la enfermedad antracnosis. Los resultados permitieron establecer que los síntomas característicos, tales como mancha necrótica y aparición del micelio algodonoso sobre la zona de inoculación, se presentaron en promedio a las 72 h después de inoculación. Se pudo determinar también que los lulos en estado pintón fueron los más afectados, seguidos por los verdes, mientras que los maduros fueron los menos afectados. Los resultados en cuanto a síntomas de la enfermedad coinciden con lo reportado por Cerón (3), quien encontró que en los pintones la incidencia del hongo *C. acutatum* fue mayor. Ni los frutos control ni los testigos presentaron evidencia alguna de síntomas de la enfermedad durante el tiempo de la evaluación de estos.

Estudio del comportamiento de la enzima peroxidasa en frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam) por efecto de *C. acutatum* durante la interacción fruto-patógeno

En la Figura 3a se observa la variación de actividad de la enzima peroxidasa en extractos crudos obtenidos de lulos en estado verde, como respuesta a la inoculación con *C. acutatum* y su comparación respectiva con los controles. Los resultados mostraron un aumento muy notable a 144 horas, correspondiente a cuatro veces el valor obtenido para el control, inducción que se puede atribuir a la presencia del patógeno, dado que en los inoculados con agua el valor fue considerablemente más bajo, hecho que permite descartar que tal aumento se trate de una respuesta al estrés causado por la herida. Este tipo de comportamiento ha sido demostrado en algunos modelos de interacciones, en los que se ha encontrado aumento significativo de actividad peroxidasa como respuesta del hospedero frente al ataque de un patógeno (4). Dicho aumento se ha correlacionado con frecuencia con el incremento en el contenido de compuestos fenólicos y de lignina, la cual forma parte de la defensa pasiva del hospedero, ya que es un mecanismo mediante el cual se refuerza la pared celular para impedir la invasión del patógeno y que conlleva la intervención de diversas peroxidasas.

También fue obtenido un aumento significativo de actividad por efecto de la presencia del patógeno al tiempo inicial y a 6 h, lo que se constituye en una inducción temprana de la actividad peroxidasa, aunque la magnitud de este aumento no fue tan alta como la obtenida a 144 h en frutos inoculados. Por otro lado, a 36 h y

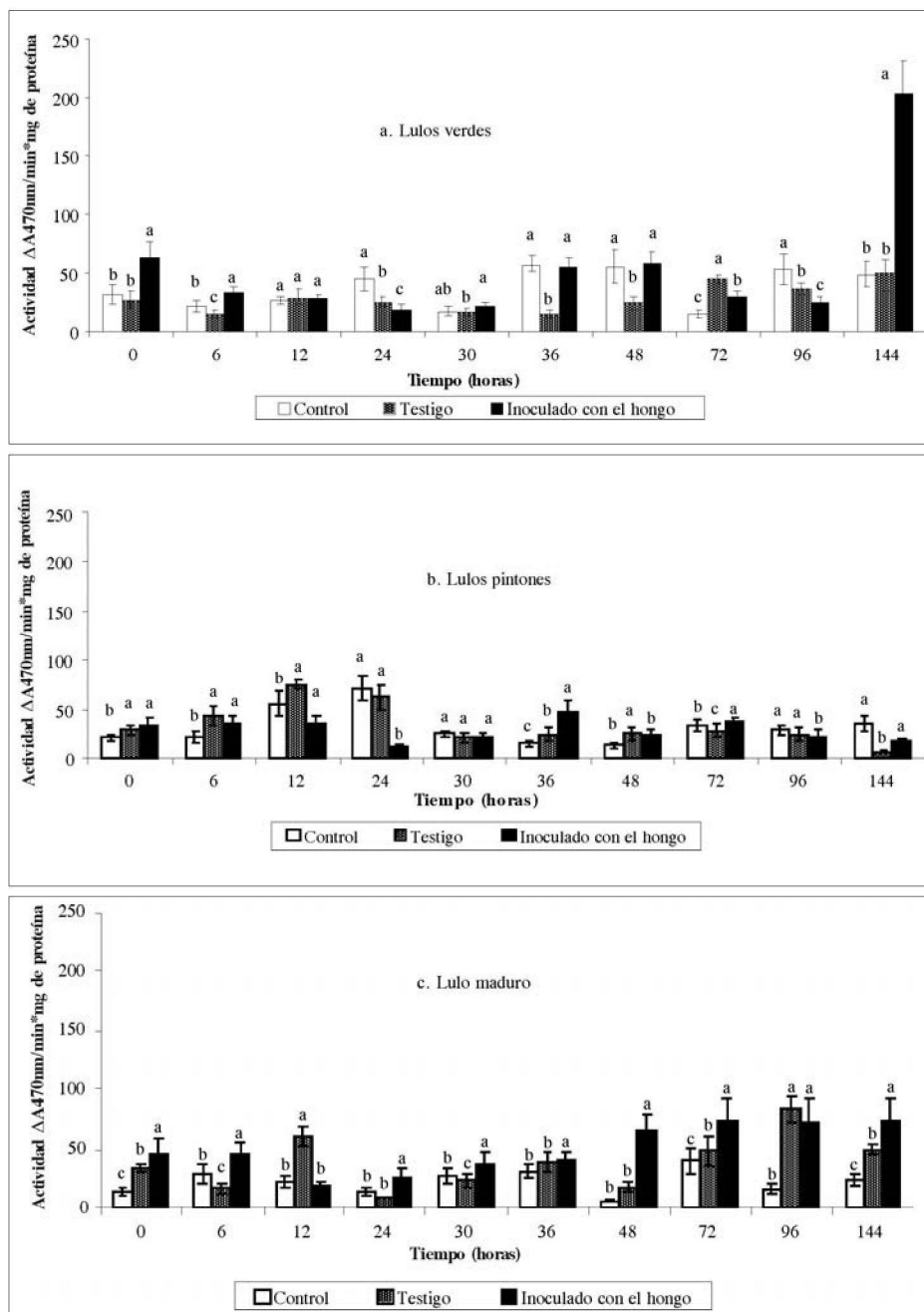


Figura 3. Variación de la actividad peroxidasa en corteza de lulos a. verdes, b. pintones y c. maduros durante el ensayo *in vivo*. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para cada tiempo ($P=0,05$). Cada dato es el promedio de nueve medidas.

48 h también se presentó incremento de la actividad en los frutos inoculados con el hongo. Sin embargo, este aumento es estadísticamente significativo únicamente frente al testigo (inoculado con agua), ya que con respecto al control no existe diferencia alguna. Por ello, el aumento a estos tiempos no se puede correlacionar de manera clara con respuesta al hongo. Las evidencias indican que el fruto verde manifestó un comportamiento diferente ante los distintos tratamientos a los que fue sometido, y es probable que el aumento de actividad observado con el tiempo en los frutos control pueda ser producto del proceso metabólico que continúa desarrollándose, por ejemplo de maduración, tal como se ha reportado en la literatura (7).

En la Figura 3b se observa el comportamiento de la actividad peroxidasa en lulos pintones durante el ensayo *in vivo*. En los lulos testigo e inoculados con el hongo, se evidenció un incremento de la actividad en el tiempo inicial y a 6 h, el cual se puede asociar con una respuesta al estrés producido por la herida. Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en la literatura (13). Se conoce que, como respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés, ya sea biótico o abiótico, se genera acumulación de H_2O_2 , el cual inicia un proceso de señalización que involucra activación de enzimas, expresión de genes, muerte celular programada y daño celular. Para este estado de madurez no se encontraron cambios en la actividad comparables con los que se presentaron para lulos en estado verde a 144 h. En promedio, la inoculación con el patógeno no tuvo mayor efecto en la actividad peroxidada, y se observó más bien una disminución en las magnitudes de la

actividad enzimática con el tiempo, para los tres tratamientos.

El comportamiento de la actividad de la enzima peroxidasa durante el ensayo *in vivo* en lulos maduros se muestra en la Figura 3c. Los resultados indicaron que, en general, hay una inducción significativa de la enzima atribuible a la inoculación con el patógeno, dada la diferencia con el testigo. El aumento fue significativo al tiempo inicial, 6, 24, 30, 48, 72 y 144 h. La mayor inducción se observó a 48 h, con un aumento de casi cuatro veces con respecto al testigo. En promedio, la actividad fue mayor a los mayores tiempos de muestreo, a diferencia de lo observado con los frutos pintones, en los que disminuyó, en general, con el tiempo. Este comportamiento podría estar relacionado con el proceso mismo de maduración, ya que, como se ha reportado en estudios previos (7), la actividad peroxidasa en corteza de lulo a temperatura ambiente aumenta, especialmente hacia el máximo climatérico, es decir cuando el fruto alcanza su estado óptimo de madurez.

En el modelo objeto de nuestro estudio, lulo- *C. acutatum* se puede postular, con base en los resultados obtenidos, que hay respuestas diferenciales a la infección con el hongo en términos de inducción de la enzima peroxidasa. Una vez que se establecen diferencias en la actividad de una enzima por efecto de un patógeno, como es este caso, resulta interesante determinar si esta se relaciona con la inhibición del desarrollo de la enfermedad, es decir, con reacciones de defensa del fruto. Para ello es necesario avanzar en la investigación del modelo, estableciendo si el no desarrollo de síntomas se debe, por ejemplo, a la formación de estructuras de de-

fensa (lignificaciones, reforzamiento de paredes, deposición de calosa, etc.) o a la formación de compuestos que sean tóxicos para el patógeno. Es de resaltar que en este modelo en particular se observó que los frutos verdes y maduros, en los que hubo mayor inducción de la actividad, y además temprana, los síntomas de la enfermedad a un mismo tiempo después de la inoculación fueron menores respecto a los lulos pintones. Ello sugiere una posible asociación entre la inducción de la enzima y la aparente defensa frente al patógeno.

Existen reportes en los que peroxidasa está involucrada como una enzima que participa en las interacciones hospedero-patógeno. En manzana (4), se reportó aumento en su actividad, así como en el contenido de lignina, y a su vez, una disminución en la incidencia de la enfermedad frente al ataque de *Penicillium expansum*. En pera (14), se reportó aumento en la actividad peroxidasa cuando los frutos fueron inoculados con *Alternaria alternata*.

En papa (5), se determinó una isoforma con alta movilidad electroforética como respuesta a la infección con el patógeno *Pectobacterium chrysanthemi*. Una de las respuestas más tempranas de plantas a patógenos es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), evento para el cual se han postulado diversos sistemas enzimáticos y, con mucha frecuencia, el correspondiente a peroxidasa de pared celular. Estas ROS contribuyen a la defensa, ya sea como compuestos antimicrobiales, como inductores de muerte celular del hospedero o como formadores de barreras estructurales.

Electroforesis PAGE y tinción específica para peroxidasa

Muestra de los perfiles electroforéticos obtenidos para algunos extractos crudos enzimáticos de lulo verde, pintón y maduro se muestran en la Figura 4. En la Figura 4a se comparan dos tiempos después de inoculación, para extractos enzimáticos crudos de lulo verde: tiempo ini-

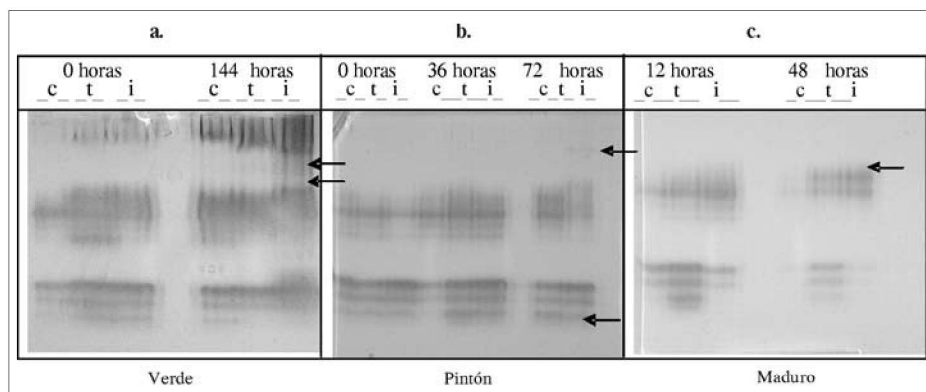


Figura 4. Perfil electroforético en condiciones nativas, con tinción específica para peroxidasa, de extractos crudos de corteza de lulos a diferentes horas de inoculación.

c: control; t: testigo; i: inoculado. Cantidad de proteína en cada carril: 25 μ g. En cada fotografía, la muestra de la izquierda corresponde a extractos enzimáticos donde no hubo inducción de actividad peroxidasa, mientras que la de la derecha corresponde a extractos en los que se obtuvo inducción de la enzima.

cial, donde no hubo inducción de actividad, y 144 h, en el que hubo inducción importante de la enzima en frutos inoculados con el patógeno. Al comparar los resultados obtenidos en la electroforesis, se observó que en las muestras correspondientes a 144 h el perfil presentó dos nuevas bandas. De estas nuevas bandas o isoenzimas, solo una puede atribuirse a una respuesta del fruto frente al ataque del patógeno, dado que únicamente se presenta en los lulos sometidos a la acción del hongo, mientras que la otra puede ser una proteína de respuesta al estrés. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos en la evaluación de la actividad enzimática, en los que a 144 horas los extractos de lulos inoculados con el hongo mostraron un aumento muy notable respecto a los control y testigo.

En el perfil electroforético de extractos crudos de corteza de lulo en estado pintón (Figura 4b), se comparan tres. Uno a tiempo inicial, en el que no hubo inducción de la actividad, y los otros a 36 y 72 h, extractos en los que hubo ligera inducción. En estos se pudo observar un perfil muy similar al obtenido para extractos del estado verde. Sin embargo, se detectó en los extractos de 36 h y 72 h la aparición de una nueva banda, con la mayor movilidad electroforética relativa, en las muestras correspondientes a los lulos testigos y los inoculados con el hongo. Por tanto, esta posible isoenzima podría atribuirse a una respuesta del fruto frente a las condiciones de estrés producidas por la incisión realizada y no al patógeno. Por otro lado, se observó una banda con la menor movilidad electroforética relativa, la cual solamente está presente en el extracto de 72 h en la muestra correspondiente a lulo inoculado con el hongo; por

consiguiente, puede suponerse, de manera preliminar, que esta proteína puede asociarse a una respuesta del fruto frente al ataque del patógeno. Respecto al perfil electroforético obtenido para extractos enzimáticos crudos de corteza de lulo maduro (Figura 4c), se observó que, en comparación con los estados verde y pintón, el perfil presenta menos bandas. Esto hace suponer que durante el proceso de maduración las formas activas de la enzima peroxidasa parecen disminuir. Al comparar los dos extractos de lulo maduro evaluados, es decir, 12 y 48 h, se encontró que en el de 48 h las bandas que habían sido observadas para lulo control son mucho menos evidentes, y se observa la aparición de una nueva banda, con la mayor movilidad electroforética relativa, la cual está presente en los extractos correspondientes a lulos testigo e inoculado con el hongo, lo que quiere decir que esta isoenzima se presenta como una respuesta a las condiciones de estrés causadas por la incisión realizada. Cabe resaltar que la intensidad de esta banda es algo mayor en la muestra correspondiente al lulo inoculado con el patógeno, aumento que, de corroborarse por cuantificación, podría correlacionarse con la inducción de actividad de la enzima observada a este tiempo en las muestras correspondientes a lulos inoculados con el patógeno.

El comportamiento en los tres perfiles electroforéticos de los extractos enzimáticos crudos de corteza de lulo durante el ensayo *in vivo* en los tres estados de madurez puede parecerse en esta evaluación preliminar con lo observado en estudios realizados en el modelo trigo- *Fusarium graminearum* (15) en el que se encontraron, en una variedad resistente, 9 isoformas de peroxidasa; 4 de estas fueron in-

ducidas luego de la inoculación de la planta con el patógeno. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible postular en forma preliminar que algunas isoenzimas específicas podrían estar involucradas en reacciones de respuesta del lulo frente al hongo *C. acutatum*. Aunque no es del todo claro el papel específico de la peroxidasa en mecanismos de defensa, se sabe que esta enzima está asociada con biosíntesis de pared celular, polimerización de alcohol cinámico a lignina, polimerización de extensinas, respuestas a heridas y al ataque de patógenos. Adicionalmente, se relaciona con la catálisis de compuestos fenólicos para producir una variedad de productos bioactivos, sugiriendo que los productos de la reacción constituyen una forma de defensa química y física.

Cuantificación de compuestos fenólicos totales

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó a todas las muestras en los tres estados de madurez con el fin de establecer si se produce una acumulación de estos como consecuencia de la inoculación con el patógeno, y si esta acumulación tiene alguna relación con la inducción de la enzima peroxidasa.

Los resultados obtenidos para lulos en estado verde se muestran en la Figura 5a. Estos permitieron establecer que hubo incremento significativo en los lulos inoculados con el hongo a 30, 96 y 144 h, después de inoculación. Con excepción del dato a 144 h no se encontró relación directa entre inducción de peroxidasa y aumento en el contenido total de fenoles.

La Figura 5b muestra los resultados obtenidos para frutos pintones. Se encontró una interesante respuesta en lo que a la

inducción de fenoles se refiere, a tiempos tempranos (6 h), posiblemente relacionada con el estrés producido al realizar la incisión, dado el aumento tan significativo en el contenido (del orden de 300%) obtenido para los frutos tanto inoculados con agua como con el hongo, con relación a los controles. El contenido de fenoles en los frutos testigo permaneció relativamente constante durante todo el ensayo. No se observó aumento que se pueda atribuir específicamente a la inoculación con el hongo, dado que las diferencias entre inoculados con agua o con el patógeno no fueron significativas. Es de resaltar que el contenido promedio de fenoles totales en los lulos pintones fue mayor al de los lulos verdes. Sin embargo, a lo largo del análisis, en el estado pintón la tendencia general fue a disminuir.

Para los frutos maduros, la variación en el contenido de fenoles totales durante el ensayo *in vivo* se muestra en la Figura 5c. Se obtuvo un aumento significativo a 30, 96 y 144 h en los lulos inoculados con el hongo. Al igual que en los verdes, no se encontraron cambios que indiquen que los fenoles aumentaron como producto de la herida realizada con el bisturí, dado que en los lulos inoculados con agua no se observó aumento significativo. En promedio, se observó que el contenido de fenoles totales es ligeramente mayor en los lulos maduros que en los otros dos estados de madurez. Adicionalmente, se encontró que la acumulación de fenoles a 144 horas coincide con la inducción de la enzima en lulos maduros por efecto del patógeno.

Salvo el caso del tiempo 144 h, no se puede deducir a partir de estos resultados una relación directa general entre la

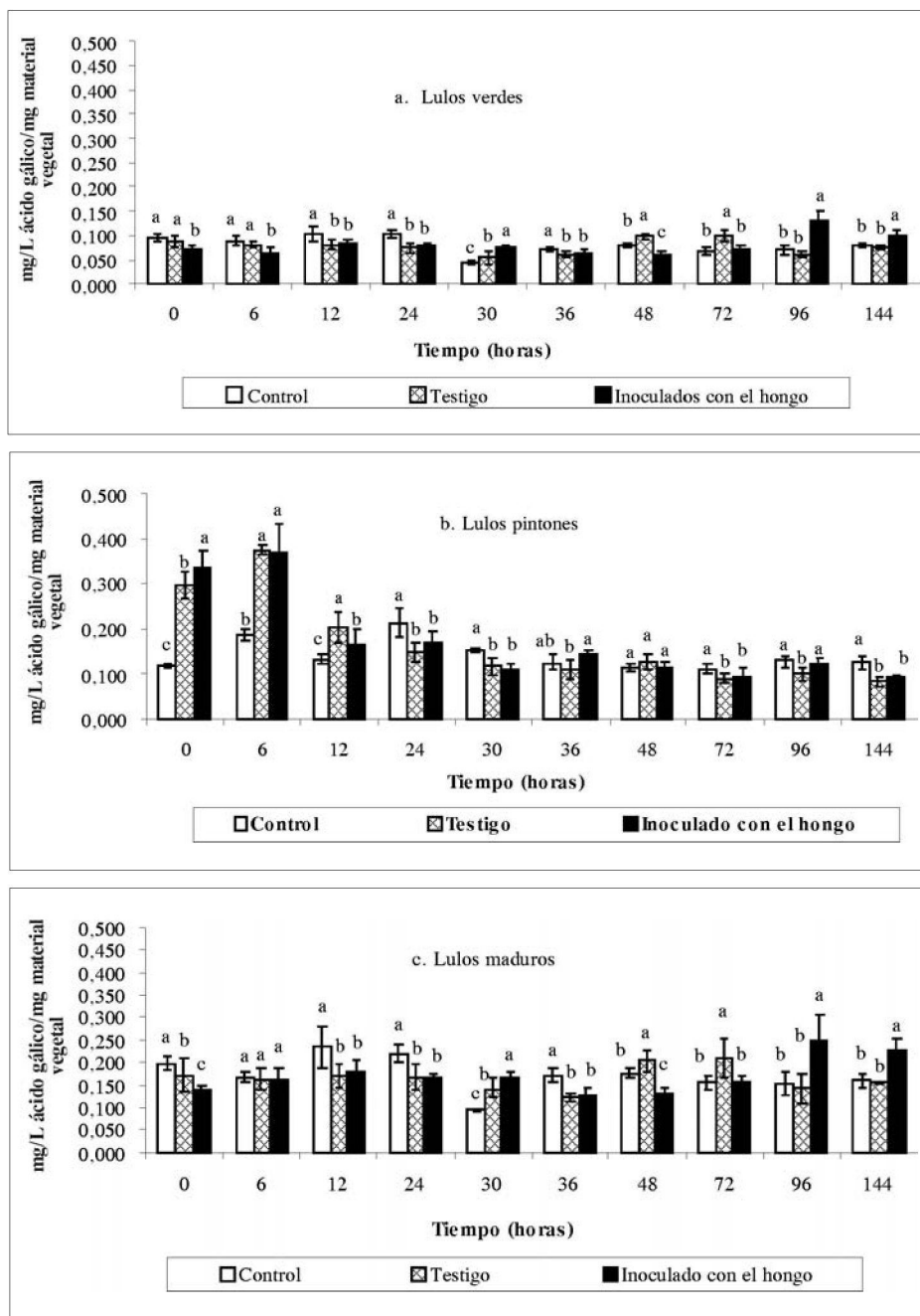


Figura 5. Contenido de fenoles totales en corteza de lulos a. verdes, b. pintones y c. maduros durante el ensayo *in vivo*. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza de 95 % en cada tiempo. Cada dato es el promedio de nueve medidas.

actividad peroxidasa y el contenido total de fenólicos, aunque es bueno resaltar que se trata de contenidos totales y no se consideraron posibles casos de disminución de algunos fenoles en aras del aumento de otros, lo que metabólicamente es frecuente.

Por otro lado, la acumulación a 30, 96 y 144 h por efecto de la inoculación en lulos verdes y maduros se puede relacionar con la evaluación hecha de la enfermedad, en el sentido de que, en dichos estados de madurez, los síntomas visibles de esta fueron menores, mientras que en los lulos pintones, en los que la severidad de la enfermedad fue la mayor, no se encontró acumulación de fenoles totales atribuible al patógeno.

La acumulación de compuestos fenólicos es una de las respuestas típicas de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos (16). Las fitoalexinas, por ejemplo, son una clase de compuestos tóxicos a patógenos, muchos de tipo fenólico, que las plantas producen en cantidades apreciables sólo después de haber sido estimuladas por diferentes tipos de microorganismos fitopatógenos o de haber sufrido daños causados por agentes químicos o mecánicos.

Los resultados observados en el modelo lulo- *C. acutatum* están de acuerdo con algunos reportes en los que se han encontrado cambios en el metabolismo fenólico después de la interacción planta-patógeno. Uno de estos modelos es *Hypericum perforatum* L. (17), una planta medicinal con la que, a través de un cultivo celular, se logró establecer que luego de elicitación con *Colletotrichum gloesporioides* se produjo la acumulación de xantonas,

compuestos conocidos por su actividad farmacológica como antibacteriales y antifúngicos. En otros modelos como lechuga-*Colletotrichum trifolii* (18), se reporta que después de evaluar interacciones compatibles e incompatibles, fue en la interacción incompatible donde se encontró acumulación de medicarpina y sus conjugados a las 24 h después de la inoculación, manteniéndose hasta 72 h, mientras que en interacciones compatibles la acumulación ocurrió solo a 48 h y posteriormente decayó. En el modelo clavel-*Fusarium oxysporum* (19) se reportó acumulación diferencial de compuestos fenólicos entre variedades con diferentes niveles de resistencia al patógeno causante del marchitamiento vascular.

Teniendo en cuenta lo anterior, es posible postular que la acumulación de compuestos fenólicos totales a 96 y 144 h en lulos verdes y maduros, pueda ser una respuesta de la planta frente al ataque del patógeno, ya que puede descartarse que la respuesta se deba al estrés de la herida realizada con el bisturí, puesto que en ninguno de estos tiempos se observaron diferencias significativas entre los contenidos obtenidos para los controles (sin inocular) comparados con los testigos (inoculados con agua). Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio, por ejemplo, realizando perfiles cromatográficos con el fin de establecer cuáles fenoles se inducen o se sintetizan de *novo* y el tipo de fenoles específicos que estarían involucrados en la respuesta defensiva.

Los resultados de este estudio se constituyen en un aporte al conocimiento, por lo demás escaso, de las interacciones frutos-patógenos, y son los primeros conocidos acerca de la interacción lulo- *Colleto-*

trichum, lo cual permite establecer para este modelo evidencias que permiten postular la posible participación de la enzima peroxidasa y de los fenoles en respuestas de defensa, y la dependencia del desarrollo de síntomas de la antracnosis y el grado de enfermedad con el estado de madurez del fruto.

AGRADECIMIENTOS

A la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (DIB), por el apoyo financiero, y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Galvis, J.; Herrera, A. El lulo *Solanum quitoense* Lam. Manejo poscosecha. Cartilla convenio SENA-Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D. C., 1999. p. 75.
2. Botero, M. Principales enfermedades en poscosecha asociadas a cultivos de lulo, manzano, mora y tomate de árbol. Corpoica, Universidad de Caldas, Sena, Quindío. 1999. pp. 6-10.
3. Cerón, G. S. Detección de *Colletotrichum* (Penz) Sacc en estructuras vegetativas y reproductivas de Lulo *Solanum quitoense* Lam. Tesis de maestría en Fitopatología. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., 2005. p. 24.
4. Valentines, M.; Vilaplana, R.; Torres, R.; Usall, J.; Larrigaudiere, C. Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*. 2005. **36**: 227-234.
5. Jang, I.; Park, S.; Kim, K.; Kwon, S.; Kim, J.; Kwak, S. Differential expression of 10 sweetpotato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2004. **42**: 451-455.
6. Zimmermann, F. Estadística para investigadores. 1a. ed. Bogotá, D. C.: Escuela Colombiana de Ingeniería. 2004. p. 422.
7. Cortés, R. A. Efecto de la refrigeración y el choque térmico sobre algunos indicadores de actividad antioxidante en lulo (*Solanum quitoense* Lam). Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C. 2006. p. 24.
8. Deutscher, M. Methods in Enzymology, Guide to protein purification. Vol. 182. New York: Academic Press, Inc. 1990.
9. Suzuki, T.; Honda, Y.; Mukasa, Y.; Kim, S. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry*. 2006. **67**: 219-224.
10. Makkar, H.; Bluemmel, M.; Borowy, N. K.; Becker, K. Quantification of tannins in tree foliage. In: A laboratory manual for the FAO/IAEA Co-ordinated research Project on "use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on tanniniferous tree foliage". Vienna. 2000. pp. 1-6.

11. Cruz, I.; Fatibello, O. Flor injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucúrbita pepo*) as a source of peroxidase. *The Analyst*. 1998. **8**: 321-325.
12. Battistuzzi, G. Isolation and characterization of two peroxidases from *Cucumis sativus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001. **388**(1): 100-112.
13. Torres, R.; Valentines, M. C.; Usall, J.; Vinnas, I.; Larrigaudiere, C. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in "Golden Delicious" apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2003. **27**: 235-242.
14. Tian, S.; Wan, Y.; Qin, G.; Xu, Y. Induction of defence responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 2005. **18**: 115-119.
15. Mohammadi, M.; Kazami, H. Change in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*. 2002. **162**: 491-498.
16. Agrios, N. Fitopatología. 2a. ed. México: Noriega Editores. 2002. p. 525.
17. Conceicao, L.; Ferreres, F.; Tavares, R.; Dias, A. Induction of phenolic compound in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloesporioides* elicitation. *Phytochemistry*. 2006. **67**: 149-155.
18. Salles, I.; Blount, J.; Dixon, R.; Schubert, K. Phytoalexin induction and β -1,3-glucanase activities in *Colletotrichum trifolii* infected leaves of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2002. **61**: 89-101.
19. Higuera, B. L. Contribución al estudio de la participación de los compuestos fenólicos en los mecanismos de la interacción Clavel *Dianthus caryophyllus* L.-*Fusarium oxysporum* f sp. *dianthi*. Tesis de doctorado en Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C. 2001. p. 35.