

LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN DEFENSA DE LAS PLANTAS CONTRA PATÓGENOS

G. Camarena-Gutiérrez

Laboratorio de Fisiología Molecular, UMF. FES Iztacala. Av. de los Barrios No. 1,
Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla. C. P.54900 México. Correo-e: datura@servidor.unam.mx

RESUMEN

En respuesta al intento de invasión por los patógenos, las plantas presentaron una gama amplia de respuestas de defensa, incluyendo la generación de especies reactivas de oxígeno. Uno de los aspectos más espectaculares, observables al inicio de este mecanismo, es el estallido oxidativo que es la producción rápida y transitoria de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno.

PALABRAS CLAVE: radicales libres, estallido oxidativo, concepto gen a gen.

REACTIVE OXYGEN SPECIES IN DEFENSE OF PLANTS AGAINST PATHOGENS

SUMMARY

In response to the attempted invasion by pathogens, plants present a broad range of defense responses, including the generation of reactive oxygen species. The most spectacular and one of the earliest observable aspects of this mechanism is the oxidative burst- a rapid and transient production of large amounts of reactive oxygen species.

KEY WORDS: free radicals; oxidative burst; gen to gen concept.

INTRODUCCIÓN

Las plantas, por medio de una serie de adaptaciones han evolucionado hasta ser la forma dominante en nuestro planeta, de la que dependen la mayoría de especies. Al colonizar una amplia variedad de hábitats, las plantas reciben información a la que deben reaccionar. Las plantas reaccionan a la infección microbiana con una amplia gama de respuestas de defensa, en un intento por restringir o prevenir el crecimiento del patógeno. La resistencia a enfermedades producidas por patógenos, como hongos, bacterias y virus, depende de que la planta sea capaz de reconocer al patógeno al inicio del proceso de infección. Los eventos de reconocimiento conducen a una necrosis rápida del tejido en el sitio de infección, fenómeno que es llamado respuesta hipersensitiva. La respuesta hipersensitiva priva al patógeno de nutrientes y libera moléculas tóxicas, confinando el crecimiento del patógeno a una pequeña región de la planta. Esta respuesta le da resistencia a la gran mayoría de patógenos potenciales.

Para una especie de planta dada, un número más limitado de patógenos muestran la habilidad para evadir el sistema de reconocimiento del hospedante y crecen extensamente dentro de la planta, sin despertar la necrosis del hospedante o sólo después de un retraso considerable. En este caso, las plantas muestran susceptibilidad y el crecimiento extenso del patógeno exitoso puede causar varios grados de daño. Sin embargo, ciertas razas de bacterias u hongos patógenos son reconocidos por ciertos genotipos de las especies de plantas hospedantes y disparan la respuesta hipersensitiva (Medhy, 1994).

Estas observaciones indican que hay una continua evolución de la habilidad de las plantas hospedadoras para reconocer las razas de patógenos que no eran reconocidas, mientras que el patógeno evoluciona para evitar el reconocimiento por un hospedante previamente resistente.

El reconocimiento del patógeno dispara una gran gama de mecanismos inducibles de defensa que se supone

contribuyen a la resistencia total de la planta. Los mecanismos inducidos en el sitio de infección y asociados con la respuesta hipersensitiva incluyen la síntesis de enzimas hidrolíticas que atacan a hongos y bacterias, síntesis de compuestos antimicrobianos llamados fitoalexinas y alteraciones en la síntesis de proteínas estructurales de la pared celular (Lamb *et al.*, 1989). Muchas de estas respuestas se deben a la activación de la transcripción de genes específicos, colectivamente conocidos como genes relacionados con la defensa de la planta. La regulación de los genes de defensa se están estudiando intensamente, tanto en interacciones planta-patógeno y en sistemas modelo, en las que suspensiones celulares de plantas se tratan con moléculas derivadas de patógenos llamadas elicitores.

Varios procesos rápidos característicos de la respuesta hipersensitiva incluyen, inicialmente, la activación de componentes preexistentes, más que cambios en la expresión de genes. Uno de esos procesos rápidos es la liberación impresionante de especies reactivas de oxígeno, proceso llamado el estallido oxidativo. Esta respuesta a patógenos o elicitores se ha observado en diversas monocotiledóneas y dicotiledóneas como el arroz, el tabaco, la soya y los abetos.

Modelo gen a gen

La respuesta de muerte celular, conocida como respuesta hipersensitiva, es una característica central de la resistencia a la enfermedad de las plantas. La resistencia gen a gen es una forma de resistencia de las plantas a las enfermedades que es explotada ampliamente por los fitomejoradores, formando la piedra angular del control de enfermedades en las plantas de cultivo. El nombre gen a gen denota la dependencia de resistencia a la interacción específica entre un gen de resistencia en la planta y un gen avirulento en el patógeno. Hay genes de resistencia que median el reconocimiento de cepas específicas de hongos, bacterias, virus o nematodos patógenos. La fuerte respuesta de defensa que se dispara después de una

interacción gen a gen incluye la síntesis de enzimas y metabolitos antimicrobianos, la generación de moléculas señal que activa la defensa en las células vecinas y el refuerzo de las paredes celulares que rodean el sitio de infección (Yu *et al.*, 1998).

Las interacciones planta-patógeno, particularmente las que involucran a parásitos biotrofos, están gobernadas por interacciones específicas entre patógenos con genes *avr* de avirulencia y genes de resistencia, R, correspondientes en las plantas. Se dice que existe una interacción incompatible cuando los genes R y *Avr* están presentes en el hospedante y el patógeno, la consecuencia es la resistencia a la enfermedad. Si la interacción es compatible, se debe a que cualquiera de los dos genes es inactivo o está ausente y el resultado es la enfermedad. Este modelo de interacción específica hospedante-patógeno, que describe las respuestas de defensa inducidas en plantas, ha sido influenciado por las interacciones gen a gen mencionado originalmente por Flor (1956). El gran interés en estas interacciones gen a gen fue porque se reconoció que la resistencia generalmente era controlada por un solo gen dominante, haciendo el análisis genético muy tratable. El primer gen *Avr* identificado fue del patógeno *Pseudomonas syringae* pv *glycinae*.

El modelo más simple que explica esta interacción requiere que los productos del gen R reconozcan las señales que dependen del gen *avr* y disparen la cadena de eventos de transducción de señales que culminan en la activación de mecanismos de defensa y detienen el crecimiento del patógeno (Cuadro 1).

El estallido oxidativo

El término estallido oxidativo se tomó prestado de la literatura de las células neutrófilas, para describir la primera fase de la producción rápida de especies reactivas de oxígeno. En plantas se documentó por primera vez en tubérculos de papa tratados con el patógeno incompatible *Phytophthora infestans* (Doke, 1983). En esos estudios

CUADRO 1. Para que exista la incompatibilidad o resistencia, son necesarios los pares complementarios de genes dominantes, uno del patógeno y otro de la planta. Una alteración o pérdida del gen de resistencia de la planta (R cambia por r) o del gen de avirulencia del patógeno (*Avr* cambia por *avr*) permiten la enfermedad o compatibilidad, Flor (1956).

Genotipo del patógeno	Modelo de Gen a Gen			
	Genotipo de la planta		Genotipo de la planta hospedante	
	R1	r1	R1	r1
<i>Avr1</i>	<i>Avr1</i>	proteína R1	<i>Avr1</i>	proteína r1
	No hay enfermedad Planta y patógeno son incompatibles		Enfermedad Planta y patógeno son compatibles	
<i>avr 1</i>	<i>avr1</i>	proteína R1	<i>avr1</i>	proteína r1
	Enfermedad Planta y patógeno son compatibles		Enfermedad Planta y patógeno son compatibles	

se demostró que con la simple inoculación con el patógeno se estimuló la producción directa de superóxido, como lo indicaba la reducción del citocromo *c* o el azul de nitrotetrazolio. La rápida generación del anión superóxido y H_2O_2 se ha reportado en muchos estudios de respuesta hipersensitiva con bacterias y hongos avirulentos o con patógenos virales (Mehdy, 1994). Ahora, los estudios más recientes revelan que la generación de las especies reactivas de oxígeno ocurren en dos fases, una inicial, que sucede minutos después de la adición del patógeno, y una secundaria, que comienza de una a tres horas después que la fase inicial ha terminado.

Aunque ambas fases involucran sustratos y vías de inducción similares, las dos fases se regulan de manera independiente, ya que se observa que los patógenos incompatibles inician ambas fases de producción de las especies reactivas de oxígeno, mientras que los patógenos compatibles inducen sólo la primera fase (Levine *et al.*, 1994). Por lo tanto, la Fase I es una reacción biológicamente no específica, mientras que la Fase II del estallido depende de la expresión *avr* en la interacción patógeno-planta y la expresión del grupo de genes *Hrp* o genes de la respuesta hipersensitiva y patogenicidad. El estallido oxidativo se puede observar en todas las especies vegetales examinadas y, debido a que una vía similar es operativa en células especializadas del reino animal, se puede especular que el mecanismo de la formación de oxidantes será fundamentalmente similar en todas las formas de vida (Figura. 1).

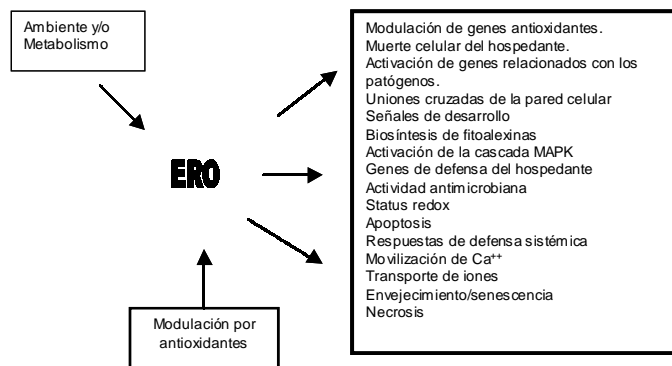


FIGURA 1. Esquema que muestra algunos de los papeles pleiotrópicos de las especies reactivas de oxígeno (ERO) que ocurren en la mayoría de los organismos superiores, indicativo de el hecho de que ERO no siempre es nocivo a las células.

Una célula de soya cuando se estimula generará 10^{-14} moles de H_2O_2 , valor comparable al de la producción de un neutrófilo humano activado. Debido a que la función del estallido oxidativo en los neutrófilos humanos es microbicida, se asume que al menos parte del papel de la síntesis H_2O_2/O_2^- en la planta es dañar directamente al patógeno atacante. Tal vez el estallido oxidativo está diseñado para ser letal a las células dañadas por la interacción con el patógeno.

Función del estallido oxidativo

El estallido oxidativo es una respuesta muy rápida, que sucede pocos segundos en algunos sistemas como soya. En otros sistemas como en células cultivadas de rosas, se puede retrasar por minutos u horas, pero en general, se piensa que no requiere de la síntesis proteica de novo. Así que involucra la activación de enzimas preexistentes.

Actividad antimicrobiana directa

La oxidación de los lípidos de membrana por radicales libres puede matar a las células directamente. La adición de H_2O_2 inhibe la germinación de esporas de numerosos hongos patógenos (Peng y Kuc, 1992). Del líquido de un cultivo de hongos se aisló una enzima antimicrobiana, que es la glucosa oxidasa, la cual resultó ser efectiva contra bacterias y hongos patógenos, debido a la generación de H_2O_2 en la reacción catalizada por la glucosa oxidasa: $glucosa + O_2 \longrightarrow gluconato + H_2O_2$. Papas transgénicas que expresan el gene de la glucosa oxidasa de *Aspergillus Níger*, mostraron una mejor protección contra *Erwinia carotova*, debido a los efectos de una mayor concentración de H_2O_2 (Wu *et al.*, 1995).

Se ha utilizado al difenileniodonio (DPI) como inhibidor del estallido oxidativo para investigar el papel de las especies reactivas de oxígeno en las respuestas de defensa contra patógenos. La inhibición producida por DPI afecta la expresión de la enzima glutatión transferasa en soya, y las fitoalexinas en perejil, mientras que la expresión de la enzima chalcona sintetasa y la producción de fitoalexinas en tabaco no se alteran.

Lignificación de la pared celular

Una rápida unión cruzada oxidativa en la pared celular se parece a una llanta que se autosella ante el ingreso lento del patógeno en las células del hospedante, antes del despliegue de las defensas dependientes de la transcripción y para atrapar a los patógenos en las células del hospedante destinadas a morir. Es interesante notar que los inductores de hongos y heridas inhiben la expresión de genes que codifican proteínas estructurales con bajo contenido de tirosina, pero estimulan la producción de proteínas ricas en tirosina (Kim *et al.*, 2002). Esto incrementa la capacidad de la pared celular para posteriores uniones cruzadas, por ejemplo, se ha observado una protección contra infecciones secundarias con aumento de los niveles de hidroxiprolina y peroxidasa en la pared celular.

Una función final del estallido oxidativo inducido por el patógeno puede ser su participación en la respuesta hipersensitiva. Esta reacción hipersensitiva es una estrategia de defensa en la que las células vecinas a la infección entran a la muerte celular programada para

eliminar la fuente más inmediata de energía y nutrientes para el microbio invasor.

Propiedades bioquímicas de las especies reactivas de oxígeno

Por definición, un radical libre es una molécula con un electrón no apareado en su última órbita. El término radical libre se utiliza para describir una molécula radical relativamente estable que puede existir independiente. La definición de radical no implica que la molécula dada sea altamente reactiva, se conocen radicales libres de varias reactividades. Por ejemplo, cuando la reacción no es catalizada por enzimas, el radical superóxido (O_2^-) reacciona con un número limitado de biomoléculas. Sin embargo, la adición de electrones y un protón produce el radical hidroxilo (HO), que es una de las moléculas más reactivas conocidas en la biología, capaz de reaccionar con casi cualquier tipo de biomolécula: lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, fenoles y azúcares (Scandalios, 2005).

Los radicales libres se forman cuando una molécula con un par de electrones no apareados en la órbita externa recibe o pierde un electrón. El radical libre más común en la atmósfera es la molécula de oxígeno, la cual tiene dos electrones no apareados en la última órbita, por lo que forma una molécula birradical. La distribución particular de electrones hace del oxígeno un excelente aceptor de electrones. Cada molécula de oxígeno diatómico puede aceptar cuatro electrones y cuatro protones, produciendo dos moléculas de agua. En un sistema biológico ideal, la reducción de oxígeno a agua sucede secuencialmente. Si la molécula de oxígeno sólo recibe uno, dos o tres electrones, se forman las especies reactivas de oxígeno (Figura 2). El término especies reactivas de oxígeno se utiliza para incorporar a la molécula de peróxido de hidrógeno, la cual no es un radical libre, según la definición, pero sus propiedades químicas son similares a las del superóxido, y fácilmente puede formar los radicales hidroxilo que son muy reactivos (Lamb y Dixon, 1997).

Como todos los organismos aerobios, las plantas requieren de oxígeno para producir energía eficientemente. Durante la reducción de oxígeno a agua se pueden producir diferentes especies de oxígeno como los radicales superóxido y peróxido, así como peróxido de hidrógeno. En un inicio la cadena de reacciones requiere de energía y los pasos posteriores que son exotérmicos suceden de manera espontánea, con la participación de enzimas. El oxígeno puede recibir un exceso de energía y producir un singulete de oxígeno, 1O_2 , una molécula altamente reactiva cuando se compara con el O_2 . El singulete puede transferir su energía a otras moléculas biológicas o reaccionar con ella misma, produciendo endoperóxidos o hidroperóxidos (Halliwell y Gutteridge, 1989). El radical superóxido es menos reactivo y además no atraviesa la membrana plasmática y es dismutado rápidamente a peróxido de

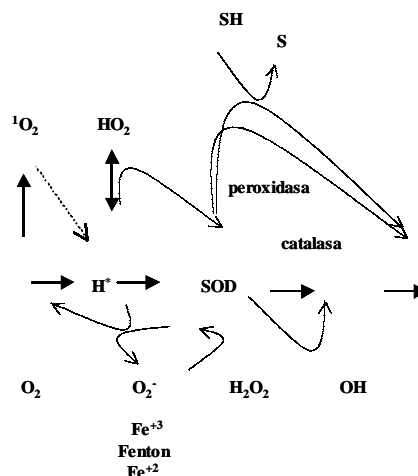


FIGURA 2. Interconversión de especies reactivas de oxígeno, derivadas de O_2 . El estado basal del oxígeno molecular puede activarse por energía, formando un singulete de oxígeno (1O_2). Alternativamente, la reducción por un electrón lleva a formar el radical superóxido (O_2^-). El superóxido existe en equilibrio con su ácido conjugado, el radical hidroxilo (HO_2). Después, los siguientes pasos de reducción forman peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH) y agua (H_2O). Los iones de metales que están presentes en las células en la forma oxidada (Fe^{3+}) se reducen en presencia de O_2^- y pueden catalizar la conversión de H_2O_2 a OH , por las reacciones Fenton o Haber-Weiss, (modificado de Vranová *et al.*, 2002).

hidrógeno. El radical superóxido también reacciona reduciendo quinonas y complejos de metales de transición Fe-Cu, afectando la actividad de las enzimas que contienen estos metales. Los radicales hidroxilo se forman a partir del radical superóxido por protonación; en solución acuosa, pueden atravesar la membrana y sustraer átomos de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados que la forman, iniciando una autooxidación de lípidos. El peróxido de hidrógeno es una molécula moderadamente reactiva y puede difundir a alguna distancia desde el punto de producción. El H_2O_2 puede inactivar enzimas oxidando los grupos tiol; por ejemplo, las enzimas del ciclo de Calvin, la Cu-Zn superóxido dismutasa y la Fe-superóxido dismutasa pueden inhibirse por el H_2O_2 . El radical hidroxilo que se forma a partir de H_2O_2 es el más reactivo. Debido a que las células no tienen mecanismo enzimático para eliminarlos, los radicales hidroxilos pueden reaccionar con todas las biomoléculas y el exceso de su producción lleva a la muerte celular (Vranová *et al.*, 2002)

CONCLUSIONES

La supervivencia de los organismos depende de las interacciones de sus genomas con el medio ambiente en el que viven. En el curso de la evolución, los organismos han desarrollado un arreglo complejo de mecanismos para adaptarse, tanto a fluctuaciones en el ambiente como a la interacción con otros organismos. La emergencia de la

fotosíntesis representó el mayor reto y la oportunidad ambiental para los primeros organismos. El reto llevó al desarrollo de defensas antioxidantes para sobrevivir (Figura 3); la oportunidad fue para explorar la reactividad del oxígeno para la producción de energía y las reacciones de biosíntesis. La oportunidad llevó a las formas de vida muy diversificadas, que desarrollaron suficientes defensas para explotar el estilo de vida aeróbico.

La toxicidad del oxígeno probablemente llevó a la extinción masiva de aquellos organismos incapaces de manejarlo, a menos que se refugiaron en nichos anaeróbicos aislados. Así el oxígeno es un arma de doble filo: por éste es posible la vida sobre la tierra, pero las formas de las especies reactivas de oxígeno son altamente tóxicas y letales. El estrés oxidativo puede suceder por un desbalance entre la generación y la eliminación de especies reactivas de oxígeno de tal manera que sus concentraciones elevadas infligen un daño indiscriminado a todas las biomoléculas, sucediendo varias enfermedades y la muerte celular. La noción de que las especies reactivas de oxígeno son productos del metabolismo del O₂ de manera reciente se ha alterado por la evidencia experimental que indica que las especies reactivas de oxígeno son metabolitos cuidadosamente regulados, capaces de señalar y comunicar información a la maquinaria genética de la célula. La regulación redox de la expresión de los genes está emergiendo como un mecanismo vital de salud y enfermedad de todos los organismos. Independientemente de cómo y cuándo las especies reactivas de oxígeno se

generen, un aumento de antioxidantes intracelulares produce dos efectos críticos: daño a varios componentes celulares y activación de señales específicas, que afectan varios procesos celulares que permiten a la célula sus funciones propias o la muerte celular. La herramienta de la biología molecular está acelerando el descubrimiento de los genes responsables de las especies reactivas de oxígeno en una escala global y está expandiendo nuestro conocimiento de las respuestas al estrés oxidativo y los papeles pleiotrópicos de las especies reactivas de oxígeno en las señales y expresión de genes.

LITERATURA CITADA

- DOKE, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato-tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora-infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 345-357.
- FLOR, H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8: 29-54
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.J., M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press. pp. 65-80.
- KIM, M. C.; PANSTRUGA, R.; ELLIOTT, C.; MULLER, J.; DEVOTO, A. 2002. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 51: 416-417.
- LAMB, C.; DIXON, R. A. 1997 The oxidative Burst in plant disease resistance. *Annual Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.
- LAMB, C. J.; LAWTON, M. A.; DRON, M.; DIXON, R. A. 1989 Signals and transduction mechanisms for activation of plant de-

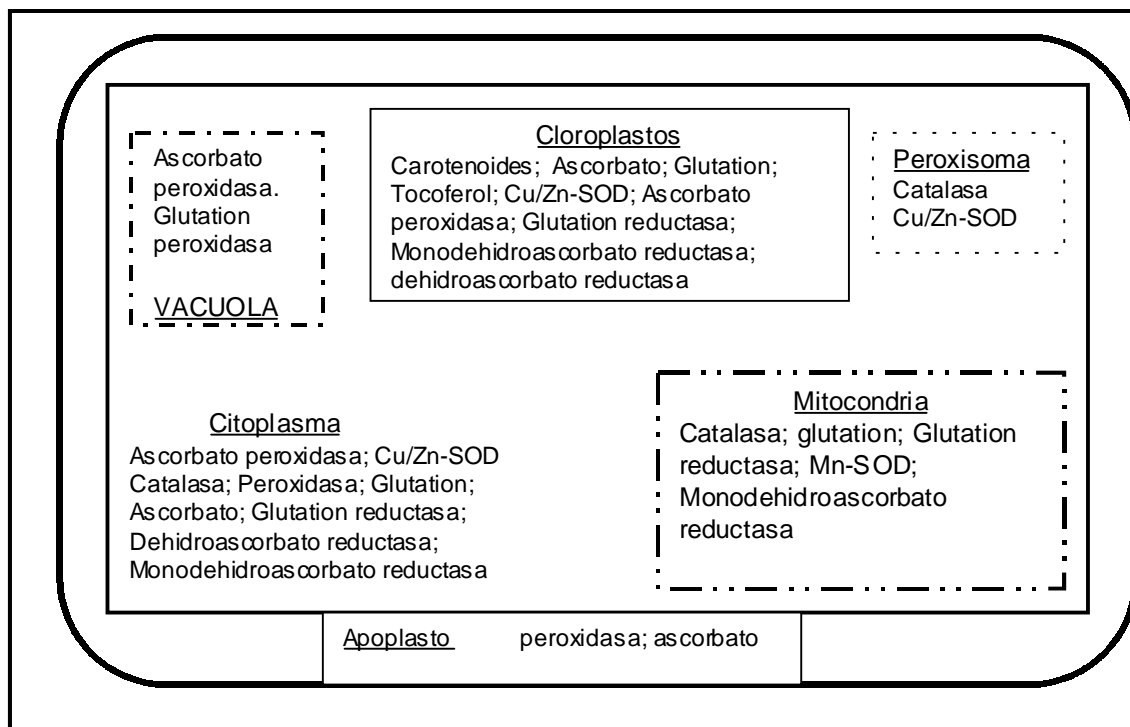


FIGURA 3. Localización en las células de los compuestos y enzimas que permiten la defensa contra la oxidación. SOD = superóxido dismutasa.

- fenses against microbial attack. *Cell*. 56: 215-224.
- LEVINE, A.; TENHAKEN, A.; DIXON, R.; LAMB, C. 1994. H₂O₂ from oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response
- MEDHY M., C. 1994. Active oxygen species in plant defenses against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472.
- SCANDALIOS, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defense. *Brazilian J. Medical Biol. Res.* 38: 995-1014
- VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; VAN BREUSGEM. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53: 1227-1236.
- WU, G. S.; SHORT, B. J.; LAWRENCE, E. B.; LEVINE, E. B.; FITZSIMMONS, K. C.; SHAH, D. M. 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7:135768.
- YU, I-CHING; PARKER, J.; BENT, A. 1998. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 7819-7824.