

## Efecto de cobre y Paraquat® sobre respuestas asociadas a estrés oxidativo en dos especies relacionadas de tomate

### Effect of copper and Paraquat® on responses associated to oxidative stress in two related species of tomato

Dr. Antoni Rueda Lorza,<sup>1</sup> Dr. Carlos Alberto Pelaez,<sup>11</sup> Lic. Mauricio Rojas,<sup>11</sup>  
Lic. Andrés Gil<sup>11</sup>

<sup>1</sup> Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

<sup>11</sup> Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** la capacidad antioxidante presente en las plantas ha despertado gran interés debido al potencial aprovechamiento en la alimentación para la prevención de enfermedades asociadas a estrés oxidativo.

**Objetivo:** evaluar el efecto de la inducción con CuCl<sub>2</sub> y Paraquat® (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) sobre protoplastos y plántulas de las especies relacionadas de tomate, *Lycopersicon hirsutum* Dunal y *Lycopersicon esculentum* Mill.

**Métodos:** la producción de especies reactivas de oxígeno se evaluó mediante citometría de flujo en protoplastos de las 2 especies de tomate, inducidos con CuCl<sub>2</sub> y Paraquat® (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo). Adicionalmente, sobre las plántulas se evaluó el contenido de polifenoles totales y la capacidad atrapadora de radicales libres.

**Resultados:** la inducción con Paraquat® durante eventos tempranos mostró un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en 17,4 veces en protoplastos de *Lycopersicon hirsutum* y de 12,4 veces en *Lycopersicon esculentum* con respecto a sus respectivos controles no tratados. La especie *Lycopersicon esculentum* presentó velocidades de producción significativas de contenido de polifenoles totales y capacidad atrapadora de radicales libres con valores de 1,81 Eq ácido gálico hora<sup>-1</sup> y 5,3 % de decoloración del DPPH hora<sup>-1</sup>, respectivamente. Durante la inducción con Paraquat® se observó una correlación entre contenido de polifenoles totales y capacidad atrapadora de radicales libres cercana a 1 y altamente significativa, en respuesta a los 2 tipos de inducción durante los eventos tempranos.

**Conclusiones:** los resultados sugieren que la biosíntesis de compuestos fenólicos y la correlación con la capacidad atrapadora de radicales libres, no necesariamente se encuentra relacionada con una actividad antioxidante como un mecanismo de defensa a nivel celular.

**Palabras clave:** *Lycopersicon hirsutum*, *Lycopersicon esculentum*, protoplastos, estrés oxidativo, polifenoles, mecanismo antioxidante.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** the antioxidant capacity in plants has aroused great interest due to their potential use in food for the prevention of oxidative stress-associated diseases.

**Objectives:** to evaluate the effect of CuCl<sub>2</sub> and Paraquat<sup>®</sup> induction on protoplasts and tomato seedlings belonging to *Lycopersicon hirsutum* Dunal and *Lycopersicon esculentum* Mill. species.

**Methods:** the production of reactive oxygen species in protoplasts of tomato both species after exposure to CuCl<sub>2</sub> and Paraquat<sup>®</sup> (1.1'-dimethyl-4.4'-bipyridyl dichloride) was evaluated by flow cytometry. Tomato seedlings were evaluated for total polyphenol content and free radical scavenging.

**Results:** Paraquat<sup>®</sup> induction showed a 17.4 fold increase in reactive oxygen species production for *L. hirsutum* protoplasts and a 12.4 fold for *L. esculentum* during early events with respect to their respective untreated controls. *L. esculentum* showed significant slopes for free radical scavenging and total polyphenol content: 1.81 galic acid eq per hour and 5.3 % DPPH discoloration per hour, respectively. In addition, in response to the two kinds of induction, positive slopes and a correlation between total polyphenol content and free radical scavenging were observed with copper induction (correlation close to 1 and highly significant), but not significant models during Paraquat<sup>®</sup> induction.

**Conclusions:** these results suggest that the biosynthesis of phenolic compounds and the correlation with the free radical scavenging are not necessarily related to antioxidant activity as a cellular defense mechanism.

**Key words:** *Lycopersicon hirsutum*, *Lycopersicon esculentum*, protoplasts, oxidative stress, polyphenols, antioxidant mechanism.

---

## INTRODUCCIÓN

Un radical libre es cualquier molécula que contiene al menos uno o más electrones desapareados, tal y como son los casos del superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), el radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>), el peróxido (ROO<sup>·</sup>) y el oxígeno singlete.<sup>1</sup> Estas moléculas se conocen colectivamente como especies reactivas de oxígeno (ERO). Estos radicales libres pueden producirse como subproductos de procesos redox normales en las células o a través de la interacción entre células y tejidos con un amplio conjunto de agentes y procesos externos.<sup>2</sup> Prácticamente todas las situaciones de estrés alteran el metabolismo celular y modifican el equilibrio de producción de ERO, que provocan su acumulación e imponen condiciones de estrés oxidativo.<sup>3,4</sup>

---

Las condiciones externas que afectan adversamente las plantas pueden ser bióticas o abióticas, que provocan un exceso o déficit en el ambiente físico o químico, entre estas condiciones se encuentra un amplio rango de estrés, como la luz, las bajas temperaturas, la sequía, la salinidad, el ozono, los compuestos xenobióticos y las infecciones por patógenos, potencialmente perjudiciales para las plantas.<sup>5</sup> Los incrementos en concentración de ERO desarrollados por estrés biótico o abiótico son generalmente atribuidos a diferentes mecanismos,<sup>6,7</sup> como la activación de varias oxidasas y peroxidasas que producen ERO en respuesta a ciertos cambios ambientales.<sup>4</sup> Las ERO pueden ser extremadamente reactivas y oxidar moléculas biológicas, como el DNA, las proteínas y los lípidos.<sup>5</sup>

Con relación al efecto de metales y compuestos xenobióticos en plantas, se ha reportado que el cobre produce estrés oxidativo, el cual comienza con la interrupción del paso de electrones en el fotosistema I, que provoca un daño irreversible en la célula.<sup>8-10</sup> Respecto a Paraquat<sup>®</sup>, el cual es usado como herbicida, es una molécula con estructura de bipyridilio con 2 nitrógenos cuaternarios, que actúa interrumpiendo el flujo de los electrones en el fotosistema II e inhibe de esta manera su paso a la ferredoxina y por procesos de oxidorreducción, los cede de forma desapareada al oxígeno; como consecuencia se refleja en la producción de especies reactivas de oxígeno.<sup>11,12</sup> Paraquat<sup>®</sup> se considera tóxico, no solo porque interrumpe la fotosíntesis, sino porque la producción de ERO causa peroxidación lipídica, daño a las membranas y a diferentes biomoléculas, al respecto diferentes estudios reportan la importancia de las ERO en el estrés oxidativo, la transducción de señales y la defensa de las plantas. Los compuestos fenólicos de plantas son muy variables y cumplen funciones diversas, la mayor parte de ellas relacionadas con reacciones de defensa y de comunicación con otros seres vivos del ecosistema. También se ha mencionado ampliamente como parte del metabolismo de los polifenoles, la biosíntesis o el reforzamiento de componentes de la pared celular, como es la producción de lignina durante el engrosamiento de esta.<sup>13</sup>

Un tema adicional que se integra a la importancia de los polifenoles, con relación a la defensa, es la capacidad de estos de actuar como moléculas estabilizantes de radicales libres.<sup>14</sup> En este sentido, hay una amplia gama de reportes que sugieren la participación de estos compuestos en el reforzamiento del sistema antioxidante en la planta.<sup>15</sup> Incluso, han tomado en los últimos años una gran fuerza las investigaciones en salud pública que involucran extractos vegetales con contenidos de polifenoles, debido a su potencial en el control de enfermedades por su capacidad antioxidante.<sup>14</sup>

En esta investigación se evaluó el efecto que tiene la inducción de cobre y Paraquat<sup>®</sup>, sobre protoplastos y plántulas de 2 especies relacionadas de tomate, como base para evaluar el papel de la biosíntesis de polifenoles en la estabilización de radicales libres durante procesos de estrés oxidativo.

## MÉTODOS

### Recurso genético

Se utilizaron 2 especies relacionadas de tomate: *Lycopersicon hirsutum* Dunal, accesión PI 251305, con reportes de resistencia a microorganismos fitopatógenos y *Lycopersicon esculentum*, accesión L-507 variedad Licato. Estos materiales se obtuvieron a partir del Sistema de Bancos de Germoplasma Vegetal de la Nación Colombiana a cargo de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica.

### Regeneración y propagación del material

Los materiales usados en esta investigación, se encontraban almacenados en forma de semilla sexual, las cuales se sembraron en un medio nutritivo MS estéril, distribuido por Aldrich a razón  $4,4 \text{ g/L}^{-1}$ ,  $1,7 \text{ mg/L}^{-1}$  de un agente gelificante (*Phytigel*) y  $30 \text{ g/L}^{-1}$  de sacarosa. En agua destilada estéril se adicionó la mezcla de sales, sacarosa, y se calibró a pH 5,7, para posterior adicción del agente gelificante, se calentó hasta ebullición para su solubilización, se sirvieron los frascos con una cantidad aproximada de 15 mL, se dejaron enfriar, se taparon y luego se colocaron en autoclave durante 15 min a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  a 220,5 PSI de presión. Las semillas de los dos genotipos se pusieron en el medio nutritivo estéril para su germinación y obtención de plántulas *in vitro*.

### Obtención de protoplastos

Posteriormente a la germinación de plántulas se realizó la multiplicación del material, del cual se tomó tejido del mesófilo para la obtención de protoplastos. El primer paso en este procedimiento consistió en un tratamiento osmótico. Después del corte de 200 mg de mesófilo, se preplasmolizaron en 20 mL de sales CPW ( $\text{NaCl}$ -1,0 mM,  $\text{KCl}$ -0,2 mM y  $\text{CaSO}_4$ -0,2 mM) con 9 % de manitol y 3 mM 2-N ácido etanosulfónico morfolina (MES) y pH ajustado a 5,8. Posteriormente, se dejó reaccionar en la oscuridad 1 h a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pasado este tiempo, se reemplazó el tratamiento plasmolizante por una cantidad igual de mezcla enzimática: 0,6 % de celulasa y 0,1 % de pectinasa a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 8 h en la oscuridad. Después del tratamiento enzimático, las hojas digeridas o células en suspensión, se diluyeron en igual volumen de solución de lavado, consistente en sales CPW,  $20 \text{ g/L}^{-1}$   $\text{KCl}$ , para su posterior filtrado y centrifugación a 600 revoluciones por 3 min. El *pellet* fue resuspendido en 10 mL de solución de lavado y se centrifugó a 600 revoluciones por 3 min. Los protoplastos se resuspendieron en 9 mL de 15 % sacarosa en sales CPW y 1 mL de solución de lavado y recentrifugado por 7 min a 600 revoluciones, para posteriores observaciones en el microscopio.

### Evaluación de especies reactivas de oxígeno

La producción de ERO, se evaluó en un citómetro de flujo EPICS XL (*Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL*). Se evaluaron entre 6 000 y 10 000 eventos (protoplastos), inducidos por los tratamientos de cobre (1 mM) y Paraquat® 1 %. Se realizaron lecturas cada 15 min durante los primeros 30 min (*eventos tempranos*) y a las 3, 24, 48 y 72 h posteriores a los tratamientos (*eventos tardíos*). Para la producción de especies reactivas de oxígeno, en forma del anión superóxido, las células se incubaron por 15 min a temperatura ambiente con dihidroetidina a una concentración final de  $0,1 \text{ } \mu\text{g/mL}$ .

### Elicitación y evaluaciones sobre materiales *ex situ*

Plántulas de *Lycopersicon hirsutum* y *Lycopersicon esculentum* se trataron con soluciones 40 mM de  $\text{CuCl}_2$  y Paraquat® 1 %. Las soluciones de cobre y Paraquat® se asperjaron sobre folíolos jóvenes de los genotipos. La unidad experimental consistió en la cosecha de folíolos de 4 plántulas a los tiempos 0, 2, 3, 24, 48 y 72 h posterior a los tratamientos. Los folíolos cosechados se pesaron e inmediatamente se maceraron a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ , para su almacenamiento a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  y posterior utilización en la evaluación del contenido de polifenoles totales y capacidad atrapadora de

radicales libres. Para la extracción de metabolitos se tomaron 100 mg por cada muestra para su posterior agitación en una agitadora durante 2 h en una solución acetona:agua 60:40. Después, se centrifugaron a 11 000 r.p.m durante 15 min y se dejaron a 25 °C por 12 h, hasta evaporación total de la acetona. Las muestras con el remanente de agua fueron llevadas a 2 mL con metanol.

### Evaluación de polifenoles totales

Se adicionó secuencialmente en cada tubo de ensayo 750 µL de agua destilada, 100 µL de muestra disuelta en metanol desde el proceso de extracción, 100 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se dejó reaccionar 6 min y se adicionaron 50 µL del reactivo *Folin* 2 N. A continuación, se agitó cada tubo en *vortex* durante 5 s e inmediatamente se guardaron en condiciones de oscuridad durante 60 min a temperatura ambiente. Paralelamente, se preparó un blanco de ensayo con 800 µL de agua destilada, 100 µL de metanol y 100 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se registró la absorción ultravioleta a 760 nm y se realizó un gráfico de absorbancia vs. concentración en µg/mL. El blanco del equipo consistió en 900 µL de agua destilada y 100 mL de metanol. Para su cuantificación se realizó una curva de calibración de ácido gálico, preparada con un rango de 1-50 µg/mL. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico GAE (µg/mL) por cada mg de extracto seco analizado.

### Evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres

Se pesaron 2,0 mg del reactivo DPPH y se llevó a un volumen de 100 mL, posteriormente se adicionaron 50 mL de metanol y se sonicó durante 5 min para su completa solubilización y traspaso a un frasco ámbar. Para la medición, se tomaron 0,5 mL de la muestra disuelta en metanol desde el proceso de extracción, y se mezcló con 1,0 mL de la solución de DPPH. Se preparó un blanco del DPPH (para el cual se tomó 0,5 mL de metanol y 1,0 mL de la solución de DPPH), un blanco de la muestra (para el cual se tomó 0,5 mL de muestra y 1,0 mL de metanol). Una vez preparados simultáneamente los ensayos, se dejó transcurrir 5 min y después se leyó la absorbancia a 517 nm. La capacidad atrapadora de radicales libres se expresó como el porcentaje de decoloración del DPPH, mediante la expresión:

$$\% \text{ de decoloración} = 1 - \left[ \frac{A_m - A_{b_m}}{A_{b_{DPPH}}} \right] \times 100$$

Donde:

A<sub>m</sub>= absorbancia de la muestra.

A<sub>b<sub>m</sub></sub>= absorbancia del blanco de la muestra.

A<sub>b<sub>DPPH</sub></sub>= absorbancia del blanco del DPPH.

### Análisis de resultados

Todos los experimentos se realizaron en 2 repeticiones independientes en el tiempo. Se hicieron los análisis de regresión lineal para la variable porcentaje células con especies reactivas de oxígeno, Anova entre ensayos y análisis de correlación de *Pearson*, en los paquetes estadísticos *SAS* y *Statgraphics Centurión* XV. Los análisis de regresión se analizaron a un nivel de significación de 0,05.

## RESULTADOS

### Producción de especies reactivas de oxígeno frente a la inducción con cobre y Paraquat®

Aunque en diversos reportes se relaciona el cobre con procesos de estrés oxidativo sobre los fotosistemas.<sup>8-16,17</sup> En general se observó que durante los eventos tempranos (los primeros 30 min), y tardíos (24-72 h), el  $\text{Cu}^{2+}$  a las concentraciones evaluadas no indujo la oxidación de la dihidroetidina en protoplastos de los genotipos *L. hirsutum* y *L. esculentum*. Lo anterior sugiere que para los 2 genotipos, los daños por efecto del cobre no se encuentran mediados por la participación de ERO, ni como daño directo ni como moléculas que participan en la señalización química. La inducción con Paraquat® durante la primera media hora mostró un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en 17,4 veces en los protoplastos de *L. hirsutum* y de 12,4 veces en *L. esculentum* con respecto a sus respectivos controles no tratados (tabla 1).

En general, durante los eventos tardíos en la inducción con Paraquat®, se observó que las pendientes de los modelos de regresión resultaron positivas, aunque los modelos no fueron significativos (datos no mostrados). Lo anterior muestra que a diferencia del tratamiento con cobre, el Paraquat® mostró una significativa producción de ERO durante la primera media hora; se observó en *L. hirsutum* y en *L. esculentum* 33 % y 25 %, respectivamente, de células que oxidan la dihidroetidina (tabla 1). Lo anterior sugiere que entre los primeros eventos de daño celular que se dan, está un choque oxidativo que puede repercutir sobre diferentes organelas, en especial sobre la mitocondria.

**Tabla 1.** Porcentaje de protoplastos con presencia de especies reactivas del oxígeno en forma del anión superóxido de *Lycopersicon hirsutum* y *Lycopersicon esculentum*, bajo tratamiento de Paraquat® 1 %, durante los primeros 30 min después de la elicitación

Tratamiento	Porcentaje
<i>Lycopersicon hirsutum</i> testigo	1,9 ± 0,007
<i>Lycopersicon hirsutum</i> - Paraquat®	33 ± 0,72
<i>Lycopersicon esculentum</i> - testigo	2 ± 0,01
<i>Lycopersicon esculentum</i> - Paraquat®	25 ± 0,54

### Contenido de polifenoles totales y capacidad atrapadora de radicales libres durante la inducción con cobre

Se observó un efecto diferencial en los 2 genotipos con respecto al contenido de polifenoles totales en respuesta a la elicitación con  $\text{CuCl}_2$  40 mM, en el cual para *L. esculentum* se obtuvo una velocidad de 1,81 Eq ácido gálico.hora<sup>-1</sup> con p mayor que 0,026, contra una pendiente negativa por parte de *L. hirsutum*. Con relación a la capacidad atrapadora de radicales libres durante los eventos tempranos, se observó un efecto diferencial entre los genotipos, en el cual *L. hirsutum* no tuvo pendiente positiva, mientras que *L. esculentum* presentó una pendiente de 5,3 % de decoloración del DPPH hora<sup>-1</sup> y un modelo altamente significativo (tabla 2).

Durante los eventos tardíos no se aprecia un efecto sobre la actividad atrapadora de radicales libres.

**Tabla 2.** Modelos de regresión del contenidos de polifenoles totales y capacidad atrapadora de radicales libres de los genotipos *Lycopersicon hirsutum* y *Lycopersicon esculentum*, durante las primeras 3 h después de la elicitación con  $\text{CuCl}_2$  40 mM

Tiempo de respuesta	Actividad	Especie	Parámetros del modelo	p-valor
0-3 h	CPFT	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	$y = 2,62143 - 0,19 \times h$	0,39
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	$y = 6,34286 + 1,81 \times h$	0,026
	CARL	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	$y = 53,5143 - 1,92 \times h$	0,82
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	$y = 75,8857 + 5,32 \times h$	0,003
24-72 h	CPFT	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	$y = 2,50833 + 0,009 \times h$	0,0628
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	$y = 2,16667 + 0,033 \times h$	0,0000
	CARL	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	$y = 44,333 + 0,45 \times h$	0,0372
		<i>Lycopersicon esculentum</i>	$y = 25,6707 + 0,81 \times h$	0,0046

CPFT: contenidos de polifenoles totales, CARL: capacidad atrapadora de radicales libres.  
Nota: Datos provenientes de 2 experimentos independientes.

### Contenido de polifenoles totales y capacidad atrapadora de radicales libres durante la inducción con Paraquat®

En general durante la elicitación con Paraquat® 1 %, los modelos de regresión para el contenido de polifenoles totales y la capacidad atrapadora de radicales libres no fueron significativos para ambos genotipos. Solo como una tendencia, se observó un efecto diferencial entre los genotipos en el cual *L. esculentum* mostró un aumento en el tiempo del contenido de polifenoles totales y de la capacidad atrapadora de radicales libres.

### Correlación entre la capacidad atrapadora de radicales libres y el contenido de polifenoles totales durante la elicitación con Paraquat®

Durante la inducción con cobre, en los eventos tempranos se observó que *L. esculentum* presentó una correlación entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad atrapadora de radicales libres, cercana a 1 y muy significativa. En la elicitación con Paraquat®, durante los eventos tempranos se aprecia una correlación cercana a 1 y p mayor que 0,029, en el genotipo *L. esculentum* (tabla 3). El análisis de los eventos tardíos no mostró correlación entre las 2 variables en ninguno de los genotipos.

**Tabla 3.** Correlaciones entre la capacidad atrapadora de radicales libres y el contenido de polifenoles totales, durante los eventos tempranos y tardíos, posterior a la elicitación con CuCl<sub>2</sub> en los genotipos *Lycopersicon hirsutum* y *Lycopersicon esculentum*

Inducción	Especie	Coefficiente de correlación - Pr > F
Cobre	<i>Lycopersicon esculentum</i>	0,99896 - 0,0290
Paraquat®	<i>Lycopersicon esculentum</i>	0,99753 - 0,0447

## DISCUSIÓN

De manera opuesta a diferentes estudios que reportan la producción de especies reactivas de oxígeno mediando procesos de muerte celular en plantas, inducidas por metales, en este trabajo se encontró que para las 2 especies estudiadas, no se observó producción de ERO, durante los tratamientos con cobre. Lo anterior muestra que para los dos genotipos, los daños por efecto del cobre no se encuentran mediados por la participación de ERO, ni como daño directo ni como moléculas que participan en la señalización química. Se encontró que la inducción con Paraquat® tiene un efecto sobre las especies de tomate, relacionado con el inicio de explosión oxidativa, especialmente durante etapas tempranas. Durante los eventos tempranos tanto en la inducción con cobre como de Paraquat®, se presentó una alta correlación entre CPFT Y CARL para *L. esculentum*. Durante los eventos tardíos no se observó una respuesta por parte de *L. esculentum* para ninguna de las variables; mientras que *L. hirsutum* mostró un leve incremento del contenido de polifenoles totales durante los eventos tardíos, lo cual sugiere que las respuestas asociadas a estrés oxidativo se desarrollan sobre todo durante las primeras horas posteriores a la inducción. Los resultados (en los que se observa una alta y significativa correlación entre CPFT y CARL, para *L. esculentum* en la inducción con Paraquat® durante los primeros 30 min), aunque podrían sugerir que el comportamiento esté dirigido hacia la estabilización de especies reactivas de oxígeno como un mecanismo respuesta a su producción, muestran de manera opuesta que esa biosíntesis de polifenoles con actividad antioxidante *in vitro*, no necesariamente se encuentre relacionada con una actividad antioxidante como un mecanismo de defensa a nivel celular y que ese fenómeno quizá se deba a la activación de la ruta fenilpropanoide para otros fines; como por ejemplo la producción de metabolitos secundarios de estrés o el reforzamiento de pared celular. Lo anterior se sustenta en el hecho de que también se observó correlación entre CPFT y CARL, durante la inducción con cobre en la cual no se observaron procesos de producción de ERO.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann Rev Plant Biol.* 2004;55:373-99.
2. Langebartels C, Wohlgenuth H, Kschi-eschan S, Grün S, Sandermann H. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol Biochem.* 2002;40:567-75.
3. Díaz S. Estudio de la expresión de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión de *Arabidopsis thaliana* y su función en la patogénesis [Tesis doctoral]. Barcelona: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Unidad de Ciencias, Universidad Autónoma; 2004.



4. Apostol I, Heinstejn P, Low P. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* 1989;90:106-16.
5. Van Breusegem F, Vranova E, Dat J, Inze D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 2001;161:405-14.
6. Allan A, Fluhr R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell.* 1997;9:1559-72.
7. Bolwell G, Davies D, Gerrish C, Auh C, Murphy T. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol.* 1998;116:1379-85.
8. Ke S. Effects of copper on the photosynthesis and oxidative metabolism of *Amaranthus tricolor* seedlings. *Agric Sci China.* 2007;6:1182-92.
9. Burda K, Kruk J, Strzalka K, Schmid G. Stimulation of oxygen evolution in photosystem II by copper II ions. *Z Naturforsch.* 2002;57c:853-7.
10. Yruela I, Pardo J, Alonso P, Picoreas R. Photoinhibition of Photosystem II from Higher Plants. Effect of copper inhibition. *J Biol Chem.* 1996;271:27408-15.
11. Duke S. Herbicide physiology. In: *Weed physiology*. Vol. II. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc; 2000.
12. Karp G. Señalización celular y transducción de señales: comunicación entre células. En: *Biología celular y molecular*. 4ta edición. México: Ed. Mc Graw Hill; 2006.
13. Álvarez M, Espinosa F. Jasmonatos y salicilatos: Fitohormonas clave en las reacciones de defensa de las plantas y de comunicación en el ecosistema. En: *La ecofisiología vegetal: una ciencias de síntesis*. España: Thomson Editores; 2004.
14. Gould K, Lister C. Flavonoid functions in plants. In: *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, United States of America: CRC Press, Taylor and Francis Group; 2006.
15. Hammerschmidt R. Antioxidants and the regulation of defense. *Physiological and Mol Plant Pathol.* 2005;66:211-2
16. Mlísková K, Luhová L, Lebeda A, Mieslerová B, Pec P. Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiol Biochem.* 2004;42:753-61.
17. Narendranath M, Imre V, Sandor D. Copper toxicity affects Photosystem 11 electron transport at the secondary quinone acceptor, QB1. *Plant Physiol.* 1989;90:175-9.

Recibido: 21 de junio de 2011.

Aprobado: 17 de febrero de 2012.

Antoni Rueda Lorza. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín-Colombia. Correo electrónico: [antonyrueda@yahoo.es](mailto:antonyrueda@yahoo.es)