



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

**Bases bioquímiques de resistència
a *Penicillium expansum* en poma**

Memòria presentada per:

M. Carme Valentines i Escolà

Per optar al grau de Doctora Enginyera Agrònoma

Director: Christian Larrigaudière

Tutora: Immaculada Viñas Almenar

Lleida, juny de 2005

La present memòria que porta per títol ‘Bases bioquímiques de resistència a *Penicillium expansum* en poma’ constitueix la memòria que presenta **M. Carme Valentines i Escolà**, estudiant del programa de Tecnologia d’Aliments de la Universitat de Lleida, per a optar al grau de Doctora. La part experimental del programa de doctorat s’ha realitzat en el centre UdL-IRTA sota la direcció de **Dr. Christian Larrigaudière** i ha actuat com a tutora per part de la Universitat de Lleida la professora **Dra. Immaculada Viñas Almenar**. Ambdós autoritzen la presentació de la citada memòria de tesi degut a que reuneix les condicions necessàries per a la seva defensa.

M. Carme Valentines i Escolà
Doctoranda

Christian Larrigaudière
Director de tesi

Immaculada Viñas Almenar
Tutora acadèmica

Lleida, juny 2005

Als meus pares

ARA MATEIX

Ara mateix enfilo aquest agulla
amb el fil d'un propòsit que no dic
i em poso a apedaçar. Cap dels prodigis
que anunciaven taumaturgs insignes
no s'ha complert, i els anys passen de pressa.
De res a poc, i sempre amb vent de cara,
quin llarg camí d'angoixa i de silencis.
I som on som; més val saber-ho i dir-ho
i assentar els peus en terra i proclamar-nos
hereus d'un temps de dubtes i renúncies
en què sorolls ofeguen les paraules
i amb molts miralls mig estraferm la vida.
De res no ens val l'enyor o la complanta,
ni el toc de displicent malenconia
que ens posem per jersei o per corbata
quan sortim al carrer. Tenim a penes
el que tenim i prou: l'espai d'història
concreta que ens pertoca, i un minúscul
territori per viure-la. Posem-nos
dempeus altra vegada i que se senti
la veu de tots solemnement i clara.
Cridem qui som i que tothom ho escolti.
I en acabat, que cadascú es vesteixi
com bonament li plagui, i via fora!,
que tot està per fer i tot és possible.
(...)

Miquel Martí i Pol

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi no hagués estat possible sense l'ajuda i encoratjament de moltes persones i institucions. Agrair-los tota aquesta feina és una tasca molt difícil de dur a terme i sembla que mai pugui ser suficient.

En primer lloc, al Christian Larrigaudière, director d'aquesta tesi, per haver-me introduït al fascinant món de la recerca, dipositant en mi la confiança necessària per a realitzar aquest treball. Gràcies per haver-me donat suport i ajuda en els moments de dubtes i també en els bons moments. I sobretot gràcies per l'entusiasme i l'alegria que m'has transmès en el treball.

A la Immaculada Viñas, tutora d'aquesta tesi, per donar els consells i les paraules d'ànims necessaris en el moment just.

Al Josep Usall i la Charo Torres, per la seva gran ajuda en la redacció dels articles, per la seva disponibilitat per les reunions 'd'urgència', per tenir sempre un moment per atendre les meves qüestions i pel recolzament més que demostrat a aquesta tesi.

A la Rosa i la Diana, les meves companyes de tesi, més que companyes: amigues. Pel seu suport moral, les seves estones genials i les frenètiques hores treballades conjuntament. Una amistat per sempre.

A la Gemma Reig, la Gemma Echeverria, la Tere i la Carmen, per la seva ajuda en el laboratori, pel seus consells, per les estones de gresca al laboratori i el caliu en el treball.

Al Just Salas, per la seva ajuda tècnica.

A les companyes de patologia, per les bones estones passades i la seva ajuda fent els screenings.

Al Josep M. Florensa, pel seu interès en el disseny de la portada.

To Ian Ferguson, for giving me the opportunity to work with the best team in an excellent experiment.

To Andy and Judith, thank you for helping me, their great sense of humour and giving me the chance to know New Zealand and the kiwis.

To Sean, Miva, Cecilia, Richard and Anne Catherine, for the pleasant atmosphere inside and outside Hort. To Caroline, for making me feel like at home.

To HortResearch, for its warm welcoming and technical support.

A l'INIA, pel seu ajut econòmic.

A l'IRTA, pel seu suport en la realització d'aquesta tesi.

Als meus pares, pel seu suport incondicional i la seva paciència. No hi ha prou paraules per expressar el meu agraïment. Al Vicenç, sense fer-se notar, però sempre al meu costat. I a la resta de família que durant aquest temps m'han animat amb paraules senzilles.

Al Dani, per les moltes qualitats que ha hagut de tenir a més de paciència, bon humor i comprensió. Gràcies per motivar-me en tot moment i gràcies per creure en mi.

A tots, moltes gràcies.

Aquest treball ha estat realitzat en el laboratori de Fisiologia i Bioquímica de l'Àrea de Postcollita del Centre UdL-IRTA, rebent el finançament de l'INIA.

RESUM

L'objectiu principal d'aquesta tesi era l'estudi dels mecanismes bioquímics que determinen la resistència de les pomes contra un atac de *Penicillium expansum*. Els diferents estudis es van centrar en determinar el paper que el peròxid d'hidrogen juga en la resistència, directament o com a inductor d'altres processos també involucrats en la resistència dels fruits, com és la lignificació. Es van estudiar també les possibles relacions entre la capacitat d'enfosquiment enzimàtic del fruit i la resistència. D'altra banda, i amb els objectius de comprovar els resultats obtinguts en fruits sencers i d'establir un model d'interpretació, es va utilitzar un cultiu cel·lular de poma. Tots aquests estudis tenien com finalitat determinar les mecanismes bioquímics claus involucrats en la resistència a *P. expansum* i proposar un marcador de susceptibilitat en pomes.

Els resultats presentats en aquesta tesi demostren la participació del peròxid d'hidrogen en la resistència, ja que s'observava una acumulació d'aquest compost en fruits en resposta a l'atac fúngic. Aquesta acumulació era present en fruits immadurs (fruits resistents), però no en els fruits madurs (fruits sensibles). En fruits sencers, la generació de peròxid d'hidrogen estava determinada per un increment en l'activitat de l'enzim superòxid dismutasa (SOD) i una disminució dels enzims involucrats en la degradació del peròxid d'hidrogen, especialment de la peroxidasa (POX).

Els resultats obtinguts en el model *in vitro* confirmen la intervenció del peròxid d'hidrogen en el procés de resistència segons un model d'interacció de tipus compatible. En aquest model, l'acumulació del peròxid estava principalment determinada per l'acció de l'enzim NADPH oxidasa, mentre que els altres enzims (SOD, CAT i POX) eren secundaris. Quan el cultiu cel·lular de poma s'inoculava amb suspensió aquosa de *P. expansum* filtrada, el model es comportava com un model d'interacció de tipus incompatible, fet que mostra l'existència d'un inductor hidrosoluble en el patogen que pot promoure l'acumulació de peròxid d'hidrogen.

Els resultats obtinguts en fruit sencer, també demostren que el peròxid d'hidrogen actua principalment promovent l'acumulació de lignines en la zona ferida, i que el procés d'enfosquiment enzimàtic no està vinculat a la resistència dels fruits.

Els canvis metabòlics descrits amb anterioritat semblen ésser induïts principalment per l'acció de la ferida i no són constitutius. Com a conseqüència, cap d'aquests paràmetres podria ser utilitzat com a marcador de susceptibilitat del fruit a la collita.

RESUMEN

El principal objetivo de la presente tesis era el estudio de los mecanismos bioquímicos que determinan la resistencia de las manzanas contra un ataque por *Penicillium expansum*. Los diversos estudios se centraron en determinar el papel que el peróxido de hidrógeno juega en la resistencia, directamente o como inductor de otros procesos también involucrados en la resistencia de los frutos, como es la lignificación. Se estudiaron también las posibles relaciones entre la capacidad de empardecimiento enzimático del fruto y la resistencia. Por otro lado, y con los objetivos de comprobar los resultados obtenidos en fruto entero y de establecer un modelo de interpretación, se utilizó un cultivo celular de manzana. Todos estos estudios tenían como finalidad determinar los mecanismos bioquímicos clave involucrados en la resistencia a *P. expansum* y proponer un marcador de susceptibilidad de las manzanas.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran la participación del peróxido de hidrógeno en la resistencia, ya que se observaba una acumulación de este compuesto en frutos en respuesta al ataque fúngico. Esta acumulación se daba en frutos inmaduros (frutos resistentes), pero no en los frutos maduros (frutos sensibles). En frutos enteros, la generación de peróxido de hidrógeno estaba determinada por un incremento de actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y una disminución de las enzimas involucradas en la degradación del peróxido de hidrógeno, especialmente de la peroxidasa (POX).

Los resultados obtenidos en el modelo *in vitro* confirman la intervención del peróxido de hidrógeno en el proceso de resistencia según un modelo de interacción de tipo compatible. En este modelo, la acumulación del peróxido estaba principalmente determinada por la acción de la enzima NADPH oxidasa, mientras que las otras enzimas (SOD, CAT y POX) eran secundarias. Cuando el cultivo celular de manzana se inoculaba con una suspensión acuosa de *P. expansum* filtrada, el modelo se comportaba como un modelo de interacción de tipo incompatible, hecho que muestra la existencia de un inductor hidrosoluble en el patógeno que puede promover la acumulación de peróxido de hidrógeno.

Los resultados obtenidos en fruto entero, también muestran como el peróxido de hidrógeno actúa promoviendo la acumulación de ligninas en la zona dañada y que el proceso de empardecimiento enzimático no está relacionado con la resistencia de los frutos.

Los cambios metabólicos descritos anteriormente parecen ser inducidos principalmente por la acción de la herida y no son constitutivos. En consecuencia, ninguno de estos parámetros podría ser utilizado como marcador de susceptibilidad del fruto a la cosecha.

SUMMARY

The main objective of this thesis was to study the biochemical mechanisms that determine the resistance of apple in response to an attack by *Penicillium expansum*. Emphasis was given in determining the role that hydrogen peroxide played in the resistance, directly or in relation to the induction of other processes also involved in fruit resistance, such as lignification. The possible relationship between the enzymatic browning potential of the fruit and resistance was also studied. On the other hand, studies on apple cell suspension were also carried out in order to verify the results obtained in whole fruit and establish an interpretation model. The purposes of all these studies were to determine the key biochemical mechanisms involved in the resistance to *P. expansum* and to propose a marker of apple susceptibility.

As shown in our results, hydrogen peroxide appeared to play an underlying role in resistance, because an accumulation of this compound was observed in response to the fungal attack. This accumulation was detected in immature fruit (resistant fruit) but not in mature fruit (susceptible fruit). In whole fruit, the generation of hydrogen peroxide was mainly determined by the increase of superoxide dismutase enzyme activity (SOD) but also by a decrease of H₂O₂-scavenging enzymes, especially peroxidase (POX).

The results obtained in the *in vitro* model confirmed the contribution of hydrogen peroxide in the resistance process according to a compatible interaction model. In this model the accumulation of the peroxide was mainly determined by the action of NADPH oxidase enzyme, whereas the other enzymes (SOD, CAT and POX) were secondary. When apple cell suspension was inoculated with the filtered aqueous suspension of *P. expansum*, the model behaved as an incompatible model, showing the existence of a pathogen-related hydrosoluble elicitor that may also elicits the accumulation of hydrogen peroxide.

The results obtained in whole fruit also showed that hydrogen peroxide is mainly involved in defence mechanism through its action on lignin accumulation and that the enzymatic browning process was not linked to fruit resistance.

All the parameters involved in apple resistance were not constitutive and appeared to be triggered by the wounding response. In consequence, none of these parameters could be used to predict the fruit susceptibility at harvest.

ABREVIATURES

AA	Àcid Ascòrbic
ANOVA	Anàlisi de Variança
APX	Ascorbat Peroxidasa
BSA	Bovine Serum Albumine
CAT	Catalasa
DCFH-DA	Dichlorofluorescein Diacetate
DPI	Diphenyleneiodonium
EDTA	Ethylendiamine Tetraacetic Acid
HR	Resposta Hipersensible
LSD	Least Significant Difference
NAD(P)H	Nicotinamina Adenina dinucleòtid fosfat (forma reduïda)
NBT	Nitroblue Tetrazolium
PDA	Potato Dextrose Agar
POX	Peroxidasa
PPO	Polifenol oxidasa
PR	Relacionades amb la Patogènesi
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
ROS	Reactive Oxygen Species
SAR	Resistència Sistèmica Adquirida
SOD	Superoxid Dismutasa
SSC	Soluble Solid Concentration
U.a.	Unitats d'activitat

ÍNDEX

Introducció general	1
1. Trets bàsics de la postcollita de la poma	3
1.1. Principals malalties en postcollita de poma	3
1.2. La podridura blava: <i>Penicillium expansum</i>	4
2. Tipus de resistència de les plantes davant d'un atac patogen	6
3. El procés d'infecció	7
3.1. Inoculació	7
3.2. Penetració	7
3.3. Establiment d'infecció i colonització	8
4. Mecanismes de defensa del fruit	8
5. Defenses constitutives	9
5.1. Defensa estructural	9
5.1.1. Hidrofobicitat	9
5.1.2. Topografia no apropiada	9
5.1.3. Parets cel·lulars resistents	10
5.2. Defensa química	11
5.2.1. Les fitoanticipines	11
5.2.2. L'enfosquiment enzimàtic com a possible mecanisme de defensa	11
6. Defenses induïdes per un atac patogen	12
6.1. Cronologia de les reaccions provocades per un atac patogen	12
6.2. Estadi I: Producció d'espècies actives d'oxigen	13
6.2.1. Les espècies actives d'oxigen	13
6.2.2. El sistema antioxidant	14
6.2.3. Producció de ROS durant la patogènesi	16

6.2.4. Característiques de l'explosió oxidativa	17
6.2.5. Funcions de les ROS en la resistència a malalties	18
6.3. Estadi II: Processos de resistència	20
6.3.1. Canvis en el flux de Ca ²⁺ de la membrana cel·lular	20
6.3.2. Producció de fitoalexines	21
6.3.3. Increment de l'activitat antioxidant	22
6.3.4. Resistència sistèmica adquirida	23
6.3.5. Reforçament de la paret cel·lular	24
6.3.6. Proteïnes relacionades amb la patogènesi	25
6.4. Estadi III: Processos degradatius	26
6.4.1. Resposta hipersensible	26
6.4.2. Peroxidació de lípids	27
7. Referències	29
Objectius	41
Objectives	45
Capítol 1	47
Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit	
Capítol 2	61
Production of reactive oxygen species in cultured apple fruit cells inoculated with <i>Penicillium expansum</i>	

Capítol 3 _____ **81**

Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance

Capítol 4 _____ **99**

Specific effects of wounding on hydrogen peroxide and lignin contents in different apple cultivars and its relationship with disease resistance

Discussió general _____ **115**

1. El paper del H_2O_2 en el procés de resistència _____ 117
2. Fonts de generació de H_2O_2 _____ 119
3. La lignificació com a mecanisme de resistència _____ 121
4. L'enfosquiment enzimàtic com a mecanisme de resistència _____ 122
5. Model d'interacció poma-*Penicillium expansum* _____ 122
6. Marcadors de resistència _____ 123
7. Referències _____ 125

Conclusions _____ **129**

Conclusions _____ 135

Perspectives de futur _____ **137**

Introducció general

Objectius

Capítol 1

Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit

R Torres, MC Valentines, J Usall, I Viñas, C Larrigaudière

47

Postharvest Unit, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Av. Rovira Roure 191,
25198 Lleida, Catalonia, Spain

Publicat a:
Postharvest Biology and Technology, 27:235-242. 2003

Capítol 2

Production of reactive oxygen species in cultured apple fruit cells inoculated with *Penicillium expansum*

MC Valentines¹, AC Allan², JH Bowen², IB Ferguson²,
C Larrigaudière¹

61

¹Postharvest Unit, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Av. Rovira Roure 191, 25198
Lleida, Catalonia, Spain

²HortResearch, Private Bag 92169, Auckland, New Zealand

Enviat a:
Physiologia Plantarum

Capítol 3

Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance

MC Valentines, R Vilaplana, R Torres, J Usall, C Larrigaudière

Postharvest Unit, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Av. Rovira Roure 191,
25198 Lleida, Catalonia, Spain

81

Publicat a:
Postharvest Biology and Technology, 36:227-234. 2005

Capítol 4

Specific effects of wounding on hydrogen peroxide and lignin contents in different apple cultivars and its relationship with disease resistance

MC Valentines, G Reig, R Vilaplana, C Larrigaudière

99

Postharvest Unit, CeRTA, Centre UdL-IRTA, Av. Rovira Roure 191,
25198 Lleida, Catalonia, Spain

Enviat a:
European Journal of Plant Pathology

Discussió general

Conclusions

Perspectives de futur

1. TRETOS BÀSICS DE LA POSTCOLLITA DE LA POMA

La qualitat de la fruita fresca ve predeterminada per múltiples factors, tal com la varietat, el poder nutritiu, l'apreciació sensorial i l'estat fisiològic, entre altres. Per mantenir aquests atributs, l'emmagatzematge de la fruita fresca sota un rigorós control resulta una premissa ineludible si es desitja conservar la qualitat inicial de la fruita al llarg de la seva vida comercial fins arribar al consumidor. La ràpida refrigeració després de la collita, en particular, permet disminuir la incidència dels danys degut a patògens i l'envelliment dels fruits.

Les pèrdues produïdes en la fruita destinada a l'emmagatzematge poden ser degudes als microorganismes, a diverses fisiopaties i als processos de deshidratació. Aquestes pèrdues es calculen que són del voltant del 10% de la fruita emmagatzemada (Palazón et al., 1984). L'elevat contingut aquós de la fruita fresca la fa altament vulnerable als atacs per microorganismes, provocant entre 2,5-3% de les pèrdues durant l'emmagatzematge (Palazón et al., 1984). Les seves conseqüències poden anar des d'un deteriorament acceptable i una pèrdua de valor comercial assumible, fins a danys irreparables que inutilitzen el producte per al seu consum.

Aquest estudi s'ha centrat, principalment, en la poma varietat 'Golden Delicious' degut a l'amplitud del seu mercat, tant en les nostres terres com a la resta de Catalunya i d'Espanya. Tot i que la superfície destinada a l'explotació de pomeres del grup Golden ha disminuït al voltant d'un 35% en els últims anys (MAPA, 2002), aquesta superfície representa gairebé el 60% de la superfície total de la zona fruítera de Lleida (DARP, 2001) mentre que a Espanya està al voltant del 46% (MAPA, 2002).

1.1. PRINCIPALS MALALTIES EN POSTCOLLITA DE POMA

Penicillium expansum és el fong causant de la podridura blava, malaltia que pot arribar a causar entre el 80 i el 90% de les pèrdues provocades per malalties durant la frigoconservació (Viñas i Usall, 2000). No obstant, aquesta incidència s'ha vist reduïda fins a l'1% degut a l'ús dels nous sistemes d'emmagatzematge, com són la frigoconservació prop de 0°C, les atmosferes controlades i alguns tractaments postcollita. Aquest fong es troba de manera generalitzada i constant al llarg de cada campanya en tots els països productors de poma, raó que fa molt interessant el seu estudi com a model d'agent causant de malalties. Degut que aquest estudi es basa en aquest fong, el tipus d'infecció que causa i on es troba present s'explicarà de manera més àmplia en el següent apartat.

La podridura gris, causada per *Botrytis cinerea*, és la segona malaltia per ordre d'importància en poma. Aquesta malaltia es difon més ràpid que altres podridures a temperatures de refrigeració i es pot propagar des dels fruits infectats als fruits sans durant l'emmagatzematge (Montesinos, 2000). Les infeccions comencen normalment en ferides o en el mateix peduncle i s'identifica com una necrosi de color marró pàl·lid amb marges difusos. Encara que els fruits es poden contaminar també durant els processos de manipulació, l'inòcul procedeix del camp i dels residus orgànics de les caixes i contenidors (Montesinos, 2000).

La podridura per *Alternaria* no suposa grans pèrdues comercials tot i que es present a tot el món i pot afectar tant a fruits de llavor com a fruits d'os. Aquesta podridura es caracteritza per unes lesions rodones, marrons o negres, seques, dures i molt superficials. *A. alternata* pot infectar els fruits tant abans com després de la recol·lecció. El fong infecta els fruits a través de teixits debilitats, senescents o danyats mecànicament (Bonaterra, 2000).

Tot i afectar més a la fruita d'os, *Rhizopus* pot causar infeccions en poma. L'entrada del fong és a través d'una ferida i inicialment presenta formes de línia recta o bé trencada. El fruit infectat es torna tou degut a una descomposició del teixit a mesura que avança el desenvolupament de la podridura (Usall i Viñas, 2000).

Altres fongs que també poden causar malalties, considerades de menor importància, en pomes són *Cladosporium*, *Mucor*, *Aspergillus* i *Trichothecium*.

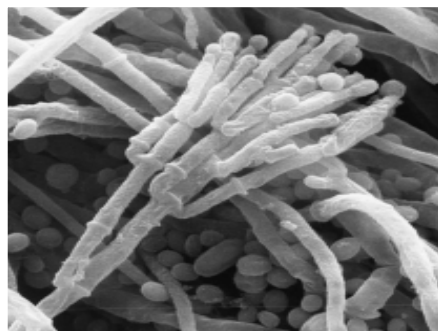
1.2. LA PODRIDURA BLAVA: *Penicillium expansum*

Com ja s'ha dit anteriorment, aquest estudi es basa en la podridura blava degut a la importància de les pèrdues que causa en el sector fructícola.

P. expansum es considera un paràsit de ferida que generalment infecta el fruit a través de danys mecànics recents ocasionats per una mala manipulació, per insectes o per les pròpies branques de l'arbre (Eckert, 1978). Ocasionalment les lenticel·les també poden ser punts d'entrada del paràsit, especialment si han existit alternances d'excessos i carències d'aigua prèvies a la collita, o bé quan la fruita s'ha debilitat per la maduració i senescència (Baker i Heald, 1934).

Les espores de *P. expansum* poden sobreviure de campanya a campanya en contenidors contaminats o en les parets de les càmares, on el fong pot créixer i produir grans quantitats d'espores (Spotts i Cervantes, 1986). La contaminació amb aquestes espores pot provenir també d'altres fonts, com poden ser la terra present en contenidors del camp, fruita en procés d'infecció o bé l'aire. La inoculació dels fruits destinats a emmagatzematge pot ocórrer principalment durant els banys per al tractament contra l'escaldat superficial, on la concentració d'espores

presentes a l'aigua va creixent si l'aigua del drencher no es canvia regularment (Spotts i Cervantes, 1986). Una altra font de contaminació podria ser l'aigua que s'utilitza en les centrals per al maneig de la fruita.



Fotografia 1: Conidiòfor de *Penicillium expansum* després de 72 h d'incubació sobre poma 'Golden Delicious' (x 2640)

La malaltia provocada per *P. expansum* es caracteritza per l'aparició d'àrees podrides toves, aquoses i de color marró clar. La superfície de les lesions més antigues poden estar cobertes per espores d'un color verd-blavós, que inicialment són de color blanc. La consistència tova i aquosa del teixit podrit és una millor característica distintiva que el seu color. Per al reconeixement de *P. expansum* dos característiques són de gran importància: l'olor a florit i la formació de conidiòfors en forma de pinzell en lesions ben desenvolupades. En condicions d'emmagatzematge en fred les podridures causades per *P. expansum* poden arribar a créixer fins a uns 3 cm de diàmetre en unes 8-10 setmanes després de la infecció.



Fotografia 2: Podridura blava causada per *Penicillium expansum* en pomes 'Golden Delicious'

Com en moltes altres malalties, una ràpida refrigeració i l'emmagatzematge de la fruita redueixen el desenvolupament de la podridura blava. Les baixes temperatures tenen un efecte inhibitori molt més gran en l'inici de la infecció que en el desenvolupament de la podridura. Tradicionalment, per a combatre *P. expansum* s'ha tractat la fruita amb fungicides, el més utilitzat és imazalil. No obstant, aquesta podridura es pot tractar amb altres mètodes i procediments, que també es poden combinar per a una millora de la seva acció. Aquests procediments inclouen evitar les condicions favorables a la infecció, com per exemple reduir els contenidors contaminats amb terra del camp, renovació de l'aigua dels banys, collita de la fruita a la maduresa òptima, entre altres. També s'han d'evitar els danys als fruits amb una correcta manipulació. Els tractaments alternatius complementaris que es poden fer en les centrals hortofructícoles poden ser integrats o bé biològics. Els primers inclouen tractaments amb calci i aire calent mentre que el control biològic es realitza amb microorganismes antagonistes a *P. expansum*, com poden ser els ja comercials BioSave 110TM i Aspire (Viñas i Usall, 2000; Nunes et al., 2002).

2. TIPUS DE RESISTÈNCIA DE LES PLANTES DAVANT D'UN ATAC PATOGEN

Les plantes estan constantment en contacte amb una gran varietat de patògens en el seu ambient. No obstant, el desenvolupament de malalties en plantes és més una excepció que no una regla degut a l'efectivitat d'uns sistemes coordinats de defenses actives i passives de les pròpies plantes (Heath, 1996). Aquestes defenses limiten generalment que un patògen arribi a l'hoste i pugui causar malaltia a una part o la totalitat de la planta.

La resistència de les plantes enfront a un patògen es pot dividir en dos grans grups. La resistència bàsica o no específica, que és una resposta a totes les races d'un mateix patògen i esdevé en totes les varietats d'una mateixa espècie. D'altra banda, la resistència específica que depèn de la presència d'un gènere patògen específic, d'una varietat en particular, o d'ambdós a la vegada.

La resistència no específica, també denominada horitzontal, es basa en defenses passives, que estan altament coordinades i són molt similars per a totes les interaccions planta-patògen. Aquest tipus de resistència inclou l'expressió de múltiples gens, que pertanyen tant a la planta com al patògen. Aquest tipus de resistència no evita que la planta sigui infectada, sinó que retarda el desenvolupament d'aquesta infecció, fet que comporta una interacció compatible (Agrios, 1999). Una altra característica és que generalment hi ha algun grau de resistència horitzontal en les plantes.

La resistència específica o vertical es controlada per un o pocs gens. Aquests gens són els que controlen principalment la interacció planta-patogen i per tant juga un paper més important en l'expressió de resistència. Aquesta resistència limita l'inòcul inicial i respon com una interacció incompatible (Agrios, 1999).

Un altre tipus de resistència que també es pot trobar és la resistència aparent. Aquesta resistència és típica de plantes susceptibles, però que han tolerat o defugit la malaltia degut a que els factors necessaris per a que aquesta es produeixi no han coincidit en el temps (Agrios, 1999). Aquests factors són una planta susceptible, un patogen virulent i un ambient favorable.

3. EL PROCÉS D'INFECCIÓ

El procés de infecció d'un patogen a una planta es pot dividir en les següents etapes: inoculació, penetració i colonització. S'explicarà breument en què consisteix cada pas.

3.1. INOCULACIÓ

La inoculació és el procés en que el patogen entra en contacte amb la planta hoste. Els patògens utilitzen gran varietat d'estímuls, com per exemple indicacions topogràfiques de la superfície de la planta, per a identificar un punt d'entrada que s'ajusti a les seves característiques. Un cop reconeix el punt d'entrada comença la formació de l'apressori, una estructura especialitzada per a la penetració dins de l'hoste (Podila et al., 1993).

3.2. PENETRACIÓ

Els patògens en general, i més concretament és el cas de *P. expansum*, necessiten una via oberta per a poder entrar en l'hoste. Les vies d'entrada més comuns són els porus estomatsals i les ferides. Però els patògens fúngics també poden penetrar directament exercint una pressió i tot seguit es produeix una degradació de la cutícula i de la paret cel·lular de l'hoste, mitjançant enzims propis del patogen com són cutinasa, cel·lulasa, pectinasa i proteasa (Mendgen et al., 1996).

3.3. ESTABLIMENT D'INFECCIÓ I COLONITZACIÓ

Per a que una infecció tingui èxit és necessari l'establiment d'una relació entre el patogen i l'hoste. Aquesta relació dependrà del tipus de patogen que estigui infectant a l'hoste, i pot ser biòtrof (establiment d'infecció en teixit viu), necròtrof (establiment d'infecció en cèl·lules que prèviament ha mort el patogen utilitzant toxines) o bé hemibiòtrof (utilitza tàctiques dels dos tipus anteriors). *P. expansum* és un patogen necròtrof que no produeix estructures de penetració especialitzades però segrega toxines que degraden la paret cel·lular, permetent a les hifes penetrar a l'interior de la cèl·lula.

Els necròtrofs afecten molt poc a la fisiologia de les plantes degut que abans de la colonització maten les cèl·lules de l'hoste. Contràriament, els patògens biòtrofs poden modificar la fisiologia de les plantes, com ara la respiració, la fotosíntesi, la transpiració, el creixement i el desenvolupament (Luttrell, 1974).

4. MECANISMES DE DEFENSA DEL FRUIT

El fruit, com les plantes en general, disposa de mecanismes de defensa per a lluitar contra una infecció patògena. Aquesta capacitat s'utilitzarà en funció del tipus d'atac que el patogen realitzi (Taula 1).

Taula 1: Mecanismes de defensa usats per la planta en relació al tipus d'atac patogen (Agrios, 1999)

PATOGEN	PLANTA HOSTE
Penetració amb pressió	Complexitat de paret cel·lular i cutícula
Penetració amb enzims	Suberització, enzims antifúngics (quitinases i glucanases) Desactivació dels enzims del patogen
Toxines	Destoxificació enzimàtica
Reguladors del creixement i factors de virulència generals	Defensa bioquímica (Fitoalexines, resposta hipersensible, fenols)

Com es pot observar en la taula, els mecanismes de defensa dels quals disposa la planta són diversos. Un primer grup serien els mecanismes constitutius o preexistents, entre els que es troben l'estructura de la paret cel·lular i la cutícula (Ride, 1983). Aquests mecanismes poden ser també induïts per l'atac patogen i inclouen reaccions tan diverses com la formació de fitoalexines (Kuč, 1995), la reacció hipersensible (Lamb i Dixon, 1997) i l'activació dels enzims relacionats amb la patogènesi (van Loon et al., 1994).

Degut a la seva complexitat i importància contra l'atac patogen, els mecanismes de defensa s'estudiaran més detalladament en els apartats següents.

5. DEFENSES CONSTITUTIVES

Com ja s'ha apuntat abans les defenses constitutives o passives es poden dividir en estructurals o físiques i químiques.

5.1. DEFENSA ESTRUCTURAL

La primera resistència que troba un patogen és en la superfície del fruit. La superfície té una sèrie de característiques que fan més difícil la penetració patògena.

5.1.1. Hidrofobicitat

Per molts patògens l'acoblament i la germinació són característiques essencials per a una infecció amb èxit. Per tant, les espores o tubs germinals que no es poden adherir a una superfície hidrofòbica no poden iniciar la infecció. Tot i això, hi ha patògens que han adoptat mesures per a poder-ho fer (Wessels, 1996).

5.1.2. Topografia no apropiada

La topografia de la superfície influeix el creixement del tub germinal del patogen (Mendgen *et al.*, 1996), per tant, si la morfologia no és l'adequada o el patogen no la reconeix, el fruit és més resistent.

5.1.3. Parets cel·lulars resistents

Si el patogen s'ha pogut acoblar i germinar, per a completar la penetració encara es troba amb una gran barrera, que ve donada per la complexa paret cel·lular. La paret cel·lular està constituïda per diversos elements, que depenent del seu gruix i la seva duresa donen més o menys resistència a la cèl·lula (Agrios, 1999).

El primer component important és la cutícula, formada per cutina. El polímer de cutina és molt difícil de degradar enzimàticament. Les ceres incorporades a aquesta capa dificulten la difusió d'enzims degradants de la paret cel·lular (Moerschbacher i Mendgen, 2000). En cirera, s'ha mostrat que la resistència a la infecció per *Monilinia fructicola* estava correlacionada amb el gruix de la cutícula i de la paret cel·lular (Adaskaveg et al., 1991). Michailides i Johnson (1992) van obtenir uns resultats similars en nectarines, on el desenvolupament d'infeccions latents de *M. fructicola* s'incrementava quan el gruix de la cutícula de la fruita disminuïa.

La suberina, polímer químicament relacionat amb la lignina i la cutina, es comporta de manera similar a la cutina (Moerschbacher i Mendgen, 2000).

Una vegada el patogen trenca la cutícula, aquest actuarà física i químicament sobre la paret cel·lular. La millor prevenció contra la degradació enzimàtica de pectines i hemicel·luloses és canviar químicament els substrats dels enzims microbians. De la mateixa manera, la millor protecció contra la penetració per pressió és incrementar la força de la paret cel·lular mitjançant enllaços interpolimèrics (Moerschbacher i Mendgen, 2000). Una revisió recent realitzada per Vorwerk i col·laboradors (2004) evidencia la importància dels polisacàrids de la paret cel·lular, ja que una variació genètica en la composició dels polisacàrids pot comportar una alteració en la resistència de les plantes.

La lignina és un altre polímer molt important que dona força a les parets cel·lulars enfront a un patogen, ja que es comporta com una barrera per a la disponibilitat d'aigua i nutrients per als patògens. Aquesta característica, però, és un problema per a la mateixa cèl·lula, ja que també ella mateixa queda aïllada del subministrament d'aigua i nutrients procedents d'altres llocs de la mateixa planta (Moerschbacher i Mendgen, 2000).

La silicona també podria incrementar la resistència als patògens (Moerschbacher i Mendgen, 2000). El contingut en silicona en arròs està aparentment relacionat amb la resistència a *Pyricularia oryzae*, amb suplementacions al sòl amb silicats incrementa tant el contingut en silicona com la resistència de les cèl·lules d'arròs (Akai i Fukutomi, 1980).

Finalment, els nivells de cations com Ca^{2+} i Mg^{2+} s'han associat amb la resistència. El calci és important en l'estructura de la paret cel·lular degut a que forma enllaços entre grups carboxílics dels components pèctics (Ride, 1983). Conway i col·laboradors (1987) en un estudi en pomes Golden Delicious mostraven com un tractament en postcollita amb calci incrementava el calci total en la fruita al mateix temps que els fruits presentaven menys malalties causades per *P. expansum*.

5.2. DEFENSA QUÍMICA

5.2.1. Les fitoanticipines

La defensa química està formada per compostos que tenen activitat antimicrobiana i se'ls anomena fitoanticipines. Alguns d'aquests compostos estan biològicament actius mentre que altres es converteixen a formes actives quan enzims de la pròpia planta els allibera després d'una infecció o una ferida (Osbourn, 1996). Aquests compostos solen ser fenols, quinones, tanins, lactones i saponines.

Clars exemples de saponines són la tomatina i l'avenacina, compostos antifúngics de la tomata i la civada, respectivament, i que es troben presents en aquestes plantes d'una forma biològicament activa (Jackson i Taylor, 1996). La fruita immadura, com per exemple l'alvocat, conté compostos antifúngics o antimicrobians que es metabolitzen gradualment durant la maduració de la fruita, fent la fruita immadura menys susceptible a les malalties que la fruita madura (Ben-Moualem i Prusky, 2000). Ndubizu (1976) va observar que les pomes Red Delicious al mateix temps que avançava la seva maduració presentaven menys compostos fenòlics, concretament menys àcid *p*-coumaryl-quinic i àcid clorogènic, el que augmentava la seva susceptibilitat a *B. cinerea*, *P. expansum* i *Alternaria* sp.

5.2.2. L'enfosquiment enzimàtic com a possible mecanisme de defensa

L'enfosquiment enzimàtic és el resultat de l'oxidació dels compostos fenòlics a quinones que polimeritzen donant lloc a pigments d'un color vermellós-marronós, anomenats melanines (Murata et al., 1995). Aquesta reacció està relacionada amb l'activitat de l'enzim polifenol oxidasa (PPO) i el contingut en polifenols del fruit (Vámos-Vigyázó et al., 1985). En general es considera que l'enzim PPO no és un factor limitant en aquest procés, ja que hi ha poca correlació entre l'activitat d'aquest enzim i la capacitat d'enfosquiment dels fruits (Amiot et al., 1992; Cheng i Crisosto, 1995). No obstant, la concentració i naturalesa

dels fenols poden determinar las capacitats d'enfosquiment del fruit i explicar las diferències observades en relació a l'estat de maduresa a la collita i durant la conservació (Amiot et al., 1992; Amiot et al., 1995). L'enzim PPO s'ha caracteritzat també per la seva funció a l'hora de restringir la infecció d'un patogen, degut a la seva efectivitat en l'oxidació de compostos fenòlics (Li i Steffens, 2002).

6. DEFENSES INDUÏDES PER UN ATAC PATOGEN

Les plantes també tenen unes defenses induïdes que poden prevenir una posterior colonització del teixit una vegada les barreres estructurals s'han vençut. Aquestes defenses es descriuen com a mecanismes actius de defensa perquè només s'activen com a resposta a un patogen (Collinge et al., 1994). Aquests mecanismes involucren canvis en el metabolisme provocats per l'expressió gènica. Per tant, per a que s'indueixi la defensa, és necessari un sistema de reconeixement específic mitjançant el qual la planta pot reconèixer la presència d'un patogen (Hutcheson, 1998).

6.1. CRONOLOGIA DE LES REACCIONS PROVOCADES PER UN ATAC PATOGEN

L'esquema presentat en la figura 1 mostra de forma resumida la cronologia dels esdeveniments en una interacció planta-patogen.

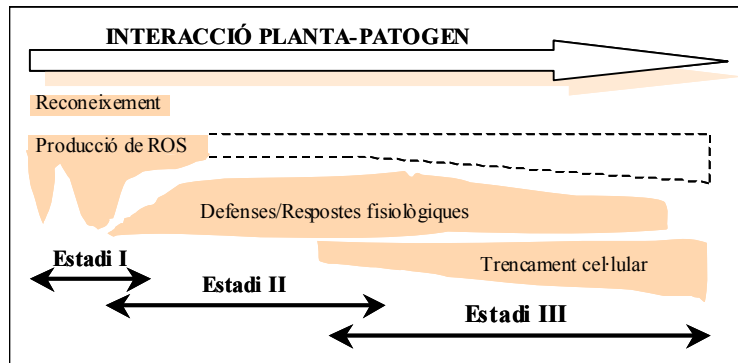


Figura 1: Resum cronològic dels esdeveniments produïts durant la patogènesi (Baker i Orlandi, 1999)

Baker i Orlandi (1999) van dividir en tres fases clarament diferenciades una interacció planta-patogen. L'estadi I inclouria el reconeixement del patogen per part de la planta hoste i les fases inicials de la producció d'espècies actives d'oxigen (ROS, de l'anglès *reactive oxygen species*). La producció de ROS continua al llarg de la interacció entre els dos organismes i fins i tot podria incrementar en fases posteriors, però no fins als nivells observats inicialment.

En l'estadi II, tot i que els símptomes no són visibles, s'inicien diversos processos de defensa com poden ser la producció de fitoalexines, la lignificació o reforçament de les parets cel·lulars, un increment dels processos antioxidants, la producció de proteïnes relacionades amb la patogènesi i la iniciació de la resistència sistèmica adquirida.

L'estadi III, finalment, inclou els processos degradatius de les cèl·lules afectades per la infecció, per tant, és en aquesta fase quan els símptomes d'infecció comencen a fer-se visibles. Aquests processos són la peroxidació de lípids i una disminució de l'activitat fotosintètica. Si la planta presenta resistència, és a dir, si es tracta d'una interacció incompatible, el procés que s'inicia és la resposta hipersensible.

Aquesta divisió en fases del conjunt de processos que s'esdevenen en una interacció planta-patogen és artificial, ja que molts dels processos poden coincidir en el temps, i tots ells depenen del tipus d'interacció que es dugui a terme.

6.2. ESTADI I: PRODUCCIÓ D'ESPÈCIES ACTIVES D'OXIGEN

6.2.1. Les espècies actives d'oxigen

Les espècies actives d'oxigen (ROS) són molt importants per al metabolisme cel·lular quan es produeixen d'una forma controlada, ja que participen en el metabolisme de les cèl·lules durant el seu creixement i desenvolupament. Quan hi ha una situació d'estrès, com és el cas d'un atac patogen, l'equilibri en que es troben les ROS s'altera i es produeixen canvis en les cèl·lules, com ara la desnaturalització de proteïnes i la peroxidació dels lípids de membrana (Halliwell i Gutteridge, 1989).

Les ROS són molècules tòxiques, resultat de successives reduccions de l'oxigen molecular, tal com es mostra en la figura 2. Les espècies predominants que s'han detectat en interaccions planta-patogen són l'anió superòxid (O_2^-), el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el radical hidroxil (OH). A aquestes molècules se les anomena espècies actives ja que reaccionen amb altres molècules sense la necessitat d'una aportació d'energia.

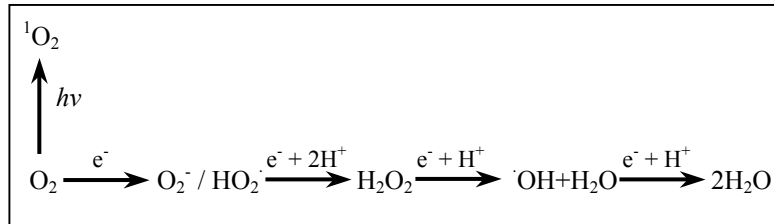


Figura 2: Esquema de les successives reduccions de l'oxigen i formació de les espècies reactives d'oxigen (Baker i Orlandi, 1999)

L'anió superòxid es genera a través de diverses vies com poden ser les NADPH oxidases/sintases lligades a la membrana, peroxidases de la paret cel·lular, lipoxigenases i com a resultat d'una transferència d'electrons en les cadenes de transport d'electrons de la mitocondria i els cloroplasts (Baker i Orlandi, 1995). Aquesta és una espècie poc reactiva en comparació amb el seu àcid conjugat, el radical hidropèroxil ($\text{HO}_2\cdot$), amb el que està en equilibri. Quan es forma el radical superòxid es produeixen quantitats significants de peròxid d'hidrogen.

El peròxid d'hidrogen prové, en la seva majoria, de la dismutació de $\text{O}_2\cdot^-$ catalitzada per la superòxid dismutasa o bé per dismutació espontània (Takeda et al., 1997). El peròxid d'hidrogen és una molècula oxidant estable, encara que té una reactivitat baixa amb la majoria de molècules orgàniques. Aquesta molècula és capaç de difondre's a través de la bicapa lipídica de les membranes cel·lulars i per tant, pot arribar a llocs llunyans del lloc de la seva formació. A més, també pot causar danys oxidatius que poden comportar la destrucció de les funcions metabòliques i la pèrdua de la integritat cel·lular (Foyer et al., 1997).

El radical hidroxil es forma a través de la reacció de Haber-Weiss i és un dels oxidants més potents i reactius. Pot iniciar reaccions en cadena amb totes les macromolècules provocant danys en components cel·lulars, lesions i mutacions en el DNA i algunes vegades pot comportar disfuncions metabòliques irreparables i la mort cel·lular (Scandalios, 1993). La seva detecció i la determinació del seu paper en interaccions planta-patogen no han tingut èxit degut a que la seva vida mitjana és de microsegons.

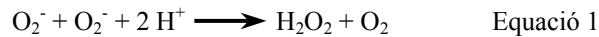
6.2.2. El sistema antioxidant

Les ROS participen en el metabolisme normal de les cèl·lules però pot arribar a ser tòxic si s'acumula. És per això que la cèl·lula té diversos mecanismes per a destoxificar-se. Aquests mecanismes inclouen des de molècules antioxidants fins a sistemes enzimàtics molt complexos.

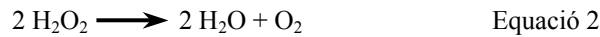
El sistema SOD-CAT

La catalasa (CAT) i la superòxid dismutasa (SOD) són els enzims més eficients per a l'eliminació de les ROS (Scandalios, 1993). La seva acció combinada converteix el radical superòxid i el peròxid d'hidrogen en aigua i oxigen molecular.

El superòxid s'elimina mitjançant l'acció de la SOD, resultant en peròxid d'hidrogen (Equació 1). Existeixen tres tipus majoritaris de SOD en funció del seu metall prostètic: Cu/Zn, Mn i Fe, que es troben localitzats en el citosol, la mitocondria i cloroplasts (Sandalo i del Rio, 1991).



La CAT es troba majoritàriament en els peroxisomes on elimina el peròxid d'hidrogen produït convertint-se en aigua i oxigen molecular (Equació 2). Aquest enzim és molt ineficient a baixes concentracions de peròxid (Asada, 1992). És per això que en els peroxisomes es troben elevades quantitats de CAT, arribant gairebé a un estat cristal·lí (Bilger i Bjorkman, 1991).

*El cicle ascorbat-glutatió*

L'enzim ascorbat peroxidasa (APX) pot reduir el peròxid d'hidrogen utilitzant ascorbat com a reductor, formant monodehidroascorbat que dismutarà a dehidroascorbat (DHA) i ascorbat (AA) (Figura 3). Aquest mecanisme opera en el citoplasma, les mitocondries i els cloroplasts (Scandalios, 1993). A diferència de la catalasa, l'ascorbat peroxidasa pot eliminar nivells baixos de peròxid d'hidrogen.

L'enzim APX catalitza la primera reacció del cicle ascorbat-glutatió, en el qual estan involucrades diferents oxidacions i reduccions de l'ascorbat, el glutatió i NAD(P)H i s'elimina una molècula de peròxid d'hidrogen, com es pot observar en la Figura 3.

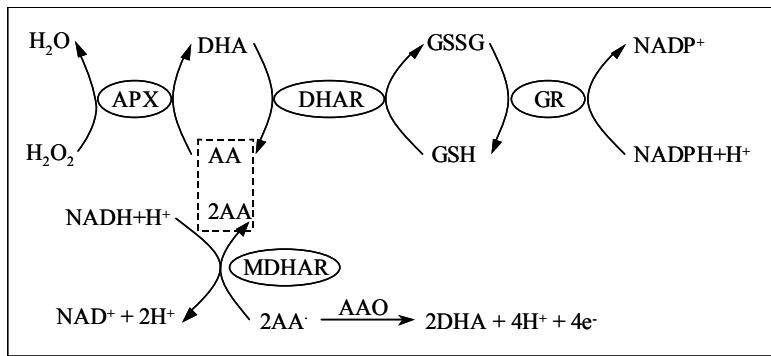


Figura 3: Cicle ascorbat-glutatió i reaccions associades. DHAR: dehidroascorbat reductasa; MDHAR: monodehidroascorbat reductasa; GSSG: glutatió oxidat; GSH: glutatió reduït; GR: glutatió reductasa; AAO: ascorbat oxidasa

Compostos antioxidants no enzimàtics

Tant l'ascorbat com el glutatió juguen un paper molt important en l'eliminació de les ROS. El primer és un dels captadors de radicals lliures més importants en les plantes, evitant així el dany oxidatiu (Noctor i Foyer, 1998). El glutatió és important degut en la seva intervenció en la regeneració de l'ascorbat (Law et al., 1983), com ja s'ha observat en el cicle ascorbat-glutatió.

Altres compostos com són l' α -tocoferol i els carotenoides també intervenen en l'eliminació de les ROS.

6.2.3. Producció de ROS durant la patogènesi

16

Una de les primeres respostes de les plantes enfront a un atac patògen és la producció de ROS. Aquesta reacció, també anomenada explosió oxidativa, s'inicia immediatament després del reconeixement del patògen. La formació de ROS durant la patogènesi ve determinada, com a mínim, per cinc processos (Bolwell i Wojtaszek, 1997).

El primer procés, i el més important, és el de les NAD(P)H oxidases lligades a la membrana plasmàtica, on aquest enzim catalitzaria la formació de l'anió superòxid a partir de l'oxigen molecular. La participació d'aquest enzim s'ha descrit en nombrosos sistemes, tot i que sempre en suspensions cel·lulars, com per exemple soia (Levine et al., 1994), *Arabidopsis* (Desikan et al., 1996), rosa (Auch i Murphy, 1995) i tomata (Vera-Estrella et al., 1994). Més recentment, Razem i

Bernards (2003) van mostrar com en tubercles de patata la generació de ROS era deguda a una NADPH oxidasa.

Una altra via per a la generació de ROS en interaccions planta-patogen és mitjançant la peroxidasa (POX) de la paret cel·lular (Lindner et al., 1988; Peng i Kuć, 1992). Aquesta reacció necessita la presència d'un reductor, com poden ser la cisteïna, el glutatió, l'ascorbat i el NAD(P)H, i és altament dependent del pH de medi, mostrant més activitat en pH neutres i bàsics (Bolwell i Wojtaszek, 1997).

Les altres tres vies, no tant importants i menys estudiades en interaccions planta-patogen, són les de l'oxalat oxidasa (Bolwell et al., 2001), de les amina oxidases (Allan i Fluhr, 1997) i dels sistemes protoplàstics de generació de ROS (Bolwell i Wojtaszek, 1997).

6.2.4. Característiques de l'explosió oxidativa

La producció de ROS es presenta de formes diferents en funció de si la interacció existent entre planta i patogen és compatible o bé incompatible. Una interacció incompatible és aquella en que el patogen no causa malaltia en la planta, mentre que en una interacció compatible la planta mostra els símptomes de malaltia. La primera vegada que es va diferenciar entre els dos tipus d'interacció va ser en teixit de patata després d'una inoculació amb *Phytophthora infestans* (Doke, 1983). La generació de ROS es va produir en la interacció incompatible entre el patogen i el teixit de patata, mentre que quan aquest teixit es tractava amb una raça compatible del patogen no hi havia una generació de ROS.

De fet, l'explosió oxidativa, caracteritzada en suspensions cel·lulars, es divideix en dues fases diferenciades (Baker et al., 1991). La fase I és curta i inespecífica (Figura 4) i es dona tant en interaccions compatibles com en interaccions incompatibles. Aquesta fase s'inicia pocs minuts després de la inoculació de les cèl·lules amb el patogen (Apostol et al., 1989; Levine et al., 1994). La fase II és una resposta més llarga, que apareix entre 1,5 i 6 hores després de la inoculació, i només és específica per a interaccions incompatibles, que poden ser provocades per races avirulentes de patògens o bé per inductors (elicitor, en anglès), que són components exògens o endògens dels microorganismes i que indueixen una reacció de defensa en les plantes (Baker et al., 1993).

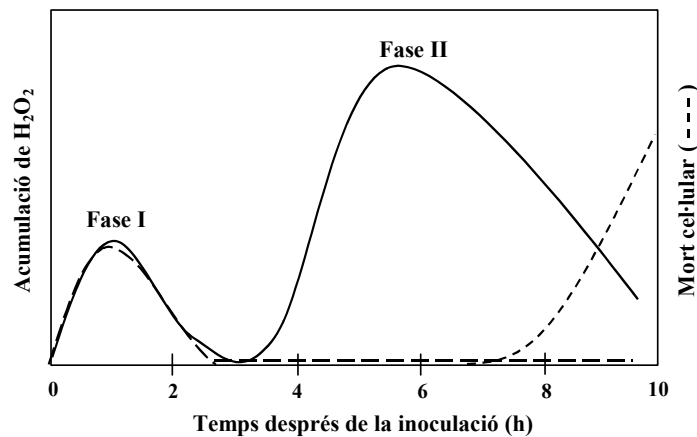


Figura 4: Cinètiques per l'acumulació de H₂O₂ i inducció de mort cel·lular després d'una inoculació amb un patògen avirulent (—) i cinètica per l'acumulació de H₂O₂ després d'una inoculació amb un patògen virulent (---) (Lamb i Dixon, 1997)

Els resultats obtinguts d'observar la mort cel·lular al mateix temps que l'acumulació de ROS en tabac i soia mostren com, en les interaccions que resultaven en una fase II en la producció de ROS, s'indueix subsequentment una mort cel·lular hipersensible algunes hores després (Baker i Orlandi, 1995).

Un increment en la concentració de l'inòcul utilitzat comporta un increment en la fase I de la producció de ROS en suspensió cel·lular (Baker i Orlandi, 1995). Tanmateix, aquest increment resultava en una menor producció de ROS durant la fase II, degut a que una major concentració d'inòcul causava una inducció de les activitats enzimàtiques encarregades de l'eliminació de ROS de la fase I (Baker et al., 1995).

6.2.5. Funcions de les ROS en la resistència a malalties

Com ja s'ha esmentat, la generació de ROS és un dels primers processos que succeeixen com a resposta a un atac patògen. Les ROS estan relacionades amb altres respostes de defensa de les plantes, com per exemple, el consum de O₂, la producció de fitoalexines, la resistència sistèmica adquirida, la immobilització de les proteïnes de la paret cel·lular, entre altres (Figura 5). Moltes d'aquestes respostes s'explicaran més profundament en els estadis II i III de les interaccions

planta-patogen. En aquest punt s'explicaran els efectes més immediats de la generació de ROS.

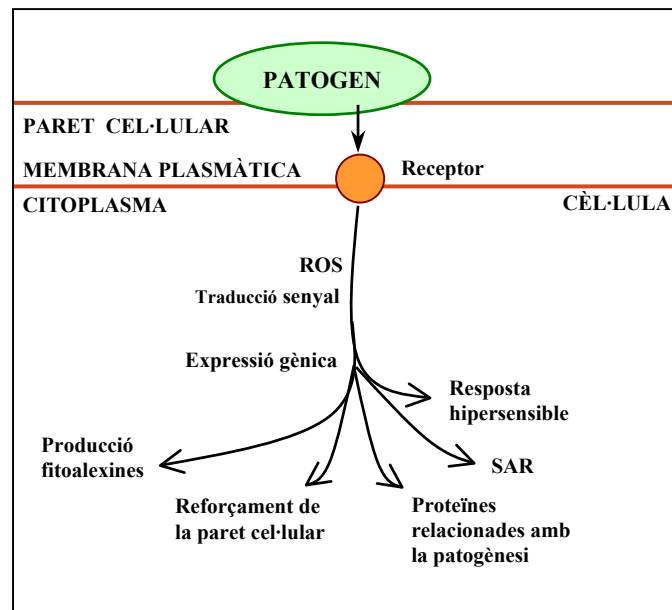


Figura 5: Model on es mostren els possibles efectes de les ROS generades per un atac patogen

Funció antimicrobiana

El primer efecte directe que exerceixen les ROS és l'efecte antibiòtic sobre el patògen (Apostol et al., 1989) o bé inhibidor de la germinació d'espores (Peng i Kuć, 1992). Alguns estudis han demostrat que nivells artificialment elevats de H_2O_2 i O_2^- poden tenir efecte supressor en patògens i poden inhibir el desenvolupament de símptomes de malalties en teixits vegetals (Baker i Orlandi, 1999).

L'acumulació d'aquests radicals on està el patògen pot arribar a nivells tòxics, però aquesta toxicitat dependrà de les concentracions presents i de la sensibilitat del patògen a aquestes concentracions (Mehdy et al., 1996). El nivell tolerable de H_2O_2 està definit per la cèl·lula individual, bacteriana en aquest cas, i per la seva capacitat d'eliminació de ROS per acció de la catalasa i el cicle ascorbat-glutatió (Baker i Orlandi, 1995). Un altre factor molt important a l'hora de determinar la toxicitat de ROS és la quantitat d'inòcul present, ja que

una població bacteriana redueix la concentració de H₂O₂ del medi a uns nivells tolerables per a la supervivència de les cèl·lules individuals (Baker i Orlandi, 1997).

S'ha de tenir en compte que les ROS són també tòxiques per a la planta i per tant, aquesta iniciarà els sistemes necessaris per a la destoxificació dels radicals, protegint-se ella mateixa i, indirectament, al patogen.

Canvis en la paret cel·lular

La preparació de la cèl·lula per al reforçament de la seva paret, que millorarà la resistència, comença amb relativa rapidesa després del primer contacte amb el patogen. Està caracteritzat per una intensificació del flux citoplasmàtic i l'acumulació de citoplasma al voltant del punt de penetració del patogen.

La resposta més ràpida a un atac patogen causada per la generació de ROS és l'encreuament oxidatiu de proteïnes de la paret cel·lular. Aquest tipus de resposta es posava en evidència en cultiu cel·lular de soia i mongeta, bé tractats amb un inductor de resistència o bé després de provocar-los-hi una ferida (Bradley et al., 1992). En aquest cas, l'encreuament oxidatiu de les proteïnes s'iniciava 2 minuts després del tractament i arribava al seu punt òptim en només 10 minuts. Aquest fet incrementava la resistència de la paret a l'acció dels enzims degradatius dels patògens. La immobilització de proteïnes de la paret cel·lular es va poder observar en fulles de soia durant interaccions amb bacteris incompatibles però no amb compatibles (Brisson et al., 1994).

6.3. ESTADI II: PROCESSOS DE DEFENSA

Durant aquest estadi, durant el qual es desenvolupen els processos de defensa, les cèl·lules semblen sanes però realment estan responnent d'una manera activa a l'atac patogen. Tot i que molts processos dels que aquí es descriuran són conseqüència de l'increment de ROS en l'anterior etapa, alguns d'aquests també poden induir una generació de ROS, que com ja s'havia dit, poden estar presents durant les tres etapes de la interacció planta-patogen.

6.3.1. Canvis en el flux de Ca²⁺ de la membrana cel·lular

Un procés que ROS pot mitjançar durant l'establiment de resistència és la inducció d'un flux citoplasmàtic de Ca²⁺ (Baker et al., 1993; Levine et al., 1996). Aquest increment del Ca²⁺ citoplasmàtic va ser mostrat com un factor important en el desenvolupament de la mort cel·lular. Altres autors mostraven com el Ca²⁺ extracel·lular és necessari per a

l'activació de respostes de defensa, com per exemple la biosíntesi de fitoalexines (Kurosaki et al., 1987) o l'explosió oxidativa (Schwacke i Hager, 1992; Doke i Miura, 1995).

Altres fluxos iònics, H^+ i K^+ , estan també involucrats en les respostes de les plantes contra patògens causants de la reacció hipersensible. Aquests canvis en els fluxos no són un efecte directe dels danys a la membrana ocasionats per ROS ni de la peroxidació de lípids i fins i tot poden aparèixer abans de la producció dels radicals actius d'oxigen (Baker et al., 1991).

6.3.2. Producció de fitoalexines

Les fitoalexines són components antimicrobians de baix pes molecular produïts per les plantes com a resposta a una infecció o un estrès, i que actuen contra fongs i contra bacteris en comptades ocasions (Kuč, 1995). Les fitoalexines aturen el creixement del patogen, conferint resistència a la planta en interaccions incompatibles. Quan es tracta d'interaccions compatibles, el patogen o bé les tolera, les destoxifica, suprimeix la seva acumulació i/o evita la inducció de la seva producció (Cruickshank, 1963).

S'han caracteritzat més de 350 fitoalexines d'unes 30 famílies vegetals, encara que moltes d'elles provenen de les lleguminoses. Les fitoalexines s'han aïllat de tiges, arrels, fulles i fruits, encara que no totes les parts produeixin al mateix temps ni els mateixos components (Kuč, 1995). Aquests compostos s'acumulen en grans quantitats tant en el punt de penetració com en les cèl·lules i teixits propers que mostren una resposta hipersensible (Hammerschmidt, 1999).

Entre les fitoalexines més estudiades es troben les formades a través del metabolisme dels fenil propanoids, que tenen com a base la fenilalanina. Mitjançant enzims sintetitzats *de novo* com la fenilalanina amoni-liasa, la xalcona sintasa i la xalcona isomerasa, les fitoalexines són sintetitzades com a resposta a la infecció (Cuypers et al., 1988).

Un clàssic exemple de la relació entre fitoalexines i resistència és un estudi de Yoshikawa i col·laboradors (1978). Es va estudiar la interacció soia-*Phytophthora megasperma* en dues varietats, una resistent i l'altra susceptible, caracteritzant la formació de fitoalexines (en el cas de soia és la gliceolina) a diversos temps després de la inoculació. La gliceolina s'acumulava al punt de la infecció i al seu voltant poques hores després de la inoculació en la varietat resistent. D'altra banda, la varietat susceptible produïa molta menys quantitat de gliceolina i necessitava molt més temps per arribar a sintetitzar els mateixos nivells. La gliceolina inhibia el desenvolupament fúngic en la varietat resistent, mentre que el desfasament en la producció en la varietat susceptible feia que no hi hagués inhibició de la infecció.

Aquests resultats, doncs, porten a pensar que les fitoalexines estan altament relacionades amb la resistència de les plantes a un atac patogen.

Diversos autors apuntaven la relació existent entre la generació de ROS i la formació de fitoalexines (Epperlein et al., 1986; Apostol et al., 1989). No obstant, estudis més recents demostren que la producció de fitoalexines no està condicionada a la generació d'aquestes espècies (Devlin i Gustine, 1992; Rustérucchi et al., 1996).

6.3.3. Increment en l'activitat antioxidant

El metabolisme antioxidant de les plantes té un efecte dual. En primer lloc, i com ja s'ha analitzat anteriorment, actua permetent l'acumulació de ROS per a activar els mecanismes de defensa de les plantes. D'altra banda, actua com a eliminador de les ROS, per a que el seu efecte tòxic no comporti un dany greu a les cèl·lules. Per tant, ambdós mecanismes en conjunt contribuirien a la resistència mostrada per les plantes.

Els agents reductors i els enzims antioxidants endògens són abundants en plantes i són capaços de neutralitzar la producció de ROS. Aquests són, com ja s'han anomenat, la superòxid dismutasa, la catalasa, l'ascorbat peroxidasa, la glutatió peroxidasa i les molècules antioxidants com ascorbat i glutatió. L'activitat d'aquests sistemes d'eliminació de ROS augmenta durant la patogènesi (Adam et al., 1995; Baker et al., 1995).

En suspensió cel·lular de soia, quan s'inoculava amb bacteris incompatibles, s'observava un increment de l'activitat de la glutatió S-transferasa, un enzim de la síntesi de glutatió (Levine et al., 1994). Varietats susceptibles d'ordi mostraven un augment significant en activitat de l'ascorbat peroxidasa al mateix temps que una disminució dels nivells d'ascorbat en resposta a la patogènesi (El-Zahaby et al., 1995), fets que comportarien una disminució dels nivells de H₂O₂.

En les interaccions entre cultiu cel·lular de tabac i soques virulenta i avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv *syringae* es mostrava un increment de l'activitat POX després de la inoculació, tot i que la interacció de les cèl·lules va desenvolupar un explosió oxidativa molt més important amb la soca avirulenta que amb la soca virulenta (Baker et al., 1995). En cèl·lules de *Phaseolus vulgaris* que presentaven una reacció hipersensible degut a una interacció incompatible es va observar també un increment de les activitats POX i SOD Cu/Zn (Buonaurio et al., 1987).

6.3.4. Resistència sistèmica adquirida

A part del paper que ROS i els antioxidants juguen en la resistència contra patògens, aquests compostos també estan implicats en la expressió de la resistència sistèmica adquirida (SAR), per la qual la planta podrà resistir futurs atacs patògens (Medhy et al., 1996). Aquest tipus de resistència s'expressa localment en el punt de la primera inoculació però també es pot expressar sistèmicament en teixits remotament situats del primer lloc d'infecció (Sticher et al., 1997).

Aquest tipus de resistència s'expressa contra un espectre gran d'organismes, que poden ser diferents dels causants de SAR (Sticher et al., 1997). El temps necessari per a l'establiment de SAR depèn tant de la planta com del tipus d'organisme que la causi. Per exemple, en cogombre va ser induïda per *Pseudomonas syringae* en només 7 hores (Smith i Métraux, 1991) mentre que en tabac inoculat amb *Peronospora parasitica* pv. *tabaci*, l'expressió de SAR contra el mateix patògen no va ser fins 2-3 setmanes després de la inoculació (Cohen i Kuć, 1981). El nivell de protecció també pot variar en funció de l'organisme de la primera inoculació i també en funció de l'extensió de la necrosi causada, però una vegada ja establerta la resistència procurada per la SAR pot durar fins i tot setmanes (Masamanchi i Kuć, 1991).

Aquesta SAR podria resultar d'una senyal sistèmica no específica. La natura d'aquesta senyal ha estat objecte de controvèrsia durant molts anys (Durrant i Dong, 2004). Les diferents propostes descrites com a senyal de SAR són l'àcid salicílic (Mauch-Mani i Métraux, 1998), les ROS (Ryals et al., 1995), i una molècula de tipus lipídic (Durrant i Dong, 2004). L'àcid salicílic és la molècula que ha demostrat majors evidències d'estar involucrada en la SAR, ja que la adquisició de resistència es correlaciona generalment amb increments en l'acumulació d'aquesta molècula tant localment com sistemàticament (Lawton et al., 1995).

Els mecanismes de defensa associats a la SAR són la lignificació i la formació d'altres barreres estructurals, l'acumulació de proteïnes relacionades amb la patogènesi (proteïnes PR) i el procés d'acondicionament o sensibilització, que correspon a un increment de l'eficàcia i la rapidesa de reacció contra un patògen virulent degut a que han estat pretractades amb un patògen necrotitzant o bé amb un inductor de SAR sintètic (Sticher et al., 1997).

Un altre tipus de resistència sistèmica induïda es desenvolupa a partir de la colonització de les arrels de la planta per rizobacteris. Aquest tipus de resistència es coneguda amb el nom de resistència sistèmica induïda (ISR) que pot ser induïda per l'àcid jasmònic i l'etilè i ser independent de l'expressió dels gens PR i de l'àcid salicílic (Pieterse i van Loon, 1999).

6.3.5. Reforçament de la paret cel·lular

Es produeixen diversos tipus de reforçament de la cèl·lula degut a un atac patogen, ja sigui per deposició de callosa, sílica, lignina o proteïnes entre la paret i la membrana cel·lulars just sota el punt de penetració, coneguda com a papilla (Ride, 1983). El reforçament pot involucrar també la formació de lignitubs (Fig. 6), formats per reforçaments de callosa lignificada al voltant de les puntes de les hifes del patogen (Hammerschmidt i Kuć, 1982).

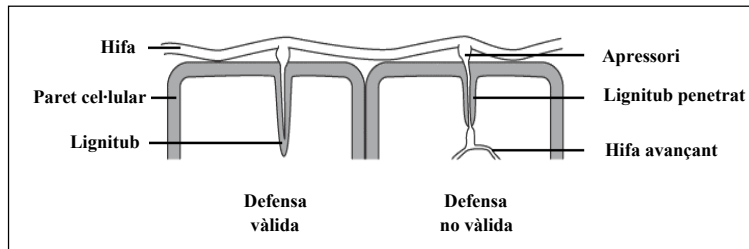


Figura 6: Formació de lignitubs que controlen el creixement de les hifes del patogen atacant

La lignificació de la paret cel·lular podria intervenir de diferents maneres (Ride, 1978):

- (1) La lignina faria les parets més resistents a la penetració mecànica.
- (2) La lignificació al punt de penetració faria la paret resistent a la dissolució per part d'enzims fúngics.
- (3) Restricció de la difusió de les toxines i enzims fúngics a la cèl·lula i restricció d'aigua i nutrients de l'hoste per al fong.
- (4) Inactivació de membranes, enzims, toxines i inductors fúngics degut a compostos fenòlics de baix pes molecular precursors de lignina i a radicals lliures produïts durant la polimerització.
- (5) La punta de la hifa es lignifica i perd la plasticitat necessària per al creixement.

L'inici de la biosíntesi de lignines és mitjançant la conversió de fenilalanina en àcid cinnàmic amb l'acció de l'enzim fenilalanina amoni-liasa (PAL). Tot seguit es formen precursors de lignina, com poden ser el coniferil alcohol, el coumaril alcohol i el sinapil alcohol, a partir dels quals, mitjançant l'acció o bé del peròxid d'hidrogen més l'enzim peroxidasa (Gross et al., 1977) o bé de l'oxigen molecular més

l'enzim lacasa (Bao et al., 1993), es formen les lignines. La formació de lignina durant la resistència de les plantes està sovint correlacionada amb un increment de l'activitat PAL (Ismail i Brown, 1979).

Com ja s'ha dit anteriorment, no només hi ha acumulació de lignines en cèl·lules atacades per un patògen o en cèl·lules que han estat danyades mecànicament. Les cicatritzacions de ferides poden comportar la suberització mitjançada per NADPH oxidasa (Razem i Bernards, 2003) i la formació de callosa, gomes, tanins, substàncies pèctiques i midons (Spotts et al., 1998).

6.3.6. Proteïnes relacionades amb la patogènesi

Les proteïnes relacionades amb la patogènesi (proteïnes PR) s'acumulen en les plantes després i durant la infecció amb patògens (van Loon et al., 1994). Per patògen no només s'entén el patògen microbià, sinó també insectes, nemàtodes, herbívors. No obstant, alguns compostos químics i altres estressos abiòtics també poden induir les proteïnes PR. Aquestes proteïnes estan dividides en 14 famílies per a la seva classificació (van Loon i van Strien, 1999), que inclouen quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases, inhibidors de proteïnasa, proteïnes semblants a ribonucleases i proteïnes semblants a taumatina. La seva generació és a partir de l'expressió de diversos gens (Broekaert et al., 2000), tot i que un inductor d'aquesta acumulació podria ser el H_2O_2 directament o bé a través de l'estimulació de l'acumulació de l'àcid salicílic (Raskin, 1992).

Algunes proteïnes PR tenen activitat antimicrobiana *in vitro*, com són les quitinases (PR-3) i β -1,3-glucanases (PR-2), entre altres (Mauch et al., 1988). El mateix estudi demostrava que les quitinases i les β -1,3-glucanases poden actuar sinèrgicament (Mauch et al., 1988) i atacant els components de la paret cel·lular dels fongs, les quitines i els β -1,3-glucans (Ben-Yehoshua et al., 1998).

Les quitinases i les β -1,3-glucanases s'acumulen en les vacuoles i les β -1,3-glucanases algunes vegades també en els espais intercel·lulars. Aquests últims enzims estarien en contacte directe amb el patògen, dissolvent la seva paret cel·lular, si es tracta d'un fong, els fragments de la qual podrien induir una resposta hipersensible en la cèl·lula vegetal. El trencament de la vacuola durant la descompartimentació del citoplasma fa que s'alliberin els enzims hidrolítics, amb activitat antivírica, antifúngica i antibacteriana (Bol et al, 1990; Linthorst, 1991; Stintzi et al., 1993).

Aquestes proteïnes també poden tenir un paper indirecte en l'activitat antimicrobiana degut a que alliberen oligosacàrids actius, que actuarien com a inductors, i també degut a que algunes peroxidases catalitzarien l'entrecruament en la paret cel·lular (Stintzi et al., 1993). A més a més,

la presència d'aquestes proteïnes abans d'una infecció incrementa la resistència de la planta als patògens, com en el cas de la SAR (Sticher et al., 1997).

Les proteïnes PR es van descriure per primera vegada en fulles de tabac infectades pel virus del mosaic del tabac (Van Loon i van Kammen, 1970) però des de llavors s'han descrit també en *Arabidopsis* (Greenberg et al., 1994), en cereals com l'ordi i el panís (Bryngelsson i Collinge, 1991) i en fruits, com els cítrics (Ben-Yehoshua et al., 1998) i les pomes (El Ghaouth et al., 2003).

6.4. ESTADI III: PROCESSOS DEGRADATIUS

En aquest últim estadi de les interaccions planta-patogen s'estudiaran processos que esdevenen durant la degradació i la mort cel·lular i poden estar associats tant a interaccions compatibles com a incompatibles.

6.4.1. Resposta hipersensible

La resposta hipersensible (HR), com a resultat d'anteriors estadis, està caracteritzada per una necrosi ràpida i localitzada de les cèl·lules al lloc de la infecció (Fig. 7) i es duu a terme en plantes resistents en resposta tant a virus, com bacteris, fongs o bé nemàtodes.

La HR es pot induir a través de diversos mitjans com són l'increment dels fluxes de Ca^{2+} (Levine et al., 1996) i K^+ (Baker et al., 1991), l'òxid nítric (Delledonne et al., 2001), l'acumulació de H_2O_2 (Iwano et al., 2002) i l'àcid salicílic (Dangl et al., 1996).

La funció que desenvolupa la HR és com a mecanisme de defensa. En microorganismes que necessiten la cèl·lula viva durant el procés d'infecció, la mort cel·lular en sí és un mecanisme de resistència que impedeix la penetració del patogen, però també actua com a inductor de senyals per a les cèl·lules adjacents i activador de la SAR en la planta (Heath, 2000). En un estudi recent, Govrin i Levine (2000) van mostrar que, tot i que la HR és eficient contra patògens biòtrofs, no protegeix les plantes contra un atac d'un patogen necròtrof, com per exemple, *B. cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum* en *Arabidopsis*. A més a més, la HR facilitaria la colonització de *B. cinerea* en les plantes.

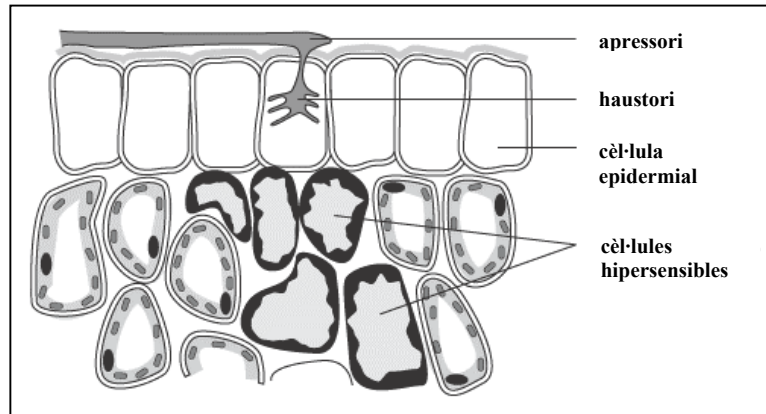


Figura 7: Resposta hipersensible en cèl·lules adjacents a les atacades pel microorganisme

Aquesta reacció també estaria associada a l'expressió d'altres mecanismes de defensa, com són l'acumulació de fitoalexines, la deposició de lignina, suberina i proteïnes riques en hidroxiprolina i amb la producció i acumulació de proteïnes PR associades a SAR (Madriz Ordeñana, 2002). Alguns autors han suggerit que la HR seria una variant de la mort cel·lular programada (Greenberg, 1996; Heath, 1998). Aquesta resposta es pot donar tant en interaccions compatibles com incompatibles, com és el cas de la patata amb varietats resistents i susceptibles al patogen *Phytophthora infestans* (Vleeshouwers et al., 2000), tot i que està molt més present en les incompatibles.

6.4.2. Peroxidació de lípids

Durant la HR esdevé una peroxidació de lípids, que condueix a un increment de la permeabilitat de les membranes amb la consegüent pèrdua de calci i de les seves funcions metabòliques. Les membranes deixaran passar substrats inicialment compartimentats i, per tant, es podran acumular i oxidar components fenòlics. Això dóna lloc al color marró típic de les cèl·lules en els passos finals de la seva infecció i això pot passar quan ja han passat unes hores després de que la mort cel·lular esdevingui irreversible (Heath, 2000).

La peroxidació de lípids pot ocórrer per dues vies: l'enzimàtica, mitjançant la lipoxigenasa (LOX), i la no enzimàtica, mitjançant les ROS i radicals lliures orgànics (Thompson et al., 1987). La LOX catalitza la reacció de hidroperoxidació dels àcids grassos poliinsaturats a hidroperòxids (Gardner, 1995). Aquests hidroperòxids són els

provoquen danys directes sobre les membranes cel·lulars. Les ROS estarien implicades indirectament en el procés de degradació de membranes. Un cop ja ha començat l'estadi de degradació cel·lular, l'acumulació de ROS ajudaria a promoure aquest deteriorament a través de la peroxidació de lípids (Thompson et al., 1991). Un estudi realitzat en pebrot infectat amb *B. cinerea* mostra com un canvi en l'estat redox del teixit sa donaria com a resultat l'oxidació de Fe i Mn, la generació de radicals lliures i la formació de 4-hidroalquenals citotòxics (Deighton et al, 1999).

7. REFERÈNCIES

- ADASKAVEG, J.E., FELICIANO, A.J., OGAWA, J.M. 1991. Evaluation of the cuticle as a barrier to penetration by *Monilinia fructicola* in peach fruits (Abstr.). *Phytopathology*, 81:1150.
- ADAM, A., BESTWICK, C.B.B., MANSFIELD, J. 1995. Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta*, 197:240-249.
- AGRIOS, G.N. 1999. *Fitopatología*. 2a. ed. México: Ed. Limusa S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores.
- AKAI, S., FUKUTOMI, M. 1980. Preformed internal physical defenses. A: *Plant disease. An advanced treatise. Vol. 5. How plants defend themselves*. HORSFALL, J.G., COWLING, E.W. (eds.) London: Academic Press. p. 139-159.
- ALLAN, A.C., FLUHR, R. 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 9:1559-1572.
- AMIOT, M.J., TACCHINI, M., AUBERT, S., NICOLAS, J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science*, 57:958-962.
- AMIOT, M.J., TACCHINI, M., AUBERT, S.Y., OLESZEK, W. 1995. Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:1132-1137.
- APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F., LOW, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiology*, 90:109-116.
- ASADA, K. 1992. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85:235-241.
- AUH, C.-K., MURPHY, T.M. 1995. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O_2^- and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiology*, 107:1241-1247.

BAKER, C.J., HARMON, G.L., GLAZENER, J.A., ORLANDI, E.W. 1995. A non-invasive technique for monitoring peroxidative and H₂O₂-scavenging activities during interactions between bacterial plant pathogens and suspension cells. *Plant Physiology*, 108:353-359.

BAKER, C.J., O'NEILL, N.R., KEPPLER, L.D., ORLANDI, E.W. 1991. Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco cell suspensions. *Phytopathology*, 81:1504-1507.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W., ANDERSON, A.J. 1997. Oxygen metabolism in plant cell culture/bacteria interactions: role of bacterial concentration and H₂O₂-scavenging in survival under biological and artificial oxidative stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51:401-415.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W., MOCK, N.M. 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiology*, 102:1341-1344.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. 1999. Active oxygen and pathogenesis in plants. A: *Plant-microbe interactions. Vol. 4*. STACEY, G., KEEN, N.T. (eds.) St. Paul, Minnesota: APS Press. The American Phytopathological Society. p. 81-119.

BAKER, K.F., HEALD, F.D. 1934. An investigation of factors affecting the incidence of lenticel infection of apples by *Penicillium expansum*. Bulletin, Washington Agricultural Experimental Station. N° 298, p. 48.

BAO, W., O'MALLEY, D., WHETTEN, R., SEDEROFF, R. 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science*, 260:672-674.

BENO-MOUALEM, D., PRUSKY, D. 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology*, 90:553-559.

BEN-YEHOSHUA, S. RODOV, V., PERETZ, J. 1998. Constitutive and induced resistance of citrus fruit against pathogens. A: *Disease resistance in fruit*. Proceedings of an International Workshop held at Chiang Mai, Thailand, 18-21 May 1997. JOHNSON, G.I., HIGHLEY, E., JOYCE, D.C. (eds.) Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research. p. 78-92.

- BILGER, W., BJORKMAN, O. 1991. Temperature dependence of violaxanthin deepoxidation and non-phytochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta*, 184:226-234.
- BOL, J.F., LINTHORST, H.J.M., CORNELISSEN, B.J.C. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, 28:113-138.
- BOLWELL, P.P., PAGE, A., PIŚLEWSKZ, M., WOJTASZEK, P. 2001. Pathogenic infection and the oxidative defences in plant apoplast. *Protoplasma*, 217:20-32.
- BOLWELL, G.P., WOJTASZEK, P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51:347-366.
- BONATERRA, A. 2000. Podredumbres de los frutos de poscosecha. Podredumbre causada por *Alternaria* sp. A: *Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología nº 3. p. 90-91.
- BRADLEY, D.J., KJELLBOM, P., LAMB, C.J. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70:21-30.
- BRISSON, L.F., TENHAKEN, R., LAMB, C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, 6:1703-1712.
- BROEKAERT, W.F., TERRAS, F.R.G., CAMMUE, B.P.A. 2000. Induced and preformed antimicrobial proteins. A: *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Slusarenko, A., Fraser, R.S.S., van Loon, L.C. (eds). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 371-477.
- BRYNGELSSON, T., COLLINGE, D.B. 1991. Biochemical and molecular analyses of the response of barley to infection by powdery mildew. A: *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. Shewry, P.R. (ed.). Wallingford, Oxon: CAB International. p. 452-473.
- BUONAURIO, R., DELLA TORRE, G., MONTALBINI, P. 1987. Soluble superoxide dismutase (SOD) in susceptible and resistant host-parasite complexes of *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31:173-184.

CHENG, G.W., CRISOSTO, C.H. 1995. Browning potential, phenolic composition, and polyphenol oxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. *Journal of the American Society for the Horticultural Science*, 120:835-838.

COHEN, Y., KUĆ, J. 1981. Evaluation of systemic acquired resistance to blue mold induced in tobacco leaves by prior stem inoculation with *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina*. *Phytopathology*, 71:783-787.

COLLINGE, D.B., GREGERSEN, P., THORDAL-CHRISTENSEN, H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. A: *Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches*. BASRA, A.S. (ed.). New York: Marcel Dekker. p. 391-433.

CONWAY, W.S., GROSS, K.C., SAMS, C.E. 1987. Relationship of bound calcium and inoculum concentration to the effect of postharvest calcium treatment on decay of apples by *Penicillium expansum*. *Plant Disease*, 71:78-80.

CRUICKSHANK, I.A.M. 1963. Phytoalexins. *Annual Review of Phytopathology*, 1:351-374.

CUYPERS, B., SCHMELZER, E. HAHLBROCK, K. 1988. *In situ* localization of rapidly accumulated phenylalanine ammonia-lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 1:157-160.

DANGL, J.L., DIETRICH, R.A., RICHBERG, M.H. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 8:1793-1807.

DARP. 2002. *Inventari fructícola de Catalunya. Zona fructícola de Lleida. Pomera i Perera. 2001*. Generalitat de Catalunya.

DEIGHTON, N., MUCKENSCHNABEL, I., GOODMAN, B.A., WILLIAMSON, B. 1999. Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*. *Plant Journal*, 20:485-492.

DELLEDONNE, M., ZEIER, J., MAROCCO, A., LAMB, C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*, 98:13454-13459.

- DESIKAN, R., HANCOCK, J.T., COFFEY, M.J., NEILL, S.J. 1996. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Letters*, 382:213-217.
- DEVLIN, W.S., GUSTINE, D.L. 1992. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive response. *Plant Physiology*, 100:1189-1195.
- 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. *Physiological Plant Pathology*, 23:345-357.
- DOKE, N., MIURA, Y. 1995. *In vitro* activation of NADPH-dependent O₂⁻ generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or digitonin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46:17-28.
- DURRANT, W.E., DONG, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42:185-209.
- ECKERT, J.W. 1978. Pathological diseases of fresh fruits and vegetables. A: *Postharvest Biology and Biotechnology*. HULTIN, H.G. I MILNER, N. (eds.) Westport, CT: Food and Nut Press. p. 161-209.
- EL GHAOUTH, A., WILSON, C.L., WISNIEWSKI, M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology*, 93:344-348.
- EL-ZAHABY, H.M., GULLNER, G., KIRALY, Z. 1995. Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interaction. *Phytopathology*, 85:1225-1230.
- EPPERLEIN, M.M., NORONHA-DUTRA, A.A., STRANGE, R.N. 1986. Involvement of the hydroxyl radical in the abiotic elicitation of phytoalexins in legumes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 28:67-77.
- FOYER, C., LÓPEZ-DELGADO, H., DAT, J. SCOTT, I. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100:241-254.

GARDNER, H.W. 1995. Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway. *Hortscience*, 30:197-204.

GROVRIN, E.M., LEVINE, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10:751-757.

GREENBERG, G.T. 1996. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*, 93:12094-12097.

GREENBERG, J.T., GUO, A.L., KLESSIG, D.F., AUSUBEL, F.M. 1994. Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated co-ordinately with multiple defense functions. *Cell*, 77:551-563.

GROSS, G.G., JANSE, C. ELSTNER, E.F. 1977. Involvement of malate, monophenols, and the superoxide radical in H₂O₂ formation by isolated cell walls from horseradish (*Amaracia lapathifolia* Gilib). *Planta*, 136:271-276.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. 1989. *Free radical in biology and medicine*. Oxford, U.K.: Clarendon Press.

HAMMERSCHMIDT, R. 1999. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, 37:285-306.

HAMMERSCHMIDT, R., KUĆ, J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiological Plant Pathology*, 20:61-71.

HEATH, M. 1996. Plant resistance to fungi. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18:469-475.

HEATH, M. 1998. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology*, 104:117-124.

HEATH, M. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 44:321-324.

HUTCHESON, S.W. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 36:59-90.

- ISMAIL, M.A., BROWN, G.E. 1979. Postharvest wound healing in citrus fruit: induction of phenylalanine ammonia-lyase in injured 'Valencia' orange flavedo. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 104:126-129.
- JACKSON, A.O., TAYLOR, C.B. 1996. Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *Plant Cell*, 8:1651-1668.
- KUĆ, J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 33:275-297.
- KUROSAKI, F., TSURUSAWA, Y., NISHI, A. 1987. The elicitation of phytoalexins by Ca^{2+} and cyclic AMP in carrot cells. *Phytochemistry*, 26:1919-1923.
- LAMB, C., DIXON, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:251-275.
- LAW, M., CHARLES, S., HALLIWELL, B. 1983. Superoxide production by microsomal membranes from senescing carnation flowers: an effect on membrane fluidity. *Phytochemistry*, 22:1375-1380.
- LAWTON, K., WEYMANN, K., FRIEDRICH, L., VERNOOIJ, B., UKNES, S., RYALS, J. 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Pathogen interactions*, 8:863-870.
- LEVINE, A., PENNELL, R.I., ALVAREZ, M.E., PALMER, R., LAMB, C. 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology*, 6:427-437.
- LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C. 1994. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79:583-593.
- LI, L., STEFFENS, J.C. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215:239-247.
- LINDNER, W.A., HOFMANN, C., GRISEBACH, H. 1988. Rapid elicitor-induced chemiluminiscence in soybean suspension cultured cells. *Phytochemistry*, 27:2501-2503.

LINTHORST, H.J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Review of Plant Science*, 10:123-150.

LUTTRELL, E. S. 1974. Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia*, 66:1-15.

MADAMANCHI, N.R., KUĆ, J. 1991. Induced systemic resistance in plants. A: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. COLE, G.T., HOCH, H.C. (eds.) New York: Plenum. p. 347-362.

MADRIZ ORDEÑANA, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 63:22-32.

MAPA. 2002. *Encuesta sobre plantaciones de árboles frutales. Año 2002*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Consultat: gener 2005. Disponible a internet: www.mapa.es/estadistica/pags/encuestafrutales/resultados2002.htm

MAUCH, F., MAUCH-MANI, B., BOLLER, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. 2. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology*, 88:936-942.

MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.-P. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, 82:535-540.

MEHDY, M.C., SHARMA, Y.K., SATHASIVAN, K., BAYS, N.W. 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia Plantarum*, 98:365-374.

MENDGEN, K., HAHN, M., DEISING, H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 34:367-386.

MICHAILIDES, T.J., JOHNSON, R.S. 1992. Effect of nitrogen fertilization on brown rot (*Monilinia fructicola*) susceptibility in nectarines (Abstr.). *Phytopathology*, 82:1064.

MOERSCHBACHER, B., MENDGEN, K. 2000. Structural aspects of defense. A: *Mechanisms of resistance to plant diseases*. SLUSARENKO, A., FRASER, R.S.S., VAN LOON, L.C. (eds). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 231-277.

- MONTESINOS, E. 2000. Podredumbres de los frutos de poscosecha. Podredumbre gris (*Botrytis cinerea*). A: *Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología n° 3. p. 89-90.
- MURATA, M., TSURUTANI, M., TOMITA, M. HOMMA, S. KANEKO, K. 1995. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:1115-1121.
- NDUBIZU, T.O.C. 1976. Relations of phenolic inhibitors to resistance of immature apple fruits to rot. *Journal of Horticultural Science*, 51:311-319.
- NOCTOR, G., FOYER, C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49:249-279.
- NUNES, C., USALL, J., TEIXIDÓ, N., TORRES, R., VIÑAS, I. 2002. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with the combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. *Journal of Food Protection*, 65:178-184.
- OSBOURN, A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, 8:1821-1831.
- PALAZÓN, I., PALAZÓN, C., ROBERT, P., ESCUDERO, I., MUÑOZ, M., PALAZÓN, M. 1984. *Estudio de los problemas patológicos de la conservación de peras y manzanas en la provincia de Zaragoza*. Zaragoza: Diputación Provincial de Zaragoza. Publicación n° 990. Institución Fernando El Católico.
- PENG, M., KUĆ, J. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, 82:696-699.
- PIERTERSE, C.M.J., VAN LOON, L.C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 4:52-58.
- PODILA, G.K., ROGERS, L.M., KOLATTUKUDY, P.E. 1993. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology*, 103:267-272.

RASKIN, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43:439-463.

RAZEM, F.A., BERNARDS, M.A. 2003. Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH-dependent oxidase. *Journal of Experimental Botany*, 54:935-941.

RIDE, J.P. 1978. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. *Annals of Applied Biology*, 89:302-306.

RIDE, J.P. 1983. Cell walls and other structural barriers in defence. A: *Biochemical Plant Pathology*. CALLOW, J.A. (ed.). John Wiley & Sons Ltd. p. 215-235.

RUSTÉRUCCI, C., STALLAERT, V., MILAT, M.-L., PUGIN, A., RICCI, P., BLEIN, J.-P. 1996. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology*, 111:885-891.

RYALS, J., LAWTON, K.A., DELANEY, T.P., FRIEDRICH, L., KESSMANN, H., NEUENSCHWANDER, U., UKNES, S., VERNOOIJ, B., WEYMANN, K. 1995. Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 92:4202-4205.

SANDALIO, L.M., DEL RÍO, L.A. 1991. *Especies de oxígeno activado en situaciones de estrés en plantas*. Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Boletín N° 15. p. 3-10.

SCANDALIOS, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101:7-12.

SCHWACKE, R., HAGER, A. 1992. Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca²⁺ and protein-kinase activity. *Planta*, 187:136-141.

SMITH, J.A., MÉTRAUX, J.P. 1991. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* induces systemic resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39:451-461.

SPOTTS, R.A., CERVANTES, L.A. 1986. Population pathogenicity and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp. and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Disease*, 70:106-108.

SPOTTS, R.A., SANDERSON, P.G., LENNOX, C.L., SUGAR, D., CERVANTES, L.A. 1998. Wounding, wound healing and staining of mature pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 13:27-36.

STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35:235-270.

STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M., FRITIG, B. 1993. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75:687-706.

TAKEDA, T., ISHIKAWA, T., SHIGEOKA, S. 1997. Metabolism of hydrogen peroxide by the scavenging system in *Chlamydomonas reibardtii*. *Physiologia Plantarum*, 99:49-55.

THOMPSON, J.E., BROWN, J.H., GOPINADHAN, P., TODD, J.F., YAO, K. 1991. Membrane phospholipid catabolism primes the production of activated oxygen in senescing tissues. A: *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. PELL, E., STEFFEN, K. (eds.). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists. p. 57-66.

THOMPSON, J.E., LEGGE, R.L., BARBER, R.F. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*, 105:317-344.

USALL, J., VIÑAS, I. 2000. Podredumbres de los frutos de poscosecha. Podredumbre causada por *Rhizopus* spp. A: *Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología nº 3. p. 92-94.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L., SCHUSTER-GAJZÁGÓ, I., NÁDUDVARI-MÁRKUS, V., HÁMORI-SZABÓ, J., SASS, P. 1985. Changes in the polyphenol-polyphenol oxidase complex of apples during ripening and storage. Part I: variations related to cultivar, year and date of picking. *Chem. Mikrobiol Technol. Lebensm.*, 9:37-47.

VAN LOON, L.C., PIERPOINT, W.S., BOLLER, T., CONEJERO, V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12:245-264.

VAN LOON, L.C., VAN KAMMEN, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. *Virology*, 40:199-211.

VAN LOON, L.C., VAN STRIEN, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55:85-97.

VERA-ESTRELLA, R., HIGGINS, V.J., BLUMWALD, E. 1994. Plant defence response to fungal pathogens. II. G-protein-mediated changes in host plasma membrane redox reactions. *Plant Physiology*, 106:97-102.

VIÑAS, I., USALL, J. 2000. Podredumbres de los frutos de poscosecha. Podredumbre azul (*Penicillium* spp.). A: *Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología nº 3. p. 87-89.

VLEESHOUWERS, V.G.A.A., VAN DOOIJEWERT, W., GOVERS, F., KAMOUN, S., COLON, L.T. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*, 210:853-864.

VORWERK, S., SOMERVILLE, S., SOMERVILLE, C. 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 9:203-209.

WESSELS, J.G.H. 1996. Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends in Plant Science*, 1:9-15.

YOSHIKAWA, M., YAMAUCHI, K., MASAGO, M. 1978. Glyceollin: its role in restricting fungal growth in resistant soybean hypocotyls infected with *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Physiological Plant Pathology*, 12:73-82.

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi és aportar nous coneixements pel que fa als mecanismes de resistència dels fruits, més concretament en l'àmbit de la postcollita de la poma. Degut a que els mecanismes de defensa de les plantes són diversos i que poden interactuar entre ells, els objectius concrets de la present tesi han estat:

1. Definir quins són els paràmetres bioquímics claus que determinen la resistència de la poma a *Penicillium expansum*. L'estudi es dirigeix principalment als canvis a curt termini per a determinar la natura de la resposta primària involucrada en aquests sistemes de defensa. El treball s'ha centrat més particularment en definir els següents punts:
 - 1.1. Determinar el paper que podria tenir el peròxid d'hidrogen com a inductor o senyal per a altres reaccions de defensa.
 - 1.2. Determinar la importància que podrien tenir els sistemes enzimàtics i el seu paper en la regulació dels nivells de peròxid d'hidrogen assenyalat anteriorment.
 - 1.3. Definir els papers específics que tenen el patogen i la cèl·lula hoste en el procés d'infecció, així com els papers corresponents als canvis metabòlics associats a l'efecte ferida i als associats directament a la presència del patogen.
 - 1.4. Determinar de quina manera podien intervenir els processos d'enfosquiment enzimàtic de la fruita i com aquests podien interferir en la resposta oxidativa citada anteriorment.
 - 1.5. Determinar, finalment, el paper més específic de l'enzim POX i dels processos de lignificació com a mecanisme per a la prevenció de la infecció.
2. Definir l'estat fisiològic òptim del fruit pel que fa a la resistència contra l'atac fúngic. Aquest estudi s'ha realitzat analitzant les variacions de resposta en funció del estat de maduresa a la collita però també en relació a diferències varietals.

3. Confirmar els resultats aconseguits en poma sencera (*in vivo*) amb estudis similars *in vitro* mitjançant la utilització de cultiu cel·lular de poma, i crear un model vàlid per a l'estudi d'aquest tipus d'interaccions.
4. Proposar un paràmetre dels estudiats com a marcador de la susceptibilitat dels fruits a ser infectats per *P. expansum*.

OBJECTIVES

The main objective of this thesis is to bring forward new knowledge of fruit resistance mechanisms, concretely in the postharvest field of apple fruit. Since there are several plant defence mechanisms and they can interact, the concrete objectives of this thesis are:

1. To define which are the biochemical key parameters that determine apple resistance to *Penicillium expansum*. This objective is mainly approached to the short-term changes in order to determine the nature of the primary response involved in these defence systems. The work is particularly focused to define the following points:
 - 1.1. To determine the role that hydrogen peroxide could have as a signal for other defence reactions.
 - 1.2. To determine the importance that the enzymatic systems could have and their role in the regulation of the hydrogen peroxide levels.
 - 1.3. To define the specific roles that the pathogen and the host cells have during the infection process, and the roles that correspond to the metabolic changes associated to the wound effect and those directly associated to the presence of the pathogen.
 - 1.4. To determine the way in which enzymatic browning processes of the fruit could be involved in disease resistance and the way they could interfere in the oxidative response.
 - 1.5. And finally, to determine the specific role of POX enzyme and the lignification processes as a mechanism to prevent the infection.
2. To define the optimal physiological conditions of the fruit regarding to the resistance to fungal attack. This work has been made analysing the response variations among the fruit maturity stages at harvest but in relation to cultivar differences as well.

3. To confirm the obtained results in whole apple (*in vivo*) with similar works *in vitro* by means of suspension apple cell culture, and create a valid model in order to study this kind of interactions.
4. To propose one of the studied parameters as a marker of fruit susceptibility to be infected by *P. expansum*.

SUMMARY

Apples (*Malus domestica* L. cv Golden Delicious) were picked 7 days before (harvest 1), or after (harvest 2) the commercial harvest time. Changes in H₂O₂ levels and in the activity of the H₂O₂-generating enzyme superoxide dismutase (SOD) and H₂O₂-scavenging enzymes catalase (CAT) and unspecific peroxidase (POX) were estimated immediately after harvest and during the first 24 hours following wounding and inoculation with *Penicillium expansum*. Fruits from harvest 1 show lower decay incidence and severity in infection than those from harvest 2. Immediately after wounding or inoculation, the resistant fruits (harvest 1) exhibited a significant increase in H₂O₂ levels concomitantly to higher activity of SOD. No significant changes in CAT and POX were found. In susceptible fruits (harvest 2), both H₂O₂ levels and SOD activity in wounded/inoculated fruits remained similar to control. In contrast, CAT and POX activity significantly increase as a consequence of wounding and inoculation. Collectively, these results provide evidence that harvest date is of essential importance in determining the susceptibility of Golden Delicious to *P. expansum*, and that H₂O₂ and its metabolism principally induced by wounding could play a role in defence mechanisms in this fruit.

1. INTRODUCTION

The degree of maturity at harvest could be one of the main factors that determine the susceptibility of fruits to mechanical damage or infections during their postharvest life. Although the biochemical reasons leading to a higher sensitivity to mechanical damage in more mature fruits are well described (Imaseki, 1985), the underlying biochemical factors responsible for the increase in decay sensitivity in relation to harvest maturity remain unknown (Boonyakiat et al., 1987; Usall et al., 1998). Fruit ripening involves a lot of biochemical changes, which may favour the infection process. For example cell-wall breakdown and membrane alteration that occur during ripening, may lead to fruits more susceptible to infection. Similarly, change in pH and increase in sugar concentration may cause better conditions for the development of the fungi by nutrient availability. Despite the significant relationship between these biochemical changes and fruit susceptibility to decay, none have been proven to be the sole causal agent in determining the resistance of the fruit and others active defence systems have to be considered (Prusky, 1996).

Plants, in general, and fruits, in particular, can defend against pathogen attack by using different defence mechanisms. The preformed structures

that initially stop pathogens, such as waxy cuticle and cell wall, may be reinforced after infection with lignin, callose or hydroxyproline-rich glycoprotein; other plants may confine the pathogen synthesizing toxic compounds and hydrolytic enzymes to prevent colonization of the tissue (Jackson and Taylor, 1996; Osbourn, 1996). In all cases, hydrogen peroxide either as a substrate of the lignification process or as a signal molecule seems to play an underlying role.

The involvement of hydrogen peroxide in defence mechanism has been clearly recognized as a key determinant of the hypersensitive reaction (Baker and Orlandi, 1995). This reaction has been described as an “oxidative burst” and proceeds in two phases. The first phase of production, which occurs very rapidly, is non-specific, whereas the second only occurs in an incompatible combination (Baker and Orlandi, 1995). It has been suggested that this second phase can in some way orchestrate the hypersensitive reaction (Levine et al., 1994). The production of H₂O₂ during this oxidative burst is involved in various cellular processes. It can lead first to rapid cell wall reinforcement because of its role in oxidative cross-linking (Bradley et al., 1992) and insolubilisation of hydroxyproline-rich proteins (Otte and Barz, 1996). It can also cause the release of calcium into the cellular matrix (Price et al., 1994) and the change of redox status of antioxidants, such as ascorbate and glutathione (Foyer et al., 1997), which may act as signal-transducing molecules. H₂O₂ may finally be implicated in the induction of defence genes (Wu et al., 1997).

Such a ubiquitous role of hydrogen peroxide underlines its importance in the resistance mechanisms of fruits against pathogens. However and in spite of this feature, nothing is known about the effect of *Penicillium expansum* infection on H₂O₂ metabolism in apple. The aim of our study was precisely to determine this effect in Golden Delicious fruit. It may be considered as a first approach of the biochemical mechanisms involved in the resistance of Golden Delicious apple against this pathogen.

2. MATERIALS AND METHODS

Fruit source

Apples (*Malus domestica* L. cv Golden Delicious) were obtained from a commercial orchard in Lleida (Catalonia, Spain). Healthy fruits were harvested on a completely randomized design from five trees. Harvests were carried out the 29th August (harvest 1), one week before the optimal harvest date for long-term storage and the 13th September (harvest 2), one week after it. Harvest maturity indexes were measured for each date.

Determination of quality parameters

Colour was measured on two opposite sides on each fruit. Measurements were made by placing the head of a portable tristimulus colorimeter (Chromameter CR-200, Minolta, Japan) at the midpoint between the stem and the calyx end and recording the chromaticity values of the fruit in the L* a* b* space coordinates (McGuire, 1992). Firmness was measured on two opposite peeled sides using a penetrometer fitted with an 11 mm diameter probe. Soluble solids concentration (SSC) was determined by measuring the refractive index of the juice of the same fruits used to determine firmness, and the data are expressed as percentage (g per 100 g fresh weight). Acidity was measured as follows: 10 ml of pulp juice was diluted with 10 ml H₂O and titrated with 0.1 M NaOH solution. The acidity was expressed in grams of malic acid per liter of juice. Data on maturity indexes represent the mean of 20 individual fruits.

Infection of *P. expansum* on apple fruits

P. expansum Link isolate CMP1 was isolated from apples decayed after several months in storage. This isolate was the most aggressive in our collection and caused the largest lesions on inoculated apples. Petri dishes of potato dextrose agar (PDA) were inoculated with this isolate and incubated at 25°C for 7 to 10 days. A conidial suspension was prepared in Tween 80 (0.05% wt/vol) in water and diluted to 10⁴ conidia ml⁻¹, after conidia had been counted with a haemocytometer.

At each harvest period, Golden Delicious apples were wounded with a nail by making an injury 2 mm in diameter and 2 mm deep at the stem (top) and calyx (bottom). The wounds were inoculated with 20 µl of the aqueous suspension of *P. expansum*.

Five apples constituted a single replicate and each treatment was repeated four times. The treated apples were incubated at 20°C and 85% relative humidity for 7 days, after which the percentage of infected wounds (incidence) and the lesion diameters (severity) caused by *P. expansum* were measured.

Preparation of the samples for biochemical analysis

At harvest, the fruits were separated into the following three sets: control fruits (not wounded and not inoculated), wounded fruits and inoculated fruits. The wounded and inoculated fruits were wounded by making nine injuries 2 mm in diameter and 2 mm deep with a nail on one side of each apple, and afterwards, in the inoculated fruits, each injury was inoculated with 20 µl of a conidia suspension of *P. expansum* at 10⁴ conidia ml⁻¹. Antioxidant levels and enzyme activity

were determined in both apple sets after harvest and 6, 12 and 24 h after wounding and inoculation. H₂O₂ levels were determined immediately after treatment. To determine the enzyme activities, 20 g of the pulp near the wound area (without rotten tissue) were cut into small pieces, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -25°C until analysis.

Determination of H₂O₂ levels

H₂O₂ amounts were determined using the Bioxytech H₂O₂-560 colorimetric assay from OXIS International Inc. (Portland, USA) following the manufacturer's instructions. The assay is based on the oxidation of ferrous ions (Fe²⁺) to ferric ions (Fe³⁺) by hydrogen peroxide under acidic conditions. The ferric ions bind with the indicator dye xylenol orange to form a stable coloured complex, which can be measured at 560 nm. H₂O₂ content was expressed as µmol kg⁻¹ of fresh weight (FW) and each value was the mean of four fruit determinations.

Extraction of the enzymes involved in the antioxidant metabolism

Pulp tissue (20 g fresh weight) was ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle and homogenized in 60 ml 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.8), 2 mM DTT, 5% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP), 0.1 mM EDTA, and 1.25 mM polyethylene glycol (Bailly et al., 1996). The homogenate was filtered through two layers of miracloth and centrifuged at 20000 g for 15 min, and a 2.5 ml aliquot was loaded into a Sephadex G-15 column (PD 10, Pharmacia) equilibrated with 10 ml 0.1 M phosphate buffer (pH 7.8). The enzymes were eluted with 3.5 ml of the same buffer. The resulting supernatant was used as an enzyme extract for determining superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) and catalase (CAT, EC 1.11.1.6) activities.

The extraction of total peroxidase (POX) was carried out using the protocol of Hanotel et al. (1995) with slight modifications. Twenty g of pulp tissue (fresh weight) was homogenized in 30 ml phosphate buffer (0.1 M at pH 7.0) with 0.5 mM cysteine. The extract was filtered through two layers of miracloth and centrifuged at 40000 g for 20 min at 4°C. Two and a half ml of the supernatant was then loaded into a Sephadex G-25 column (PD 10, Pharmacia) previously equilibrated with 10 ml phosphate buffer (pH 6.5). The enzyme was eluted with 3.5 ml of the same buffer.

Assays of the enzymes involved in the antioxidant metabolism

The activity of SOD was assayed by measuring its ability to inhibit the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) using the

method of Giannopolitis and Ries (1977). One unit of SOD was considered to be the amount of enzyme that inhibited NBT reduction by 50%. Catalase activity was measured by the method of Clairbone (1985), following the disappearance of H₂O₂ at 240 nm.

POX activity was measured spectrophotometrically at 485 nm in a reaction mixture consisting of 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.0, 12.5 mM o-phenylenediamine and 5 mM H₂O₂ (Ogawa and Uritani, 1970).

Protein measurements were performed using the protein dye banding method according to Bradford (1976). Except for SOD, for which one unit of activity was defined as the quantity of enzyme that inhibited NBT reduction by 50%, the other enzyme activities were expressed in units of activity (U.a) per mg protein, for which one U.a represents the quantity of enzyme responsible for a change in absorbance of 1 min⁻¹.

Data processing and statistical analysis

Data was analysed for significant differences by analysis of variance (ANOVA) with the statistical package SAS from Microsoft. Data was subjected to mean separation by LSD (Least Significant Difference) test, P<0.05.

3. RESULTS

Changes in quality parameters

Significant differences in maturity indexes were found between harvest dates (Table 1). As expected, fruits harvested later presented significantly lower firmness values and higher SSC values; in contrast, no differences in acidity were found. As regards the colorimetric indexes, significant differences were found for hue value but not for chroma.

Table 1: Effect of harvest date on maturity indexes in Golden Delicious apples

Harvest date	COLOUR		FIRMNESS (N)	SUGARS (SSC in %)	ACIDITY (g l ⁻¹ malic acid)
	Chroma value*	Hue value*			
29/08/00	41.49 a	112.98 b	72.6 a	13.0 b	4.7 a
13/09/00	43.23 a	158.42 a	70.6 b	14.9 a	4.3 a

* Hue and chroma values are calculated according to McGuire (1992). SSC: soluble solid concentration. Mean of 20 individual fruits. Different letters in the same column indicate difference between means using LSD Test (P<0.05)

Decay incidence and severity of the lesions

Fruits harvested later (harvest 2) showed a significantly higher decay incidence than those harvested earlier (Fig. 1). A similar behaviour was found for disease severity. The lesion diameter increased with the harvest date, from 1.46 cm at harvest 1 to 2.62 cm at harvest 2.

Effect of wounding and inoculation on H₂O₂ levels

Significant differences in the kinetics of H₂O₂ accumulation were found for the different harvest dates (Fig. 2). Wounded and inoculated fruits of harvest 1 exhibited a two-fold increase of H₂O₂ levels during the first 6 hours. Later, these levels remained stable in wounded fruits but decreased in inoculated fruits. No significant changes in H₂O₂ content were found for control fruits during all the experimental period. All the samples corresponding to harvest 2 exhibited the same pattern. In this case, H₂O₂ levels remained stable still 12 h and then sharply decrease. At time 24 h, H₂O₂ values in the wounded and inoculated fruits of harvest 2 were significantly lower than for harvest 1.

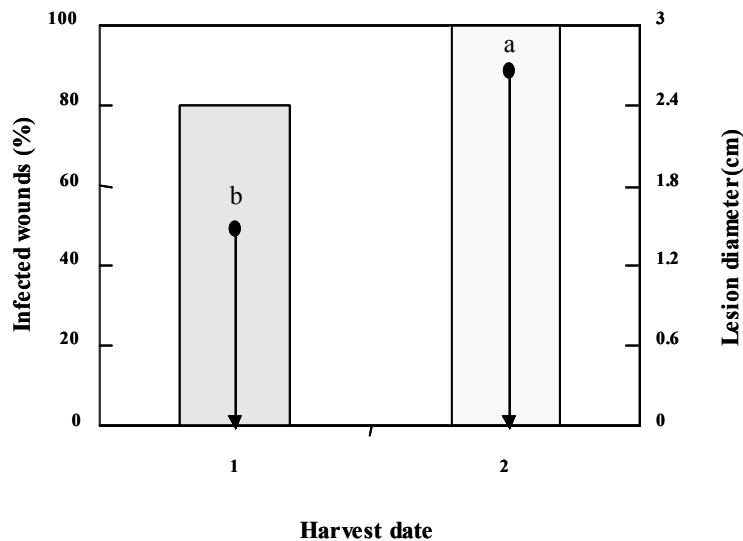


Figure 1: Influence of harvest date on decay incidence (number of infected fruits in %) and lesion diameter (cm). Golden Delicious apples were harvested at two different dates and inoculated with *Penicillium expansum* at 10^4 conidia ml^{-1} and stored at 20°C and 85% RH for 7 days. Columns (infected fruits) and lines (lesion diameter) with different letters were significantly different according to an ANOVA analysis, LSD test ($P < 0.05$)

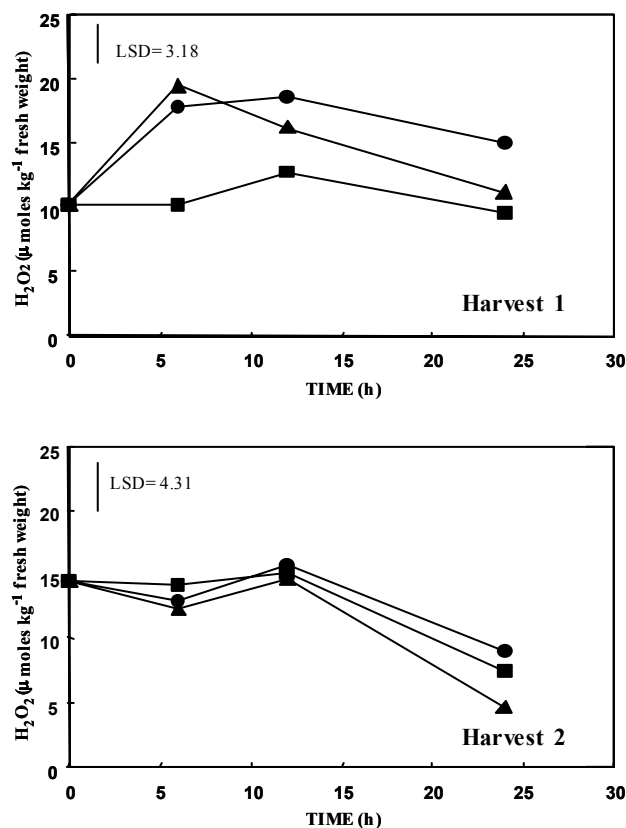


Figure 2: Effect of harvest date on hydrogen peroxide (H₂O₂) levels in control (■), wounded (●) or inoculated fruits (▲). Inoculated fruits were wounded and inoculated with a *Penicillium expansum* suspension (10⁴ conidia ml⁻¹). Each point represents the mean of four fruits. Bar = LSD ($P=0.05$)

Effect of wounding and inoculation on antioxidant enzymes activity

Initial SOD activity (time 0) was similar for the two harvest dates (Fig. 3). Changes in SOD activity during all the experimental period were similar to that previously described for H₂O₂. In the case of the more resistant fruits (harvest 1 - Fig. 3A), the activity significantly increased during the first 12 h in the wounded and inoculated fruits. In contrast, the activity remained stable in control fruits, in a way similar to that observed for the more sensitive fruits (harvest 2 - Fig. 3B).

A very different behaviour was found for CAT activity. No differences were found between harvest dates at time 0. During the first 12 hours, the activity increased in wounded and inoculated fruits of harvest 2, and decreased later (Fig. 3D). This activity was much higher than in fruits of harvest 1 (Fig. 3C) for which no significant changes were observed. POX activity in fruits of harvest 1 and control fruits of harvest 2 followed the same pattern. No significant differences in activity were found for the fruits of harvest 1 (Fig. 3E). In contrast, a significant increase in activity was observed in wounded and inoculated fruits of harvest 2 until 12 h (Fig. 3F). Later, the activity decreased to reach a value similar to control fruits.

4. DISCUSSION

Fruit ripening and harvest date appears to be of paramount importance in determining the resistance of apples to *P. expansum*. As shown in our results, a two-week difference in harvest date already leads to significant differences in incidence (20% more at harvest 2) and severity (55% more at harvest 2) of decay. In a first approach, this difference in susceptibility is likely related to the biochemical changes that occur during ripening. The decrease in firmness and increase in sugar concentration observed for the more mature fruits are two beneficial factors for the development of the fungi.

Delaying the harvest date also leads to significant differences in the response of the fruit to wounding and inoculation. Six hours after wounding and/or inoculation, H₂O₂ levels significantly increased in the resistant fruits (harvest 1) but not in the more sensitive fruits (harvest 2). This difference in responsiveness showed that the accumulation of H₂O₂ during the first phase of the wounding/infection process could be an important factor that determines the sensitivity of the fruit to infection. It would confirm the results obtained by Hernández et al. (2001) in apricot cultivars against plum pox virus. In both case, the difference in susceptibility are mainly determined by differences among H₂O₂-generating enzymes (SOD) and H₂O₂-scavenging enzymes (CAT, POX). As a consequence, H₂O₂ accumulates in the resistant fruits and it may be one of the factors that triggered the defence response.

Generally, the rapid generation and accumulation of H₂O₂ in plant-pathogen interaction, is a characteristic early feature of the hypersensitive response (Baker and Orlandi, 1995). In our case, and because of notable differences in the kinetic and in the virulence of the pathogen, the accumulation of H₂O₂ could not be attributed to a hypersensitive response. It may rather be related to others metabolic pathways for which H₂O₂ is used as metabolic intermediate. As peroxidase is not a limiting factor, the H₂O₂ accumulated in resistant

fruits potentially activates lignin biosynthesis and strengthen cell wall (Nicholson and Hammerschmidt, 1992).

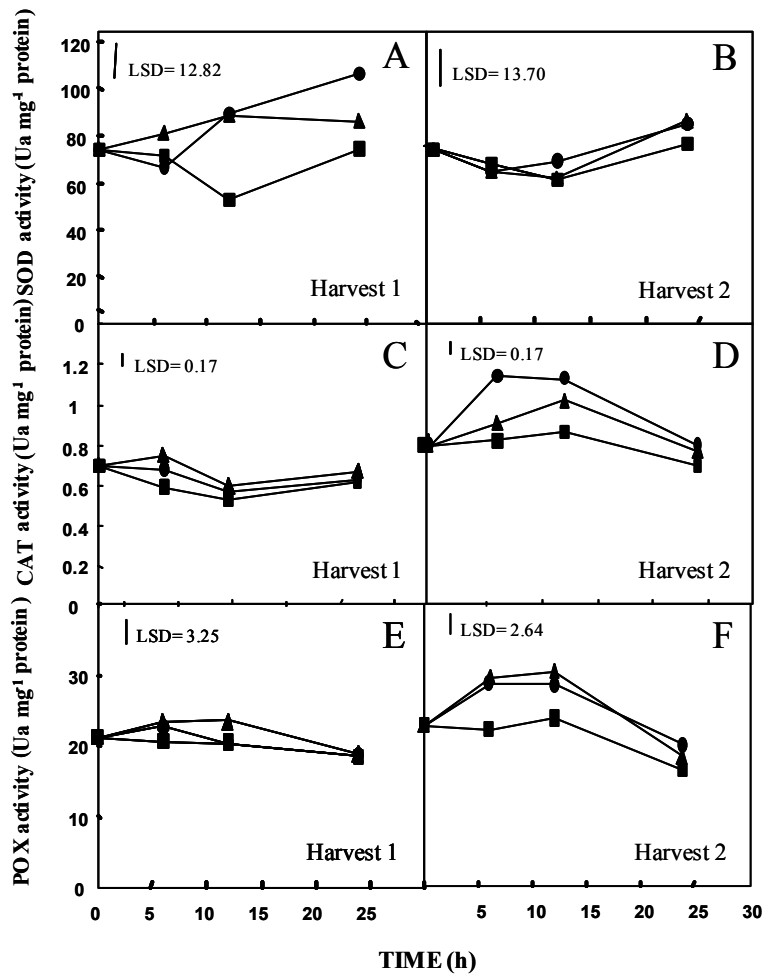


Figure 3: The effect of harvest date on SOD (A and B), catalase (C and D) and peroxidase (E and F) activities in control (■), wounded (●) or inoculated fruits (▲). Inoculated fruits were wounded and inoculated with a *Penicillium expansum* suspension (10⁴ conidia ml⁻¹). Resistant fruits corresponding to harvest 1 (A, C and E) were picked the 29th August 2000 and the sensitive fruits from harvest 2 (B, D and F) the 13th September 2000. Each point represents the mean of six fruits. Bar = LSD (P=0.05)

Directly involved in signal transduction, it might also be involved in the induction of others defence mechanisms and/or pathogenesis-related proteins, or it might just be another component of fruit response. Further works are needed to define the exact role of H₂O₂ in this context. They will be of great interest to understand the biochemical basis of the resistance mechanisms involved in the 'Golden Delicious'-*P. expansum* interaction.

For all the biochemical parameters studied in this work, we cannot observe differences between the wounded fruits and the inoculated fruits. The resistance response seems to be mainly determined by the responsiveness of the fruit to wounding and not by the pathogen. Such a dichotomous view of plant response to pathogen infection will undervalue the complexity of the problem. In many contexts, the wounding/pathogen dichotomy does not apply so tightly and common responses of both pathogen infection and wounding can be observed. Among these, *de novo* synthesis of phenols, production of lignin and/or hydroxyproline-rich glycoproteins, and increases in the activities of oxidative enzymes are surely among the more described (Bostock and Stermer, 1989; Hatcher, 1995). However, in all the cases the similarities are only superficial. When examined more closely (e.g., studying for example the different patterns of accumulation of isozymes), subtle differences can often be discerned to distinguish wounding and pathogen action. Such an approach will be of great interest in the case of the Golden-*P.expansum* model. It will complete this preliminary work and will surely lead to a new interesting knowledge of the resistance mechanism in apple fruits.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank "Instituto Nacional de Investigación Agrarias, INIA" (RTA02-073) for its financial support.

REFERENCES

BAILLY, C., BENAMAR, A., CORBINEAU, F., CÔME, D. 1996. Changes in malonaldehyde content and in superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated ageing. *Physiologia Plantarum*, 97:104-109.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 33:299-321.

- BOONYAKIAT, D., CHEN, P.M., SPOTTS, R.A., RICHARDSON, D.G. 1987. Effects of harvest maturity on decay and postharvest life of 'd'Anjou' pear. *Scientia Horticulturae*, 31:131-139.
- BOSTOCK, R., STERMER, B. 1989. Perspectives of wound healing in resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 27:343-371.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- BRADLEY, D., KJELLBOM, P., LAMB, C. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall structural protein: a novel, rapid plant defense response. *Cell*, 70:21-30.
- CLAIRBORNE, A. 1985. Catalase activity. A: *Handbook of methods for oxygen radical research*. GREENWALD, R. (ed.) CRC Press, Boca Raton.
- FOYER C., LOPEZ-DELGADO, H., DAT J., SCOTT, I. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100:241-254.
- GIANNOPOLITIS, C., RIES, N. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59:309-314.
- HANOTEL, L., FLEURIET, A., BOISSEAU, P. 1995. Biochemical changes involved in browning of gamma-irradiated cut witloof chicory. *Postharvest Biology and Technology*, 5:199-210.
- HATCHER, P. 1995. Three-way interactions between plant pathogenic fungi, herbivorous insects and their host plants. *Biological Reviews*, 70:639-694.
- HERNÁNDEZ, J.A., TALAVERA, J.M., MARTÍNEZ-GÓMEZ, P., DICENTA, F., SEVILLA, F. 2001. Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiologia Plantarum*, 111:313-321.
- IMASEKI, I. 1985. *Hormonal Regulation of Plant Development (III): Control of Wound-Induced Responses*. Springer Verlag, Germany.
- JACKSON, A.O., TAYLOR, C.B. 1996. Plant-Microbe interactions: Life and death at the interface. *Plant Cell*, 8:1651-1668.

LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79:583-593.

McGUIRE, R. 1992. Reporting of objective colour measurements. *Hortscience*, 27:1254-1255.

NICHOLSON, R., HAMMERSCHMIDT, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30:369-389.

OGAWA, M., URITANI, I. 1970. Tissue browning of potato tubers by gamma irradiation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 34:870-877.

OSBOURN, A. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, 8:1821-1831.

OTTE, O., BARZ, W. 1996. The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta*, 200:238-246.

PRICE, A., TAYLOR, A., RIPLEY, S., GRIFFITHS, A., TREWAVAS, A., KNIGHT, M. 1994. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell*, 6:1301-1310.

PRUSKY, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 34:413-434.

USALL, J., GARZÓ, E., SÍO, J., VIÑAS, I. 1998. Effect of pre-harvest factors and harvest time on biological control of *Penicillium expansum* on Golden Delicious apples. 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, Scotland, 9-16 August 1998. Vol 3 5.2.51

WU, G., SHORTT, B., LAWRENCE, J., FITZSIMMONS, K., LEVINE, E., RASKIN, I., SHAH, D. 1997. Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiology*, 115:427-435.

SUMMARY

Short-term responses to *Penicillium expansum* in terms of H₂O₂ levels, and antioxidant enzyme activity, particularly superoxide dismutase (SOD) and NADPH oxidase, were studied in suspension-cultured apple fruit cells (*Malus domestica* Borkh. cv Braeburn). Longer term responses in H₂O₂ levels were also determined in apple cells inoculated with *P. expansum* or treated with filtrate of the *P. expansum* culture. As expected for a compatible interaction, H₂O₂ production increased rapidly after fungal inoculation. Fluorescence microscopy showed that H₂O₂ accumulation occurred in the cells and was associated with a host defense mechanism. No significant changes in SOD and catalase (CAT) were found over 8 h from inoculation. In contrast, peroxidase (POX) activity remained slightly lower in treated cells. Immediately after inoculation, the fungal filtrate induced an H₂O₂ peak associated with NADPH oxidase activity, and a second prolonged peak more characteristic of an incompatible interaction. Collectively these results provide evidence that ROS play an important role in this plant-pathogen interaction, and that the filtrate contains an elicitor that could be used for the induction of resistance in apple fruit.

1. INTRODUCTION

Plant cell strategies against a pathogenic attack include mechanisms directed at weakening or killing the pathogen. These include the accumulation of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide and the superoxide anion, in a process known as the oxidative burst (Lamb and Dixon, 1997; Baker and Orlandi, 1999; De Gara et al., 2003). This generally proceeds in two phases (Baker and Orlandi, 1999), phase I occurring both in compatible and incompatible plant-pathogen interactions and causing a rapid but weak accumulation of ROS with a response time of a few minutes. In contrast, phase II is only observed in incompatible systems and is characterized by an important and prolonged accumulation of ROS after a longer period, usually of some hours (Levine et al., 1994). The ROS generated during these reactions have direct antimicrobial activity that inhibits fungal spore germination (Peng and Kuć, 1992). They are also involved in stimulating programmed cell death, resulting in localized rapid death of host cells that impairs fungal penetration, or viral replication, and limits nutrient uptake (Dangl et al., 1996). ROS are also involved in other biochemical processes such as cell wall strengthening (Vance et al., 1980), gene activation and transcription of antimicrobial proteins

(Kombrink and Somssich, 1995) or phytoalexins (Devlin and Gustine, 1992), and induction of systemic responses (Ryals et al., 1996).

Plant-pathogen interactions have been studied in plant cell suspension cultures, particularly in those of potato (Doke, 1983), tomato (Vera-Estrella et al., 1992), soybean (Baker et al., 1995), tobacco (Able et al., 2000) and rice (Iwano et al., 2002). Almost all the interactions studied were incompatible, showing an accumulation of ROS in both phase I and phase II bursts. ROS appears to be generated by at least two different enzyme systems (Bolwell and Wojtaszek, 1997), NADPH oxidase (Doke and Miura, 1995, Able et al., 2003), and the pH dependent, H₂O₂-generating extracellular peroxidase system (Bolwell and Wojtaszek, 1997).

We have recently suggested that H₂O₂ may be involved in the response of apple fruit to infection with *Penicillium expansum* (Torres et al., 2003), including induction of lignification (Valentines et al., 2005). However, it is difficult analysing short-term responses over a few hours or real-time responses in tissue such as a whole fruit. For these reasons, we used suspension-cultured apple fruit cells inoculated with *P. expansum*, leading to a compatible interaction, or with the filtrate of the aqueous suspension of this fungus. Changes in ROS levels and activities of associated antioxidant enzymes were studied in these apple cells during the process of infection in response to the presence of the pathogen.

2. MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Molecular Probes, Eugene, OR) was dissolved in DMSO to produce a 100 mM stock solution, which was frozen as aliquots. The inhibitor of the NADPH oxidase, diphenyleneiodonium (DPI), was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). DPI was made up as a 10 mM aqueous solution to provide a 10- μ M final concentration when added to cells. SOD was added to make a final concentration of 2.75 units. Unless stated otherwise, other chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma.

Cell cultures

Apple cells (*Malus domestica* L. Borkh cv. Braeburn) were maintained in suspension culture as described by Codron et al. (1979) and sub-cultured every 7 days. Flasks were incubated at 24°C with shaking at 100 rpm. Cells in the active growth phase (4 days after sub-culture) were used for all experiments.

Fungal preparation

P. expansum Link ICMP 1194 was grown in Petri dishes on potato dextrose agar (PDA) at 25°C. Fungi were suspended in sterile pure water and conidia counted with a haemocytometer and added to the apple cell suspension for a final concentration of 2×10^5 conidia ml⁻¹. To obtain a culture filtrate, a conidial suspension at the same concentration was filtered through a 0.2-µm filter (Sartorius, Minisart). This filtrate was added to apple cell suspension as a putative elicitor solution in an 8 h experiment. For a 3-day experiment, 1 ml of the filtrate was dried by freeze-drying, re-suspended in 0.25 ml sterile water and then added to the cell suspension (4 times concentration).

Inoculation experiments

Four-day-old cell cultures (35 ml) were transferred into 125 ml flasks, with 3 replicates for each treatment at each time point. Three different experiments were carried out as described below.

In the first experiment the flasks were divided into 3 groups: control (non-treated) flasks inoculated with *P. expansum* spore suspension (final concentration 2×10^5 conidia ml⁻¹), and flasks inoculated with the fungal filtrate (with equivalent volume). Hydrogen peroxide production (as a measure of ROS) was measured in the cells over 8 h, and the apple cells inoculated with *P. expansum* were sampled at appropriate times and frozen in liquid nitrogen for further analysis of antioxidant enzymes (SOD, CAT and POX).

A second experiment was carried out over 3 days, with H₂O₂ production being measured with the same set of treatments as in the first experiment.

In order to investigate whether NADPH oxidase was involved H₂O₂ production, a third experiment was carried out using an inhibitor of this enzyme, diphenyleneiodonium (DPI). In this case, the cells were treated only with concentrated filtrate.

Determination of apple cell viability and mass

Cell viability was measured by staining 100 µl of cells with 5 µL of Evan's Blue dye (0.5% Evan's Blue in 4% glycerol) on a microscope slide (Bowen et al., 2002). After incubation at room temperature for 10 min, 3 replicate counts of 220 ± 2 cells were made using a Nikon Lapophot upright light microscope. Viability was determined as the percentage of live cells (those remaining unstained) at each sampling time. Cell mass was measured by pipetting 1 ml samples of cells into pre-weighed microfuge tubes. The tubes were centrifuged for 10 min at 13,700 x g, the supernatant discarded and the tubes re-weighed. Three

replicate aliquots were removed at the beginning and at the end of the experiment.

Fluorimetric analysis of H₂O₂

Hydrogen peroxide production was measured using a fluorimetric microplate assay in which cells were incubated with dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as described by Allan et al. (Allan et al., 2005). Immediately after inoculation, and at subsequent time points, 100 µl aliquots of cell suspension were removed from the flask and incubated with DCFH-DA for 5 min within wells of a Corning 96-well microplate. Fluorescence was measured using a Wallac “Victor” Multilabel counter (Perkin-Elmer, Shelton, Connecticut, USA). At least 3 replicate aliquots were sampled for each flask at each time point.

Fluorescence microscopy

For cytological analysis, the apple cells loaded with DCFH-DA for 5 min were pipetted onto glass slides. Fluorescence from the generation of H₂O₂ was visualized using a Leica inverted fluorescence microscope equipped with a Princeton Instruments cooled CCD. Images were obtained under 400x magnification, with observation at set time points to avoid photoactivation of the probe.

Extraction and analysis of antioxidant enzymes

Frozen cells (0.5 g) were ground in a mortar and pestle in liquid nitrogen and homogenized in 10 ml 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.8), 2 mM DTT, 5% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), 0.1 mM EDTA, and 1.25 mM polyethylene glycol (Bailly et al., 1996). The homogenate was centrifuged at 20 000 x g for 15 min, and a 2.5 ml aliquot was loaded onto a Sephadex G-25 column (PD 10, Pharmacia) equilibrated with 10 ml 0.1 M phosphate buffer (pH 7.8). The enzymes were eluted with 3.5 ml of the same buffer. The resulting supernatant was used as the enzyme extract for the determination of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) and catalase (CAT, EC 1.11.1.6) activities. The extraction of total peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) was carried out following the same method, but using an extraction buffer of 0.1 M potassium phosphate (pH 6), 0.5 mM cysteine, and 5% (w/v) PVPP. The buffer used to equilibrate the columns and to elute the enzymes was 0.1 M potassium phosphate (pH 6).

SOD activity was measured by the method of McCord and Fridovich (1969), following the reduction of ferricytochrome *c* at 550 nm by xanthine oxidase. One unit of SOD was defined as the amount of SOD required to inhibit the rate of reduction of cytochrome *c* by 50%. CAT

activity was measured by the method of Clairborne (1985), following the loss of H₂O₂ at 240 nm. One unit of CAT was defined as the amount of enzyme that catalyses the breakdown of 1 μmol of H₂O₂/min at 25°C. POX activity was measured by the method of Lurie et al. (1997) where color changes of the extract at 470 nm with 10 mM guaiacol and 10 mM H₂O₂ were measured. One unit of POX was defined as the amount of enzyme producing 1 μmol tetraguaiacol/min at 25°C. All the enzyme activities were measured with a Spectrometer LS50 (Perkin-Elmer, Buckinghamshire, UK). Specific activities of all enzymes were expressed as units per mg protein. Protein measurements were made according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA) as a standard. All samples had three replicates and each replicate was measured in triplicate.

Determination of the metabolic pathway involved in H₂O₂ production

For this study, 100 μl aliquots of cell suspension were pipetted onto a Corning 96-well microplate and H₂O₂ production was measured after loading cells with DCFH-DA. Different treatments were compared to control cells: (i) apple cells + concentrated filtrate; (ii) apple cells + concentrated filtrate + DPI (10 μM at final concentration); (iii) apple cells + concentrated filtrate + SOD (2.75 units at final concentration). Fluorescence was measured using a Wallac “Victor” Multilabel counter every 2 min for 2 h immediately after DCFH-DA addition. H₂O₂ production was measured in triplicate for each treatment.

3. RESULTS

Effect of fungal treatments on cell viability

Apple cell viability remained constant at about 90% over the 8 h time course. No significant differences in viability between control and *P. expansum*-treated cells were found (Fig. 1). Cell mass did not change during the experiment for both treatments (data not shown).

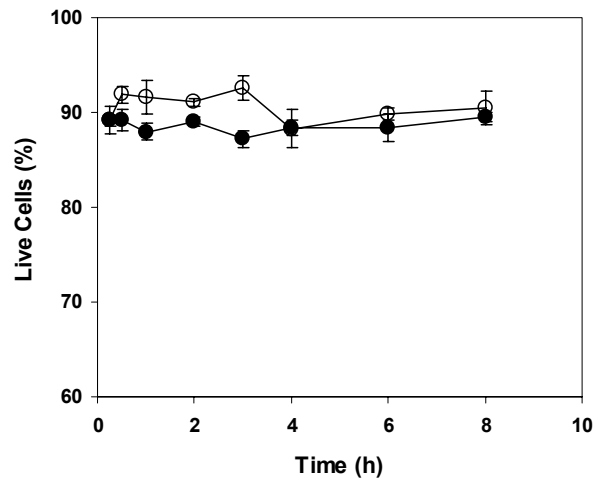


Figure 1: Changes in the viability of apple cells growing at 25°C. Viability was measured with Evan's Blue staining. Different treatments were applied: (●) apple cell culture inoculated with *P. expansum* at a final concentration of 2×10^5 conidia ml⁻¹; (○) untreated apple cell culture (control). Data represent the mean of three different flasks and three samples taken from each flask. Bar = S.E.

H₂O₂ induction

In the 8 h experiment, there was a rapid rise in H₂O₂ levels in *P. expansum*-treated cells during the first hour and the levels then progressively decreased (Fig. 2A). Control cells did not show any increase during this period.

In a subsequent 3-day experiment (Fig. 2B) the initial H₂O₂ burst was again observed in *P. expansum*-treated cells. After this peak, H₂O₂ production decreased. After about 24 h, an extended increase in H₂O₂ production was observed, peaking at about 40 h after inoculation and remaining elevated through day 3. In the control cells, H₂O₂ increased slightly about 30 h after the start of the experiment (Fig. 2B) and then remained stable until the end of the experimental period.

2. ROS IN APPLE CELLS INOCULATED WITH *Penicillium expansum*

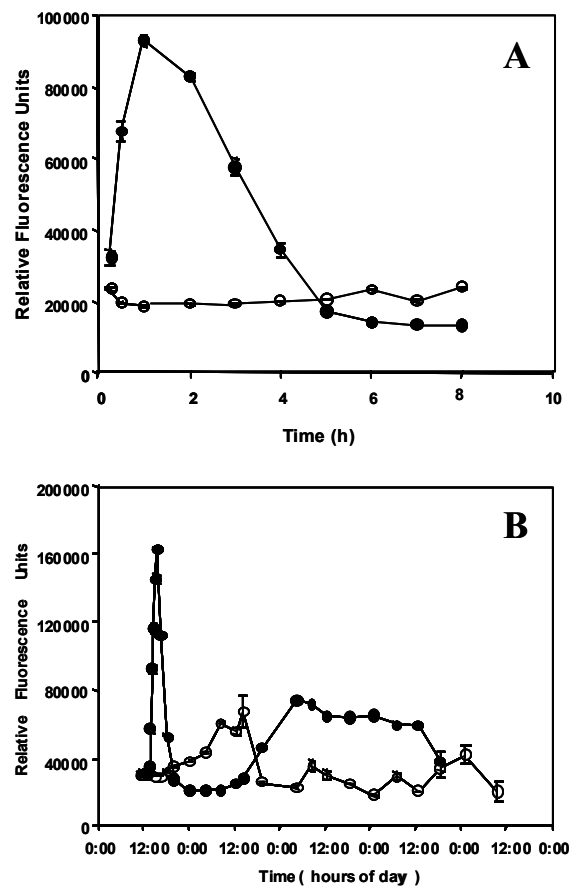


Figure 2: Changes in H_2O_2 contents in apple cells after inoculation with *P. expansum* solution, on a short-term (A) and on a long-term basis (B). Cells were treated as follows: (○) untreated apple cell culture (control); (●) apple cell culture inoculated with *P. expansum* at a final concentration of 2×10^5 conidia ml^{-1} . H_2O_2 was assayed using DCFH-DA. Data represent the mean of three different flasks and three samples taken from each flask. Bar = S.E.

The imaging data in (Fig. 3), confirmed the results of the fluorimetric measurements. One hour after inoculation, there was a substantial increase in pixel intensity (about 4-fold) in *P. expansum*-treated cells over the controls.

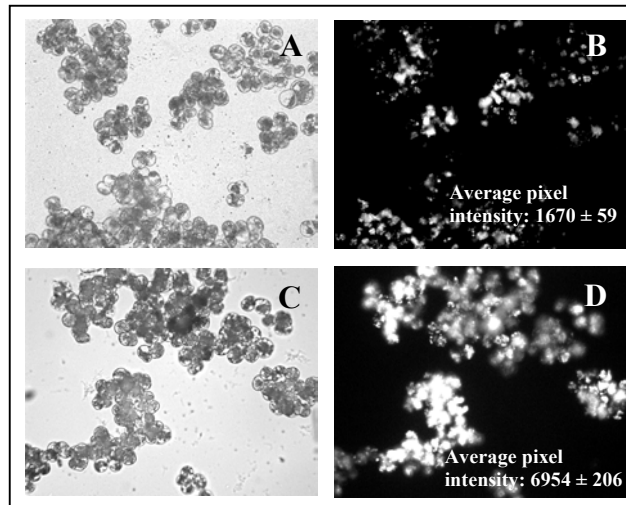


Figure 3: Imaging of fungal-induced increases in H_2O_2 within apple cells. Cells were loaded with DCFH-DA for 5 min before imaging. A and B are non-treated cells and C and D were treated cells, 1 h after *P. expansum* inoculation. Average pixel intensity refers to the average fluorescence for 2 fields of view, 2 replicate experiments and measurement of at least 50 cells

Changes in antioxidant enzyme activity

The enzymatic ROS scavengers SOD, CAT and POX were measured for 3 h after inoculation, a time corresponding with the first peak in H_2O_2 production (Fig. 2A). No significant changes in SOD activity were found between controls and *P. expansum*-treated cells (Fig. 4A). Whilst the same results were found for CAT (Fig. 4B), POX activity was substantially lower at all time points in inoculum-treated cells (Fig. 4C).

Effects of fungal filtrate and DPI on H_2O_2 production

In order to establish if a soluble compound from the pathogen, acting as a putative elicitor, might trigger the oxidative response, a similar analysis was carried out with only the fungal filtrate. Apple cells were treated with the fungal filtrate or with the same filtrate 4x concentrated, the latter to amplify any effect. The filtrate was sterile (checked on agar plates, and for its ability to cause infection of the cells). Over the 3 h, untreated cells did not show any significant change in H_2O_2 production (Fig. 5A). In contrast, cells treated with non-concentrated filtrate exhibited a slight but significant increase in H_2O_2 peaking at about 2 h,

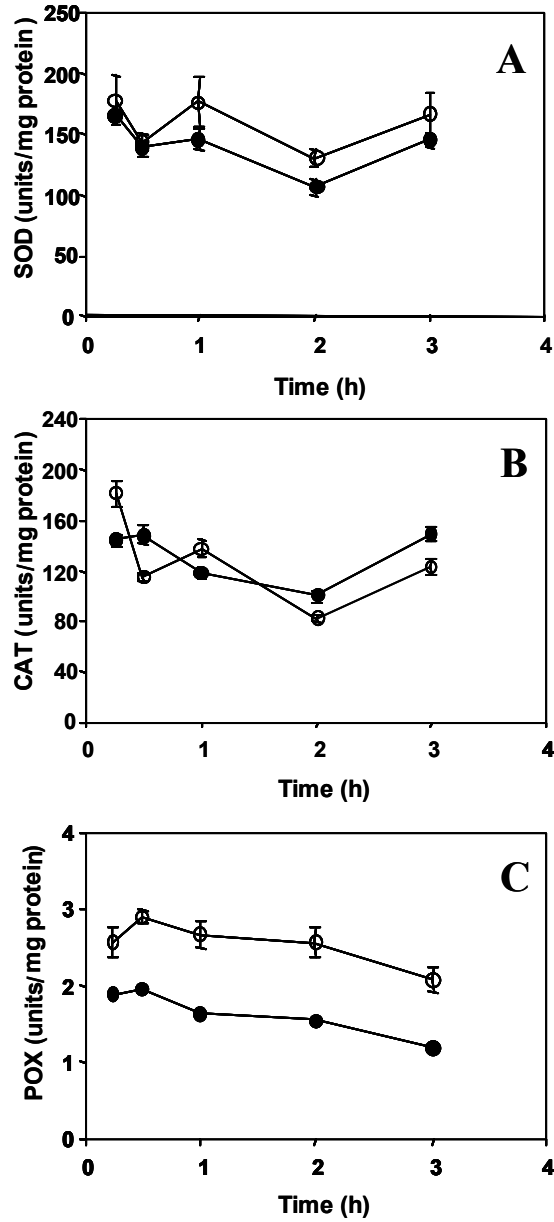


Figure 4: Changes in antioxidant enzyme activities SOD (A), CAT (B) and POX (C) in apple cells after inoculation with *P. expansum*. Cells were treated as follows: (●) apple cell culture inoculated with *P. expansum* at a final concentration of 2×10^5 conidia ml^{-1} ; (○) untreated apple cell culture (control). Data represent the mean of three different flasks and three samples taken from each flask. Bar = S.E.

To test whether NADPH oxidase activity was involved in H_2O_2 production, cells with and without the concentrated filtrate were treated with the inhibitor DPI, and SOD was also used to enhance dismutation of O_2^- to H_2O_2 . Over about 100 min there was a gradual increase in H_2O_2 production that was enhanced by the filtrate. Addition of SOD further enhanced production, and removed the lag phase of the curve (Fig. 6). DPI almost completely inhibited the filtrate-induced increase in H_2O_2 .

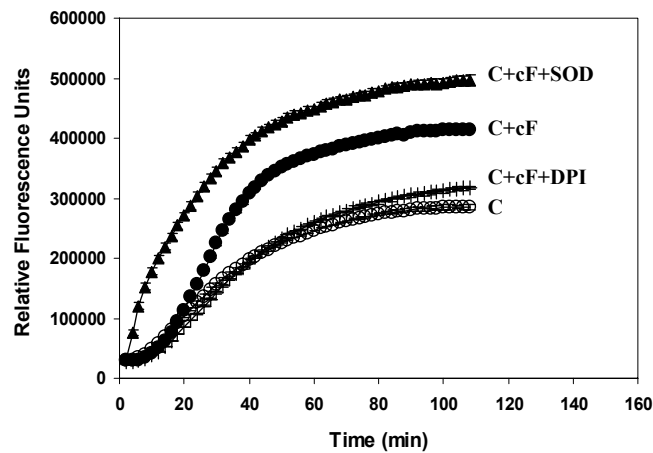


Figure 6: Effects of the addition of superoxide dismutase (SOD) and diphenyleneiodonium (DPI) on the filtrate-induced increase in H_2O_2 contents in apple cells. (C - \circ) untreated cells; (C+cF - \bullet) cells treated with the concentrated filtrate; (C+cF+SOD - \blacktriangle) cells treated with the concentrated filtrate and 2.75 units of SOD; (C+cF+DPI - $+$) cells treated with the concentrated filtrate and 10 μ l DPI. H_2O_2 was assayed using DCFH-DA. Data represent the mean of triplicate flasks, with three samples taken from each flask per time point. Bar = S.E.

4. DISCUSSION

Using suspension-cultured cells provides advantages for the physiological study of plant-pathogen interactions; more accurate and real-time measurement of H_2O_2 becomes possible (unlike taking samples from organs or tissues). This has allowed us to view the phase I response of the apple cell to *P. expansum*. Rapid generation of ROS is a characteristic early event of plant-pathogen interactions (Sutherland, 1991, Mehdy, 1994). In this study we have demonstrated that *P. expansum*, the most important disease agent in apple fruit, caused an

increase in H_2O_2 in suspension-cultured apple cells. This result confirmed our previous work with whole fruit (Torres et al., 2003) and suggests that ROS, and more especially H_2O_2 , may be underlying factors involved in the resistance of apple fruit against *P. expansum*.

The early, rapid burst in H_2O_2 observed immediately after pathogen addition is a typical phase I response (Baker and Orlandi, 1995). Over the longer period of 3 days, the second extended accumulation of H_2O_2 in the apple cells inoculated with *P. expansum*, was more likely the result of infection (visual observation) than a phase II of the oxidative burst. The increase in H_2O_2 observed in control cells was possibly due to perturbation of cells during initial aeration and transfer at the beginning of the experiment. This response has been observed in this apple cell culture before (Allan et al., 2005), and may be a general stress response or related to an increase in cell division with the onset of log phase growth.

We also characterized in this work that some compound in the *P. expansum* filtrate was able to induce the same H_2O_2 response, suggesting that the source of response is within the apple cell. Imaging of the cell response supports this hypothesis. The source of this H_2O_2 production appears to be a flavin-containing oxidase, such as NADPH oxidase, because of the sensitivity of the phase I burst to DPI. DPI, apart of being NADPH oxidase specific, is known to inhibit peroxidase-mediated generation of H_2O_2 (Frahry and Schopfer, 1998). In this context, the generation of H_2O_2 may occur by both NADPH oxidase and POX activities. On the other hand, filtrate-induced H_2O_2 was also enhanced by addition of exogenous SOD, suggesting the dismutation of O_2^- to H_2O_2 . Such processes and particularly the involvement of DPI-dependent oxidases have been implicated in many other plant-pathogen interactions (Doke, 1985; Vera-Estrella et al., 1992; Auh and Murphy, 1995, Allan and Fluhr, 1997, Alvarez et al., 1998, Allan et al., 2001, Dat et al., 2003).

In plants, H_2O_2 plays a role both in signal defense responses and in driving cell death. Therefore, increases in cellular H_2O_2 must be tightly controlled by both small molecule antioxidants (e.g. ascorbic acid, GSH) and enzymes that both produce and scavenge H_2O_2 . We measured three such enzymatic systems: total SOD, CAT and POX activities. No significant changes in SOD and CAT were found after inoculation with the fungal solution. In contrast, POX activity remained slightly lower during the whole experimental period, which would favor the accumulation of H_2O_2 . This could be a factor in triggering the oxidative burst. Previous studies (Allan et al., 2005) have shown that exposure of these apple suspension cells to low temperature also elicits H_2O_2 and reduces total POX activity. Therefore in both model apple cell suspensions and whole apple fruit (Torres et al., 2003; Valentines et al., 2005), POX appears to be an underlying factor involved in resistance

mechanisms, a factor involved in the accumulation of ROS in whole fruit, and in the development of lignification processes.

POX catalyses many reactions in the plant cell. The most thoroughly understood is the utilization of H₂O₂ to oxidize numerous substrates (peroxidative mode). Peroxidase may also mimic the action of catalase producing molecular oxygen at the expense of H₂O₂ and in the absence of other reactants (Baker et al., 2000). This enzyme can finally produce H₂O₂ via utilization of NAD(P)H, thus providing an oxidant for the oxidative burst associated with plant-pathogen interactions (Allan and Fluhr, 1997; Mahalingam and Federoff, 2003). All these metabolic actions of peroxidase suggest that the fast down-regulation as observed in this interaction favored directly or indirectly the accumulation of H₂O₂. They also indicate that levels of ROS are likely to be underestimated, rather than the other way around.

Our results were consistent with the presence of an active elicitor(s) in the culture filtrate. This elicits H₂O₂ in a reaction that resembles both phases I and II of an oxidative burst. After concentration of the filtrate, H₂O₂ production was significantly higher for both phases. This increase was similar to those observed in the phase II of an incompatible plant-pathogen interaction and similar, for example, to the ROS increase observed in the soybean-Psg (*avrA*) (Levine et al., 1994) and tobacco-*Pseudomonas sp.* (Baker et al., 1991) interactions. In other cell culture systems phase II-related increases in ROS are generally observed after 4 to 6 h when the cells were treated directly with the pathogen (Baker et al., 1991), and after 10 to 12 h when an elicitor was used (Able et al., 2003). In our case, the elicitation process started later, after 48 h. This delay in response may be due to impurity of the elicitor solution, or to the nature of the apple cell, which is more intransigent, requiring sub-culturing less frequently and responding more slowly to abiotic stresses (Allan et al., 2005).

The results obtained in this study provide evidence of the involvement of ROS in the apple-*P. expansum* interaction model. The response promoted by the fungal filtrate indicates also that an elicitor able to induce a hypersensitive response over a longer time period may be involved. It is the first time to our knowledge that such an elicitation process has been found in pome fruit *in vitro* or *in vivo*. Further work is needed to determine the real chemical nature of this elicitor. This will be of interest for the understanding of the physiological basis of the apple-*P. expansum* interaction and for possible commercial applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank M. Manning (HortResearch, Auckland) for providing the *P. expansum*. M.C. Valentines is the recipient of a grant from Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

LITERATURE CITED

ABLE, A.J., GUEST, D.I., SUTHERLAND, M.W. 2000. Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Physiology*, 124:899-910.

ABLE, A.J., SUTHERLAND, M.W., GUEST, D.I. 2003. Production of reactive oxygen species during non-specific elicitation, non-host resistance and field resistance expression in cultured tobacco cells. *Functional Plant Biology*, 30:91-99.

ALLAN, A.C., FLUHR, R. 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 9:1559-1572.

ALLAN, A.C., LAPIDOT, M., CULVER, J.N., FLUHR, R. 2001. An early tobacco mosaic virus-induced oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein. *Plant Physiology*, 126:97-108.

ALLAN, A.C., MADDUMAGE, R., SIMONS, J.L., NEILL, S.O., FERGUSON, I.B. 2005. Temperature-induced oxidative activity in plant cell suspensions; implications for cold sensitivity. *Functional Plant Biology*, In press.

ALVAREZ, M.E., PENNELL, R.I., MEIJER, P.-J., ISHIKAWA, A., DIXON, R.A., LAMB, C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92:773-784.

AUH, C.-K., MURPHY, T.M. 1995. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of H₂O₂ by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiology*, 107:1241-1247.

- BAILLY, C., BENAMAR, A., CORBINEAU, F., CÔME, D. 1996. Changes in malonaldehyde content and in superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated ageing. *Physiologia Plantarum*, 97:104-109.
- BAKER, C.J., DEAHL, K., DOMEK, J., ORLANDI, E.W. 2000. Scavenging of H₂O₂ and production of oxygen by horseradish peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382:232-237.
- BAKER, C.J., HARMON, G.L., GLAZENER, J.A., ORLANDI, E.W. 1995. A non-invasive technique for monitoring peroxidative and H₂O₂-scavenging activities during interactions between bacterial plant pathogens and suspension cells. *Plant Physiology*, 108:353-359.
- BAKER, C.J., O'NEILL, N.R., KEPPLER, D.L., ORLANDI, E.W. 1991. Early responses during plant-bacteria interactions in tobacco cell suspensions. *Phytopathology*, 81:1504-1507.
- BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 33:299-321.
- BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. 1999. Active oxygen and pathogenesis in plants. In: *Plant-Microbe Interactions*. Vol. 4. STACEY, G., KEEN, N.T. (eds.) APS Press. St. Paul. Minnesota.
- BOLWELL, G.P., WOJTASZEK, P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51:347-366.
- BOWEN, J., LAY-LEE, M., PLUMMER, K., FERGUSON, I.B. 2002. The heat shock response is involved in thermotolerance in suspension-cultured apple fruit cells. *Journal of Plant Physiology*, 159:599-606.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- CLAIRBORNE, A. 1985. In: *Catalase activity. Handbook of methods for oxygen radical research*. GREENWALD, R. (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- CODRON, H., LATCHÉ, A., PECH, J.C., NEBIE, B., FALLOT, J. 1979. Control of quiescence and viability in auxin-deprived pear cells in batch and continuous culture. *Plant Science Letters*, 17:29-35.

DANGL, J., DIETRICH, R., RICHBERG, M. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, 8:1793-1807.

DAT, J.F., PELLINEN, R., BEECKMAN, T., VAN DE COTTE, B., LANGEBARTELS, C., KANGASJARVI, J., INZE, D., VAN BREUSEGEM, F. 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant Journal*, 33:621-32.

DE GARA, L., DE PINTO, M.C., TOMMASI, F. 2003. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41:863-870.

DEVLIN, W.S., GUSTINE, D.L. 1992. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiology*, 100:1189-1195.

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. *Physiological Plant Pathology*, 23:345-357.

DOKE, N. 1985. NADPH-dependent O₂⁻ generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology*, 27:311-322.

DOKE, N., MIURA, Y. 1995. *In vitro* activation of NADPH-dependent O₂⁻ generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46:17-28.

FRAHRY, G., SCHOPFER, P. 1998. Inhibition of O₂-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleiiodonium. *Phytochemistry*, 48:223-227.

IWANO, M., CHE, F.S., GOTO, K., TANAKA, N., TAKAYAMA, S., ISOGAI, A. 2002. Electron microscopic analysis of the H₂O₂ accumulation preceding hypersensitive cell death induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* in cultured rice cells. *Molecular Plant Pathology*, 3:1-8.

KOMBRINK, E., SOMSSICH, I.E. 1995. Defense responses of plants to pathogens. *Advances Botany Research*, 21:1-34.

LAMB, C., DIXON, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:251-275.

LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79:583-593.

LURIE, S., FALLIK, E., HANDROS, A., SHAPIRA, R. 1997. The possible involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50:141-149.

MAHALINGAM, R., FEDEROFF, N. 2003. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, 119:56-68.

McCORD, J.M., FRIDOVICH, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244:6049-6055.

MEHDY, M.C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*, 105:467-472.

PENG, M., KUĆ, J. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, 82:696-699.

RYALS, J., NEUENSCHWANDER, U., WILLITS, M., MOLINA, A., STEINER, H.Y., HUNT, M. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8:1809-1819.

SUTHERLAND, M.W. 1991. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39:79-93.

TORRES, R., VALENTINES, M.C., USALL, J., VIÑAS, I., LARRIGAUDIÈRE, C. 2003. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 27:235-242.

VALENTINES, M.C., VILAPLANA, R., TORRES, R., USALL, J., LARRIGAUDIÈRE, C. 2005. Specific roles of enzymatic browning

and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*, in press.

VANCE, C., KIRK, T., SHERWOOD, R. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18:259-288.

VERA-ESTRELLA, R., BLUMWALD, E., HIGGINS, V.J. 1992. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. *Plant Physiology*, 99:1208-1215.

SUMMARY

The roles of enzymatic browning and lignification as resistance mechanisms against *Penicillium expansum* were investigated in 'Golden Delicious' apples picked at different maturity stages. To determine enzymatic browning, the browning potential of the pulp was determined on different fruit, with or without ascorbate, and with or without 4-methylpyrocatechol, substrate of polyphenol oxidase (PPO), and guaiacol, to obtain maximal peroxidase (POX) activity. Moreover, the activity of PPO and POX enzymes was determined at each harvest date and lignin content was measured at harvest and after storage in order to correlate it with disease resistance. Initially, when pulp tissue was treated with ascorbate, decay incidence was negatively correlated with browning. In this mechanism, the enzymatic activities of PPO and POX did not limit the reaction. In contrast, the availability of their substrates was limiting. When fruit were pre-incubated with 4-methylpyrocatechol, an increase in susceptibility to the pathogen was observed in immature apples (harvest 1). On the other hand, pre-incubation with guaiacol led to increased resistance in the immature fruit. Lignin content was highly negatively correlated with decay incidence. These results provide evidence that enzymatic browning is not a determining factor of apple resistance. In contrast, POX activity appeared to be an important factor especially through its action on lignification, which appeared to be involved in the resistance of apple fruit to *P. expansum*.

1. INTRODUCTION

Enzymatic browning is one of the most important undesirable reactions that occur in apple fruit. This reaction, in which phenolic compounds are oxidized by polyphenol oxidase (EC 1.14.18.1; PPO) to *o*-quinones and in turn polymerised to brown or dark pigments (melanins), is related to PPO activity and to the total concentration of phenolics (Vámos-Vigyázó et al., 1985). Some studies in different species such as apples (Nicolas et al., 1994), pears (Richard-Forget and Gaillard, 1997) and pineapples (Teisson, 1972) have shown that peroxidases (EC 1.11.1.7; POX) may also contribute to enzymatic browning. The extent of the involvement of peroxidases in enzymatic browning has remained doubtful, especially because of the high affinity of PPO for its natural substrates and the low levels of H₂O₂ in fruit (Richard-Forget and Gaillard, 1997).

Enzymatic browning depends on the ripening stage of apple fruit (Murata et al., 1995). Since disease resistance mechanisms are also

influenced by the maturity stage of apple fruit (Torres et al., 2003), we raised the possibility of the involvement of enzymatic browning as a resistance mechanism in Golden Delicious apples to *Penicillium expansum*. This relationship has been already described in various fruit species (Lattanzio et al., 1994) but remains to be demonstrated in apple fruit.

It is recognized that hydrogen peroxide plays an underlying role in plant-pathogen interactions (Medhy et al., 1996). Furthermore, and as a response to stress, H₂O₂ initiates signalling responses that involve enzyme activation, gene expression, programmed cell death and cellular damage (Bolwell, 1999; Orozco-Cardenas et al., 2001; Rao and Davis, 2001). In plant-pathogen interactions more specifically, H₂O₂ may be involved in various defence responses such as oxidative cross-linking of cell wall proteins, a direct antimicrobial effect, host cell death or regulation of host defence genes (Medhy et al., 1996). In agreement with these results, H₂O₂ also appeared to be a key element involved in disease resistance of 'Golden Delicious' apple fruit to *P. expansum* (Torres et al., 2003). According to this work, significant differences in H₂O₂ levels were found between resistant and susceptible fruit at the beginning of the wounding/infection process. In disease-resistant apple fruit, an increased level in H₂O₂ was associated with a significant increase in superoxide dismutase activity while peroxidase and catalase activities remained unchanged. These enzymatic changes explain the increase in H₂O₂ levels and are evidence that this compound is a key parameter in determining disease resistance in apple fruit.

In unstressed plants, H₂O₂ is a natural by-product of photosynthetic and respiratory activities effectively scavenged by electron carriers and antioxidant scavengers. However, H₂O₂ can be also synthesized through the autoxidation and tyrosinase-catalyzed oxidation of (+)-catechin (Jiang and Miles, 1993). H₂O₂ generated by this pathway may contribute to increase the activity of POX and, in consequence, enzymatic browning.

Associated with H₂O₂, POX enzyme is also involved in lignification, a defence mechanism that plays an important role in the hypersensitive response of plants to pathogens (Vance et al., 1980). Lignification is a complex process that involves several different phenolic substrates and enzymes. POX enzyme plays a key role in this process as a terminal enzyme involved in the polymerisation and synthesis of lignin.

The objective of this work was to determine the relationship between browning potential and resistance to *P. expansum* in apple fruit. Specific inhibitors and substrates were used to determine the specific role of both PPO and POX enzymes in disease resistance. Relationship between lignin content and disease resistance was also studied in order to cover the maximal reactions in which POX is involved.

2. MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Polyvinylpyrrolidone (PVPP) was purchased from Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and guaiacol from Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). 4-methylpyrocatechol, citric acid, cysteine and pyrocatechol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Unless stated otherwise, other chemicals were of analytical grade purchased from Prolabo (Fontenay sous Bois, France).

Fruit source

Apples (*Malus domestica* L. cv 'Golden Delicious') were obtained from an orchard in Mollerussa (Catalonia, Spain). Immature fruit were harvested on August 25, 2003 (harvest 1), two weeks before the optimal harvest date. Mature fruit were harvested on September 22, 2003 (harvest 2), two weeks after the optimal harvest date. Fruit were harvested and selected on the basis of size and the absence of defects. Fruit were stored for 3 months in a 23 m³ chamber at 1 kPa O₂ + 1 kPa CO₂, 0.5°C and 90 % RH.

Determination of maturity parameters

Firmness was measured on two opposite peeled sides using a penetrometer (Effegi, Milan, Italy) fitted with an 11 mm diameter probe. Soluble solids concentration (SSC) was determined by measuring the refractive index of the juice (Atago, Tokyo, Japan), and data were expressed as percentages (g per 100 g fresh weight F.W). Acidity was measured in 10 ml of juice diluted in 10 ml H₂O and titrated with 0.1 M NaOH solution. Acidity was expressed in grams of malic acid per litre of juice. Starch hydrolysis was scored visually by using a 1-10 scale (1, full starch; 10, no starch), after staining an equatorial section with 0.6% (w/v) I₂- 1.5% (w/v) KI solution. Data on maturity parameters represent the mean of 20 individual fruit. The same fruit were used to determine all the maturity indexes.

Determination of browning potential

For this experiment the fruit were separated in four sets: (1) untreated control fruit (natural browning); (2) fruit treated with 1% ascorbic acid (browning inhibitor); (3) fruit treated with 0.05% 4-methylpyrocatechol (PPO substrate); and (4) fruit treated with 0.5% guaiacol (POX substrate). On one half of the fruit, the skin was removed on 30 mm x 20 mm of surface and the underneath pulp tissue impregnated with sufficient quantity of the solutions described above. The other half of

the fruit was used as a non-browning control, that was treated with a solution that inhibit browning and contained 0.5% citric acid, 0.1% thiourea and 0.5% sodium fluoride. Browning was measured directly with a portable tristimulus colorimeter (Chromameter CR-200, Minolta, Japan) at different times during 1 hour using the CIELAB coordinates (L^* , a^* , b^*). Total colour difference was calculated from the former variables using the ΔE^* formula (Kuczynski et al., 1993). Data on browning capacity represent the mean of 10 individual fruit for each set and harvest date.

Extraction of the enzymes involved in enzymatic browning

Enzyme activity determinations were carried out on pulp tissue cut into small pieces, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. For extraction, pulp tissue (10 g FW) was ground in liquid nitrogen and homogenized in 10 ml 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6), 0.5 mM cysteine, and 5% (w/v) polyvinylpyrrolidone. The homogenate was filtered through two layers of miracloth and centrifuged at $20,000 \times g$ for 15 min, and a 2.5 ml aliquot was then loaded onto a Sephadex G-25 column (PD-10, Pharmacia, Madrid, Spain) previously equilibrated with 10 ml 0.1 M phosphate buffer (pH 6). The enzymes were eluted with 3.5 ml of the same buffer. The resulting supernatant was used as an enzyme extract for determining total peroxidase and polyphenol oxidase.

Assays of the enzymes involved in enzymatic browning

POX activity was measured by the method described by Lurie et al. (1997) with some modifications, following the colour changes of the extract at 470 nm with 10 mM guaiacol and 10 mM H_2O_2 . PPO activity was measured spectrophotometrically at 400 nm in a reaction mixture containing 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6) and 65 mM pyrocatechol (Soliva-Fortuny et al., 2001). Enzyme activities were expressed in units of activity (U.a.), for which one U.a. represents the quantity of enzyme responsible for a change in absorbance of 1 absorbance unit min^{-1} . Data on enzyme activities represent the mean of 6 individual fruit for each harvest date.

Determination of lignin content

Lignin content was measured in unwounded fruit at each harvest date. After storage and in order to ensure more variability, fruit from each harvest date were separated in four sets to determine lignin content: (1) unwounded; (2) wounded; (3) wounded + 15 μl of distilled water; and (4) wounded + 15 μl of 0.5% guaiacol. Nine wounds were made with a

nail by making an injury 2 mm in diameter and 2 mm deep, randomly distributed on a half of the fruit. After 2 hours, pulp from the wounded side was frozen in liquid nitrogen and lyophilised for 3 days. The pulp was then ground to a fine powder and washed thoroughly on Whatman No. 1 filter paper with water, ethanol and twice with acetone. The washed powder was transferred from the filter paper to small aluminium cups and dried at 70°C for 1 h. The digestion of the dried powder was carried out as described by Nafussi et al. (2001) but without dilution of the digested solution in order to have adequate absorbance during the analysis procedure. Samples of 5 mg of dried powder were digested with a solution of 25% (w/w) acetyl bromide in acetic acid (0.5 mL) and HClO₄ (70%, 0.02 mL) and heated at 70°C for 30 min. After digestion, bottles were cooled and the contents were transferred to a 10-mL volumetric flask containing 2M sodium hydroxide (2 mL) and acetic acid (2.4 mL). The bottle was rinsed and the solution was made up to 10 mL with acetic acid. Lignin content was expressed as absorbance at 280 nm. Data represent the mean of 6 individual fruit for each set.

Treatments, inoculation with *P. expansum* and determination of decay incidence in apple fruit

P. expansum Link isolate CMP1 was isolated from apples decayed after several months in storage. Petri dishes of potato dextrose agar (PDA) were inoculated with this isolate and incubated at 25°C for 7-10 days. A conidial suspension was prepared in Tween 80 (0.05% w/v) in water and diluted to 10⁴ conidia ml⁻¹, after conidia had been counted with a haemocytometer.

At each harvest date, apples were wounded with a nail by making an injury 2 mm in diameter and 2 mm deep near the stem and calyx ends of the fruit. For the analysis of the relationship between browning potential and decay incidence, the wounds were inoculated with 15 µl of sterile water (control), 1% ascorbic acid, 0.05% 4-methylpyrocatechol or 0.5% guaiacol and, after 2 hours, inoculated with 15 µl of the aqueous suspension of *P. expansum* 10⁴ conidia ml⁻¹.

For the analysis of the relationship between lignin content and percentage of infected wounds, the same sets as used in lignin content determination from each harvest date were prepared (unwounded fruit at harvest, and after storage: unwounded fruit, wounded fruit, wounded + 15 µL distilled water treated fruit, and wounded + 15 µL of 0.5% guaiacol treated fruit), and two hours after the respective treatment, inoculated with 15 µl of the aqueous suspension of *P. expansum* 10⁴ conidia ml⁻¹.

For the determination of decay incidence, the inoculated apples were incubated at 20°C and 85% RH and the percentage of infected wounds

measured after 7 days, which represents decay incidence. Five apples constituted a single replicate and each treatment was repeated four times.

Data processing and statistical analysis

Data were analysed for significant differences by analysis of variance (ANOVA) with the statistical package SAS from Microsoft and subjected to mean separation by the LSD (Least Significant Difference) test, $P < 0.05$.

3. RESULTS

Changes in maturity parameters and in enzymatic browning enzyme activity

Significant differences in maturity indexes were found between harvest dates (Table 1). As expected, earlier harvested fruit had significantly higher firmness and acidity values whereas lower starch index. No significant differences were found in SSC values. Concerning enzyme activity, fruit harvested later showed significantly lower POX activity (Table 2). In contrast, no significant differences were found for PPO activity between harvest dates.

Table 1: Effect of harvest date on maturity indexes in ‘Golden Delicious’ apples

	Firmness (N)	SSC ^a (%)	Acidity (g l ⁻¹ malic acid)	Starch index
Harvest 1	69.4 a	11.5 a	4.90 a	3.8 b
Harvest 2	55.6 b	12.0 a	4.19 b	8.5 a

^aSSC: soluble solid concentration. Mean of 20 individual fruit. Different letters in the same column indicate difference between means using LSD test ($P < 0.05$)

Table 2: Effect of harvest date on PPO and POX enzyme activity

	PPO (U. a. mg ⁻¹ protein)	POX (U. a. mg ⁻¹ protein)
Harvest 1	7.11 a	8.86 a
Harvest 2	5.15 a	7.28 b

Mean of 6 individual fruit. Different letters in the same column indicate difference between means using LSD test ($P < 0.05$)

Relationship between enzymatic browning and disease resistance

Immature fruit (harvest 1) not treated with ascorbic acid (control) exhibited high browning potential and levels of decay incidence of about 77 % (Fig. 1A). When the fruit were treated with ascorbic acid (AA), pulp browning decreased at the same time that disease incidence increased significantly up to 95 %. When ascorbic acid was applied, mature fruit followed the same pattern as in immature fruit. However, in mature fruit browning potential significantly decreased in comparison to the control, decay incidence did not show significant differences (Fig. 1B).

To complement this study and establish whether browning processes are involved in decay incidence, different browning substrates were used to enhance browning reactions. The substrates used in this experiment were guaiacol and 4-methylpyrocatechol, as POX and PPO substrates, respectively. For both harvest dates, guaiacol did not significantly increase enzymatic browning compared to the control (Fig 2). In contrast, 4-methylpyrocatechol significantly increased browning for both maturity stages. Clear differences were found between harvest dates, showing the highest browning potential the apples harvested earlier.

With regard to decay incidence, 4-methylpyrocatechol treatment significantly increased the number of decayed fruit in early harvested fruit (Fig. 3). When immature fruit were treated with guaiacol, those exhibited a significant decrease in decay incidence. In contrast, mature apples did not show significant differences in disease incidence between treatments.

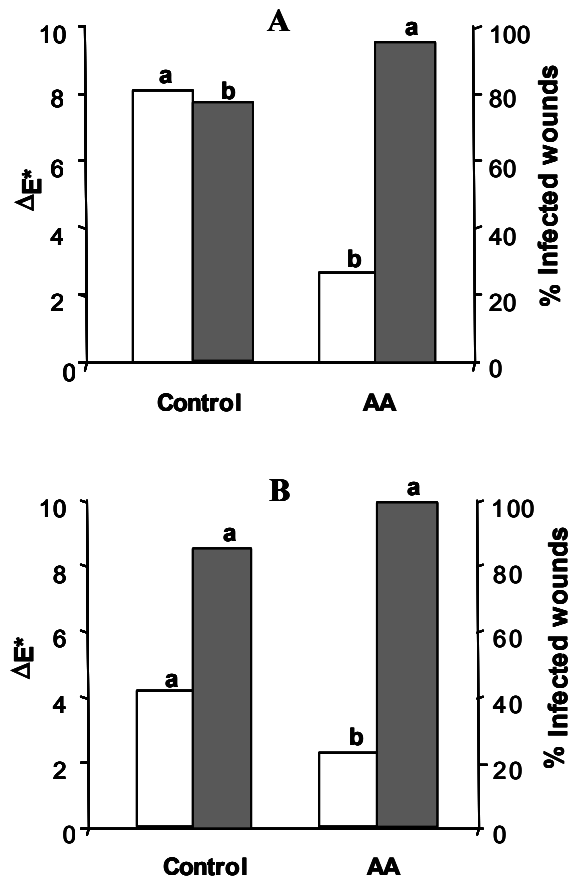


Figure 1: Effect of ascorbate treatment (AA) on flesh browning (\square), as ΔE^* , and decay incidence (\blacksquare), as % of infected wounds, in 'Golden Delicious' apples at different harvest dates, (A) harvest 1 and (B) harvest 2. Pulp tissue was untreated (control) or treated with 1% ascorbic acid (AA) and flesh browning was determined 30 minutes after treatment with regard to a blank. A second set of fruits was artificially wounded and inoculated with sterile water or 1% ascorbic acid. After 2 hours, fruits were inoculated with *P. expansum* at 10^4 conidia ml^{-1} and stored at 20°C and 85% RH for 7 days in order to assess decay incidence. Columns with different letters were significantly different according to an ANOVA analysis, LSD test ($P < 0.05$)

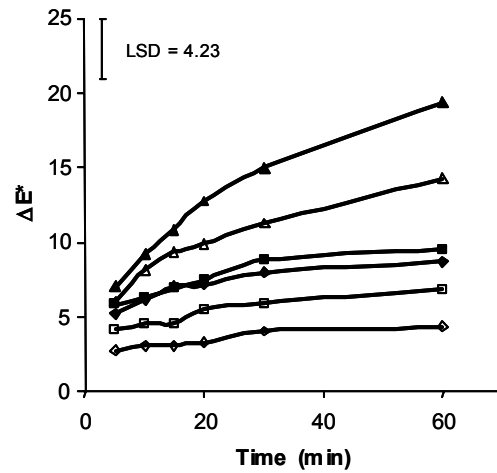


Figure 2: Influence of guaiacol and 4-methylpyrocatechol treatments on flesh browning in 'Golden Delicious' apples harvested at two different dates. Browning changes were monitored during 1 hour. (◆) control fruit - harvest 1; (◇) control fruit - harvest 2; (■) guaiacol treated fruit - harvest 1; (□) guaiacol treated fruit - harvest 2; (▲) 4-methylpyrocatechol treated fruit - harvest 1; (△) 4-methylpyrocatechol treated fruit - harvest 2. Pulp tissue was untreated (control) or treated with 0.5% guaiacol or 0.05% 4-methylpyrocatechol to determine the flesh browning with regard to a blank. Each point represents the mean of ten fruit. Bar = LSD ($P = 0.05$)

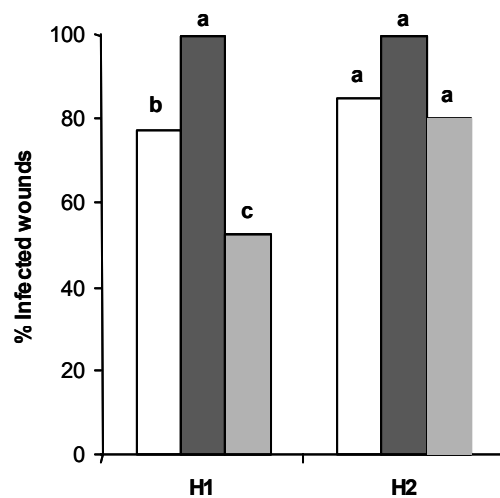


Figure 3: Influence of 4-methylpyrocatechol and guaiacol treatments on decay incidence (% of infected wounds) in 'Golden Delicious' apples harvested at two different dates. Fruit were artificially wounded and inoculated with 15 μ l of sterile water, 0.05% 4-methylpyrocatechol or 0.5% guaiacol. After 2 hours, wounds were inoculated with *P. expansum* at 10^4 conidia ml^{-1} and stored at 20°C and 85% RH for 7 days. (□) Control fruits; (■) 4-methylpyrocatechol treated fruits; (▒) Guaiacol treated fruits. H1: Harvest 1, H2: Harvest 2. For each harvest, columns with different letters were significantly different according to an ANOVA analysis, LSD test ($P < 0.05$)

Role of lignin content in disease resistance

Fig. 4 illustrates decay incidence versus lignin content. The results showed an excellent correlation, with a correlation coefficient of about 0.87. An inverse correlation was found, the higher the lignin content, the lower the decay incidence of the fruit.

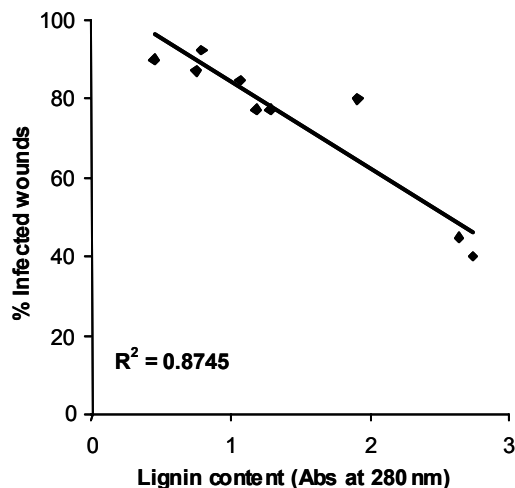


Figure 4: Relationship between disease incidence (% of infected wounds) and lignin content in ‘Golden Delicious’ apples. Data include fruit analysed at harvest, fruit analysed after three months of storage in CA (1kPa O₂ and 1kPa CO₂) at 0.5°C, and to increase decay resistance, fruit stored and treated with sterile water or 0.5% guaiacol. After 2 hours, lignin content was determined and another set of fruit was inoculated with *P. expansum* at 10⁴ conidia ml⁻¹ and stored at 20°C and 85% RH for 7 days in order to assess decay incidence

4. DISCUSSION

As generally observed, early harvested fruit significantly present higher browning potential (Murata et al., 1995). Our results also suggested that enzymatic browning depended on the fruit ripening stage, showing the highest browning potential in the earliest harvested fruit. Otherwise, no differences were found in PPO activity between harvest dates, a result that indicates that this enzyme was not a limiting factor for enzymatic browning. Such lack of correlation was previously reported for apples (Vámos-Vigyázó et al., 1985, Amiot et al., 1992), peaches and

nectarines (Cheng and Crisosto, 1995). This lack of correlation shows that the change in browning potential within harvest dates may be explained by a decline in the concentration of some browning activators such as fatty acids and organic acids (Hutcheson and Buchaman, 1980), or by a decrease in phenolic substrate synthesis with increasing maturity (Harel et al., 1966; Coseteng and Lee, 1987).

Ascorbic acid, which prevents quinone accumulation through reduction of quinones back to their original phenolics, is widely used to inhibit browning. In this work, ascorbic acid was used to determine the role that melanin might play in decay resistance. As shown by our results, ascorbate treatment induced a clear increase in decay incidence in early harvested fruit. This first result suggested a putative role of melanin in defence mechanism. However, ascorbate is a potent antioxidant that may inhibit several other physiological processes involved in defence mechanism. This compound may inhibit, for example, the development of oxidative processes and the accumulation of H_2O_2 , a compound that has been shown to play an important role in apple resistance against *P. expansum* (Torres et al., 2003).

The increase that 4-methylpyrocatechol induced in decay incidence might imply that PPO enzyme, and particularly the browning processes induced by 4-methylpyrocatechol and the accumulation of melanin, were not key elements for the control of disease resistance in 'Golden Delicious' apples. It also indicated that an overexpression of PPO leads to higher sensitivity towards the pathogen. This fact could be explained by the incompatibility existing between H_2O_2 and oxidized catechol (Jiang and Miles, 1993). These results confirm those obtained by Torres et al. (2003), and showed the important role that H_2O_2 and POX play in defence mechanism. To confirm this presumed role, fruit were treated with two substrates of POX activity: guaiacol and H_2O_2 . Guaiacol treatment caused a decrease in disease incidence and similar results were also observed when H_2O_2 was applied (result not shown). As guaiacol at this concentration was not toxic for *P. expansum* in the test of sensitivity, such a decrease in decay incidence indicated that, in contrast to PPO, POX enzyme was directly involved in the induction of defence mechanisms against *P. expansum*. The way by which POX acted was not related to its browning potential but rather to an H_2O_2 -associated physiological process. The role of PPO in this context appeared to be secondary and likely limited to a regulatory role on H_2O_2 content as described by Richard-Forget and Gauillard (1997). PPO and more especially laccase might be also involved in a synergetic process in which laccase might be responsible of the initial polymerisation of monolignols and peroxidase might function when H_2O_2 is produced (Alba et al., 2000).

Lignification is a general process involved in plant defence reaction, which can be associated to H_2O_2 through the action of POX enzyme.

Lignification occurs in many plants responding to pathogenic infection and aims to enhance mechanical strength of cell walls and deter fungal invasion (Ride, 1978). Our results showed an excellent correlation between disease resistance and lignin content, and indirectly showed the determining role that POX enzyme might play in this context as well. Studies on the role of peroxidases in lignification are numerous and well documented especially in herbaceous plants (Bowles, 1990; Lamb and Dixon, 1997) and in a lesser extent in woody plants (Imberty et al., 1985). However, little attention has been given to this enzyme and to the mechanism of disease resistance in fruit. The main studies have been carried out in citrus fruit in which lignification appeared to be a relevant factor for injury healing and prevention of green mould (Nafussi et al., 2001). To our knowledge, no prior reports have described this relationship in pome fruit.

The results presented here challenge the hypothesis that enzymatic browning and melanin formation associated with PPO activity were not the most important determining factors involved in apple disease resistance against *P. expansum*. In contrast, POX activity through its action on H₂O₂ content and in promoting lignification appeared to be a key factor involved in disease resistance. Further studies are needed to deeply understand the biochemical factors involved in POX regulation after infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

M.C. Valentines is the recipient of a grant from Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). The authors thank INIA (RTA02-073) for its financial support.

REFERENCES

- ALBA, C., MILRAD DE FORCHETTI, S., TIGIER, H. 2000. Phenoloxidase of peach (*Prunus persica*) endocarp: Its relationship with peroxidases and lignification. *Physiologia Plantarum*, 109:382-387.
- AMIOT, M.J., TACCHINI, M., AUBERT, S., NICOLAS, J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science*, 57:958-962.
- BOLWELL, G.P. 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion of Plant Biology*, 2:287-294.

BOWLES, D.J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry*, 59:873-907.

CHENG, G.W., CRISOSTO, C.H. 1995. Browning potential, phenolic composition, and polyphenol oxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. *Journal of the American Society for the Horticultural Science*, 120:835-838.

COSETENG, M.Y., LEE, C.Y. 1987. Changes in polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, 52:985-989.

HAREL, E. MAYER, A.M., SHAIN, Y. 1966. Catechol oxidases, endogenous substrates and browning in developing apples. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 17:389.

HUTCHESON, S.W., BUCHANAN, B.B. 1980. Polyphenol oxidation by *Vicia faba* chloroplast membranes. *Plant Physiology*, 66:1150-1154.

IMBERTY, A., GOLDBERG, R., CATESSON, A.M. 1985. Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidase involved in the last step of lignin formation. *Planta*, 164:221-226.

JIANG, Y., MILES, P.W. 1993. Generation of H₂O₂ during enzymic oxidation of catechin. *Phytochemistry*, 33:29-34.

KUCZYNSKI, A., VAROQUAUX, P., SOUTY, M. 1993. Reflectance spectra of 'ready-to-use' apple products for determination of enzymatic browning. *International Agrophysics*, 7:85-92.

LAMB, C., DIXON, R.A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:251-275.

LATTANZIO, V., CARDINALI, A., PALMIERI, S. 1994. The role of phenolics in the postharvest physiology of fruits and vegetables: browning reactions and fungal diseases. *Italian Journal of Food Science*, 1:3-22.

LURIE, S., FALLIK, E., HANDROS, A., SHAPIRA, R. 1997. The possible involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50:141-149.

MEHDY, M.C., SHARMA, Y.K., SATHASIVAN, K., BAYS, N.W. 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia Plantarum*, 98:365-374.

MURATA, M., TSURUTANI, M., TOMITA, M., HOMMA, S., KANEKO, K. 1995. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:1115-1121.

NAFUSSI, B., BEN-YEHOSHUA, S., RODOV, V., PERETZ, J., OZER, B.K., D'HALLEWIN, G. 2001. Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. *Journal of Science of Food Chemistry*, 49:107-113.

NICOLAS, J.J., RICHARD-FORGET, F., GOUPY, P., AMIOT, M.J., AUBERT, S. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. C.R.C., *Critical Review of Food Science Nutrition*, 34:109-157.

OROZCO-CARDENAS, M.L., NARVAEZ-VASQUEZ, J., RYAN, C.A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*, 13:179-191.

RAO, M.V., DAVIS, K.R. 2001. The physiology of ozone-induced cell death. *Planta*, 213:682-690.

RICHARD-FORGET, F., GAUILLARD, F.A. 1997. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:2472-2476.

RIDE, J.P. 1978. The role of cell wall in resistance to fungi. *Annals of Applied Biology*, 89:302-306.

SOLIVA-FORTUNY, R.C., GRIGELMO-MIGUEL, N., ODRIOZOLA-SERRANO, I., GORINSTEIN, S., MARTÍN-BELLOSO, O. 2001. Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:3685-3690.

TEISSON, C. 1972. Internal bruising of pineapple. *Fruit*, 27:603-607.

TORRES, R., VALENTINES, M.C., USALL, J., VIÑAS, I., LARRIGAUDIÈRE, C. 2003. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 27:235-242.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L., SCHUSTER-GAJZÁGÓ, I., NÁDUDVARI-MÁRKUS, V., HÁMORI-SZABÓ, J., SASS, P. 1985. Changes in the polyphenol – polyphenol oxidase complex of apples during ripening and storage. Part I: Variations related to cultivar, year and date of picking. *Chemische und Mikrobiologische Technologie von Lebensmitteln*, 9:37-47.

VANCE, C.P., KIRK, T.K., SHERWOOD, R.T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18:259-288.

SUMMARY

Four different cultivars were used to study the effect of wounding on H₂O₂ levels and lignin content and its relationship with disease resistance in apples. 'Golden Supreme', 'Golden Smoothie' and 'Pink Lady' apples were harvested at the optimal harvest date and 'Golden Delicious' apples at five different dates. Changes in H₂O₂ levels and lignin content were determined in unwounded and artificially wounded fruit and related to decay incidence. In unwounded fruit, no relationship between H₂O₂ content and decay incidence was found. After wounding all the different cultivars exhibited a clear increase in H₂O₂ levels and a significant correlation was found between H₂O₂ levels and decay incidence. The same behaviour was found for lignin accumulation after wounding showing the relationship existing between the increase in H₂O₂ levels and lignin accumulation. No differences in POX activity were found between cultivars before wounding but neither after wounding. Collectively these results showed that the resistance of apple fruit to *Penicillium expansum* is mainly due to rapid changes in H₂O₂ and lignin content. They also showed that POX enzyme was not involved in the accumulation of H₂O₂ and lignin after wounding and was not a determining factor of disease resistance.

1. INTRODUCTION

Consumers are used to have fruits all over the year and consequently, storage of apple fruit is basic in order to satisfy this demand. However, during the storage period an important part of the production cannot be commercialised because of physiological disorders or diseases. In apples, fungal pathogens may cause between 2 and 3% of loss (Palazón et al., 1984). The main causal agents are *Penicillium* spp. (70-80%), *Rhizopus nigricans*, *Gloeosporium album*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria* spp. (Palazón et al., 1984). Within *Penicillium* spp., the most prevalent species in apple or in storage rooms are *P. expansum* (30-62%) and *P. solitum* (6-45%) (Amiri and Bompeix, 2005). In the last years an extensive work has been done in determining technical and biochemical methods able to reduce decay incidence in apple. The main objective was to reduce the use of chemical pesticides and fungicides in a more sustainable way. Different treatments like 1-MCP, sodium bicarbonate, heat application, hot water dipping and biocontrol agents were assayed (Conway et al., 2004; Leverentz et al., 2003; Nunes et al., 2002; Spadaro et al., 2004). However, and despite of this apparent interest, very little is known about the physiological mechanisms

involved in the process of infection. In a first objective, this work aim to highlight these mechanisms.

One of the earliest events of a plant-pathogen interaction is the generation of reactive oxygen species (ROS) in a reaction called oxidative burst (Baker and Orlandi, 1995). Among these ROS, the most important specie is hydrogen peroxide (H_2O_2) because of its stability and slow reactivity with biological molecules. H_2O_2 may be involved in membrane peroxidation and in the cross-linking of cell wall proteins (Bradley et al., 1992). H_2O_2 may be also involved in phytoalexin accumulation (Devlin and Gustine, 1992), in the induction of defence-related genes (Levine et al., 1994) and finally in the hypersensitive response (Baker et al., 1993). In addition, H_2O_2 is also mainly involved in lignin deposition (Olson and Varner, 1993). Through these processes, plants lead to increased disease resistance (Vance et al., 1980) and induced systemic resistance (Dean and Kuć, 1987). Lignins also strengthen the cell wall, delaying, by this way, the penetration of the pathogen and protecting the host from the pathogen degradative enzymes.

In previous experiments, we suggested that H_2O_2 and lignification might play an important role in disease resistance of ‘Golden Delicious’ apple fruit (Torres et al., 2003). We first showed that disease resistance was related to changes in H_2O_2 content and that important differences in H_2O_2 content were observed during the wounding/inoculation process. The increase in H_2O_2 levels was related to specific changes in the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POX). In another work carried out on Golden Delicious apples, disease resistance was mainly related to the action of POX activity and especially to the action that this enzyme have in lignin formation (Valentines et al., 2005).

The aim of this work was to complement these previous studies. With this in mind, we measured the changes in H_2O_2 levels and lignin contents in apple fruit after the achievement of a mechanical injury. The study was mainly focussed in determining the role that wounding played in the interaction of apple fruit and *P. expansum*. This study was also carried out determining the variations related to harvest date and apple cultivars, in order to establish the level of specificity of this metabolic response in apple fruit.

2. MATERIAL AND METHODS

Fruit source

Apples (*Malus domestica* L. cv ‘Golden Supreme’, ‘Golden Delicious’, ‘Golden Smoothee’ and ‘Pink Lady[®]’) were obtained from different commercial orchards in the Lleida area (Catalonia, Spain). Harvests of

‘Golden Supreme’, ‘Golden Smoothie’ and ‘Pink Lady[®]’ were carried out at the optimal harvest date for long-term storage. ‘Golden Delicious’ apples were picked at five different dates, separated one week between them. The third ‘Golden Delicious’ harvest was the optimal date for long-term storage. Fruits were harvested and selected on the basis of size and the absence of defects, and according to the local recommendations established by packinghouses (firmness, soluble solid concentration and acidity values).

Preparation of the samples for biochemical analysis

At harvest, fruit were separated in two different samples: control fruit and wounded fruit. The wounding procedure was carried out making sixteen injuries 2 mm in diameter and 2 mm deep with a nail on one side of each apple. H₂O₂ levels were determined 4 hours after treatment in both sets. To determine the lignin content and peroxidase enzyme activity, the undamaged fruit side (control sample) or the pulp near the wounded area were cut into small pieces, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Determination of H₂O₂ levels

H₂O₂ content was determined using the Bioxytech H₂O₂-560 colorimetric assay from OXIS International Inc. (Portland, USA) and following the manufacturer’s instructions. The assay is based on the oxidation of ferrous ions (Fe²⁺) to ferric ions (Fe³⁺) by hydrogen peroxide under acidic conditions. The ferric ions bind with the indicator dye xylenol orange to form a stable coloured complex, which can be measured at 560 nm. H₂O₂ content was expressed as μmol kg⁻¹ of fresh weight (FW) and each value was the mean of four fruit determinations.

Determination of lignin content

Frozen pulp from both treatments was lyophilised for 3 days. The pulp was then ground to a fine powder and washed thoroughly on Whatman No. 1 filter paper with water, ethanol and twice with acetone. The washed powder was transferred from the filter paper to small aluminium cups and dried at 70°C for 1 h. The extraction of lignins was carried out as described by Nafussi et al. (2001) but without dilution of the digested solution in order to have adequate absorbance during the analysis procedure. Samples of 5 mg of dried powder were digested with a solution of 25% (w/w) acetyl bromide in acetic acid (0.5 mL) and HClO₄ (70%, 0.02 mL) and heated at 70°C for 30 min. After digestion, bottles were cooled and the contents were transferred to a 10-mL volumetric flask containing 2M sodium hydroxide (2 mL) and

acetic acid (2.4 mL). The bottle was rinsed and the solution was made up to 10 mL with acetic acid. Lignin content was expressed as absorbance at 280 nm. Data represent the mean of 6 individual fruit.

Determination of peroxidase activity

For extraction, pulp tissue (10 g FW) was ground in liquid nitrogen and homogenized in 10 ml 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6), 0.5 mM cysteine, and 5% (w/v) polyvinylpyrrolidone. The homogenate was centrifuged at 30,000 x g for 30 min, and a 2.5 ml aliquot was then loaded onto a Sephadex G-25 column (PD-10, Pharmacia, Madrid, Spain) previously equilibrated with 10 ml 0.1 M phosphate buffer (pH 6). The enzymes were eluted with 3.5 ml of the same buffer. The resulting supernatant was used as an enzyme extract for determining total soluble peroxidase.

For the determination of the ionic form of peroxidase, the pellet of the first centrifugation was mixed with 8 ml 0.5 M sodium chloride during 1 hour. The homogenate was filtered through two layers of miracloth and centrifuged at 20,000 x g for 15 min, and a 2.5 ml aliquot was then loaded onto a Sephadex G-25 column as previously described. The resulting supernatant was used as an enzyme extract for the determination of ionic peroxidase.

POX activity was measured as described by Lurie et al. (1997) following the absorbance changes of the extract at 470 nm with 10 mM guaiacol and 10 mM H₂O₂. Enzyme activities were expressed in units of activity (U.a.), for which one U.a. represents the quantity of enzyme responsible for a change in absorbance of 1 absorbance unit min⁻¹. Protein measurements were performed according to Bradford (1976). Data on enzyme activities represent the mean of 6 individual fruit.

Determination of decay incidence

P. expansum Link isolate CMP1 was isolated from apples decayed after several months in storage. This isolate was the most aggressive in our collection and caused the largest lesions on inoculated apples. Petri dishes of potato dextrose agar (PDA) were inoculated with this isolate and incubated at 25°C for 7 to 10 days. A conidial suspension was prepared in Tween 80 (0.05% w/v) in water and diluted to 10⁴ conidia ml⁻¹, after conidia had been counted with a haemocytometer.

To determine decay incidence, another sample, different to those used for the biochemical determinations was used. At each harvest date or for each apple cultivar, apples were wounded with a nail by making an injury 2 mm in diameter and 2 mm deep at the stem (top) and calyx (bottom). The wounds were inoculated with 20 µl of the aqueous suspension of *P. expansum*. Five apples constituted a single replicate

and each treatment was repeated four times. The inoculated apples were incubated at 20°C and 85% relative humidity and the percentage of infected wounds caused by *P. expansum* measured after 7 days.

3. RESULTS

Relationship between H₂O₂ content and disease resistance

In order to know if the levels of H₂O₂ were related to disease resistance, 'Golden Delicious' and other cultivars of the same 'Golden' group or 'Pink Lady[®]' apples were used. Two different kinds of relationship were established. The first one was established in control or unwounded fruit. The second was established 4 hours after wounding the fruit for all the different cultivars. In the absence of wounding, no correlation ($R^2=0.036$) was found between H₂O₂ content and decay incidence (Fig. 1A). In contrast, when the apples were artificially wounded, a significant correlation ($R^2=0.78$) was found between these parameters (Fig. 1B), the higher the H₂O₂ content was, the lower the incidence of decay the fruit showed.

Relationship between lignin content and disease resistance

The same kind of correlation was also established between lignin content before and after wounding and decay incidence. As for H₂O₂ levels, a very bad correlation ($R^2=0.012$) was found between lignin content and decay incidence in control fruit before wounding (Fig. 2A). In wounded fruit, lignin content and disease resistance were highly correlated ($R^2=0.84$ - Fig. 2B). As before, an inverse correlation was found, the higher the lignin content, the lower the decay incidence.

Role of peroxidase in disease resistance

Peroxidase enzyme activity was measured in its soluble and ionic forms (Table 1). In general, no significant differences were found for the different forms of enzyme activity between control and wounded fruit. Furthermore, no significant differences were found between cultivars, except for 'Golden Supreme', which exhibited higher soluble POX activity when compared to the other cultivars.

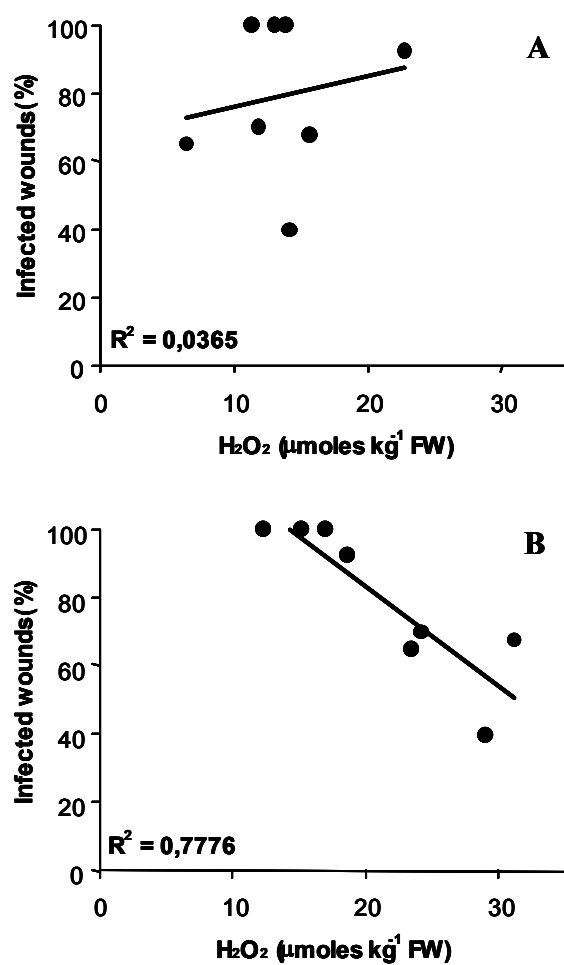


Figure 1: Relationship between disease incidence (% of infected wounds) and H₂O₂ amount ($\mu\text{moles kg}^{-1}$ FW). (A): Correlation in control (unwounded) fruits; (B): Correlation in artificially wounded fruits 4 hours after wounding. Decay incidence was determined on a second set of fruit inoculated with *P. expansum* at 10^4 conidia ml^{-1} and stored at 20°C and 85% RH for 7 days

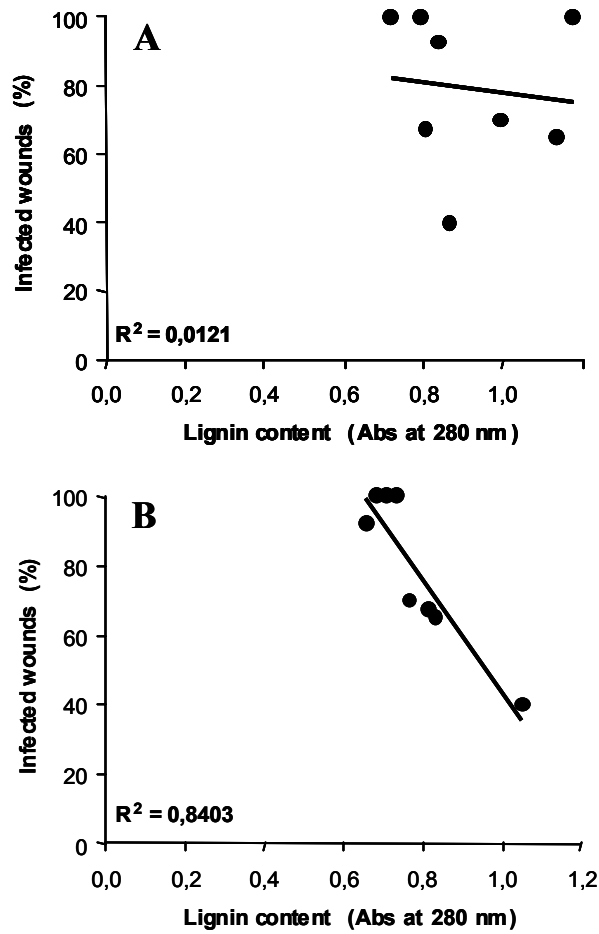


Figure 2: Relationship between disease incidence (% of infected wounds) and lignin content. (A): Correlation in control (unwounded) fruits; (B): Correlation in artificially wounded fruits 4 hours after wounding. Decay incidence was determined on a second set of fruit inoculated with *P. expansum* at 10^4 conidia ml⁻¹ and stored at 20°C and 85% RH for 7 days

Table 1: Changes in the activity of soluble and ionic peroxidase (POX) enzyme in control and wounded fruit in relation to apple cultivar and harvest date. All the activities are expressed in Units of activity mg⁻¹ protein

Apple cultivar	Soluble POX ^x	Soluble POX	Ionic POX	Ionic POX
	Control fruit	Wounded fruit	Control fruit	Wounded fruit
Golden Delicious H1	7.36a ^y	9.23a	48.29a	64.85a
Golden Delicious H2	8.43a	8.18a	48.95a	42.27a
Golden Delicious H3	6.60a	8.90a	58.08a	54.62a
Golden Delicious H4	7.36a	6.29a	42.90a	42.30a
Golden Delicious H5	5.52a	6.23a	27.66a	36.48a
Golden Supreme	20.48a	19.93a	63.09a	50.83a
Golden Smoothee	6.37a	6.81a	45.39a	32.55a
Pink Lady [®]	7.71a	7.76a	29.75a	22.37a

^xMean of 6 individual fruit. ^yFor each enzyme form, different letters in the same row indicate difference between means using LSD test ($P < 0.05$)

4. DISCUSSION

The ability of a plant to stop an infection depends on the presence of preformed barriers such as cuticle and waxes, or on the formation immediately after the infection of other kind of barriers such as lignins (Moerschbacher and Mendgen, 2000). Since most pathogens cannot degrade lignin, lignified cells represent an efficient barrier against infection. In some cases, lignin can be formed in response to infection or in other instances it can be produced in response to wounding (Friend J., 1976).

In apples and as shown in this work, wounding appeared to be an important factor in determining the fruit resistance. Before wounding the decay incidence was not correlated to the levels of H₂O₂ and lignin. In contrast, a sharp correlation was found after wounding. These results

clearly indicated that resistance mechanisms in apples are likely linked to a dynamic process and not to a constitutive response of the fruit. The response is rapid, significant after 4 hours, and might involve, as previously showed for other kinds of stress (Larrigaudière et al., 1990), preformed materials (preformed RNAs) to quickly trigger the physiological response.

The question that remains now is what is the biochemical mechanism involved in the accumulation of H₂O₂ and lignin after wounding. In a first instance, ethylene might be involved. It is now widely recognized that wounding may induce ethylene production (O'Donnell et al., 1996). Ethylene is also involved in lignification (Hennion et al., 1992) and appeared to be an important element of disease resistance (Raz and Fluhr, 1992; Geraats et al., 2002). Further works are needed to clearly determine the role that ethylene might play in this specific interaction. They will be of great interest to understand the biochemical basis of disease resistance in apple fruits.

Association of H₂O₂ with lignification through the action of H₂O₂-generating and H₂O₂-scavenging enzymes is also a general process involved in plant defence reaction (Milosevic and Slusarenko, 1996; He et al., 2002). In previous works carried out with the same material we already described the importance that lignin (Valentines et al., 2005) and H₂O₂ (Torres et al., 2003) played in apple disease resistance. H₂O₂ levels sharply increased in the resistant fruits and the change in H₂O₂ levels was related to a down-regulation of the activity of POX after fungal inoculation (Torres et al., 2003). In this work (table 1), no significant changes in POX activity were found in wounded fruits. This difference might show that POX was not a limiting factor and that H₂O₂ was the most important element that triggered fruit resistance and lignin accumulation. It might also show that wounding alone was not sufficient to induce the down-regulation of POX enzyme and that a specific pathogen action was also involved.

The results presented in this work supported those previously obtained in 'Golden Delicious' apple fruit (Torres et al., 2003; Valentines et al., 2005). They also clearly extent the relevancy of these first results and definitively highlighted that H₂O₂ and lignin accumulation may be considered as the key mechanisms that determine the resistance of apple fruit to *P. expansum*. Changes in H₂O₂ and lignin contents appeared to be relevant to explain the differences in susceptibility between harvest dates for the same cultivar. They also satisfactorily explained the cultivar-dependent differences in susceptibility. In both cases, wounding appeared to be an important factor that triggered the physiological response. Further works are needed to determine the way by which this response is established. They will be of great interest to better the knowledge of disease resistance in apple fruit.

ACKNOWLEDGEMENTS

M.C. Valentines is the recipient of a grant from Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). The authors thank INIA (RTA02-073) for its financial support.

REFERENCES

AMIRI, A., BOMPEIX, G. 2005. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathology*, 54:74-81.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W., MOCK, N.M. 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production of suspension cells. *Plant Physiology*, 102:1341-1344.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 33:299-321.

BRADLEY, D.J., KJELLBOM, P., LAMB, C.J. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70:21-30.

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

CONWAY, W.S., LEVERENTZ, B., JANISIEWICZ, W.J., BLODGETT, A.B., SAFTNER, R.A., CAMP, M.J. 2004. Integrating heat treatment, biocontrol and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 34:11-20.

DEAN, R., KUĆ, J. 1987. Rapid lignification in response to wounding and infection as a mechanism for induced systemic protection in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31:69-81.

DEVLIN, W.S., GUSTINE, D.L. 1992. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiology*, 100:1189-1195.

- GERAATS, B.P.J., BAKKER, P.A.H.M., VAN LOON, L.C. 2002. Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 15:1078-1085.
- HE, C.Y., HSIANG, T. WOLYN, D.J. 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 51:225-230.
- HENNION, S., LITTLE, C.H.A., HARTMANN, C. 1992. Activities of enzymes involved in lignification during the postharvest storage of etiolated asparagus spears. *Physiologia Plantarum*, 86:474-478.
- LARRIGAUDIÈRE, C., LATCHÉ, A., PECH, J.C., TRIANTAPHYLIDÈS, C. 1990. Short-term effects of γ -irradiation on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in early climacteric cherry tomatoes. *Plant Physiology*, 92:577-581.
- LEVERENTZ, B., CONWAY, W.S., JANISIEWICZ, W.J., SAFTNER, R.A., CAMP, M.J. 2003. Effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on the reduction of postharvest decay of 'Golden Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27:221-233.
- LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79:583-593.
- LURIE, S., FALLIK, E., HANDROS, A., SHAPIRA, R. 1997. The possible involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50:141-149.
- MILOSEVIC, N., SLUSARENKO, A.J. 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49:143-158.
- MOERSCHBACHER, B., MENDGEN, K. 2000. Structural aspects of defense. A: *Mechanisms of resistance to plant diseases*. SLUSARENKO, A., FRASER, R.S.S., VAN LOON, L.C. (eds.) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p. 231-277.
- NAFUSSI, B., BEN-YEHOSHUA, S., RODOV, V., PERETZ, J., OZER, B.K., D'HALLEWIN, G. 2001. Mode of action of hot-water dip

in reducing decay of lemon fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:107-113.

NUNES, C., USALL, J., TEIXIDÓ, N., TORRES, R., VIÑAS, I. 2002. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apples and pears with the combination of *Candida sake* and *Pantoea agglomerans*. *Journal of Food Protection*, 65:178-184.

O'DONNELL, P.J., CALVERT, C., ATZORN, R., WASTERACK, C., LEYSER, H.M.O., BOWLES, D.J. 1996. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, 274:1914-1917.

OLSON, P.D., VARNER, J.E. 1993. Hydrogen peroxide and lignification. *Plant Journal*, 4:887-892.

OROZCO-CÁRDENAS, M.L., NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J., RYAN, C.A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*, 13:179-191.

OSBOURN, A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, 8:1821-1831.

PALAZÓN, I., PALAZÓN, C., ROBERT, P., ESCUDERO, I., MUÑOZ, M., PALAZÓN, M. 1984. Estudio de los problemas patológicos de la conservación de peras y manzanas en la provincia de Zaragoza. Diputación Provincial de Zaragoza. Publicación n. 990. Institución Fernando El Católico, Zaragoza

RAZ, V., FLUHR, R. 1992. Calcium requirement for ethylene-dependent responses. *Plant Cell*, 4:1123-1130.

SPADARO, D., GARIBALDI, A., GULLINO, M.L. 2004. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biology and Technology*, 33:141-151.

TORRES, R., VALENTINES, M.C., USALL, J., VIÑAS, I., LARRIGAUDIÈRE, C. 2003. Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in 'Golden Delicious' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 27:235-242.

VALENTINES, M.C., VILAPLANA, R., TORRES, R., USALL, J., LARRIGAUDIÈRE, C. 2005. Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. *Postharvest Biology and Technology*, in press.

VANCE, C.P., KIRK, T.K., SHERWOOD, R.T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18:259-288.

DISCUSSIÓ GENERAL:

La discussió dels resultats presentats en els anteriors punts s'ha estructurat en els següents apartats:

- ⇒ El paper del H_2O_2
- ⇒ Fonts de generació de H_2O_2
- ⇒ La lignificació com a mecanisme de resistència
- ⇒ L'enfosquiment enzimàtic com a mecanisme de resistència
- ⇒ Model d'interacció poma-*Penicillium expansum*
- ⇒ Marcadors de resistència
- ⇒ Referències

1. PAPER DEL H_2O_2 EN EL PROCÉS DE RESISTÈNCIA

El principal objectiu d'aquesta tesi era aportar nous coneixements sobre els mecanismes de defensa existents en la poma contra uns dels microorganismes que més danys causa en aquesta espècie, *Penicillium expansum*.

Molts autors citen la generació de ROS com la primera reacció de les plantes durant una interacció amb un microorganisme. Per aquesta raó el nostre estudi s'ha centrat inicialment sobre els canvis en ROS i, més precisament i degut a la dificultat de l'anàlisi d'alguns radicals, en l'observació dels canvis en els nivells de H_2O_2 .

La primera vegada que es va observar que les ROS intervenien en la defensa contra fongs va ser el 1983 en patates infectades per *Phytophthora infestans* (Doke, 1983). Més tard, aquesta hipòtesi es va corroborar amb un estudi realitzat en cultiu cel·lular de tomata infectat per *Cladosporium fulvum* (Vera-Estrella et al., 1992). En alvocats immadurs, resistents a un atac fúngic, es mostrava un increment en la producció de ROS mentre que era inexistent en els fruits susceptibles (Beno-Moualem i Prusky, 2000). Un estudi més recent en cotiledons de tomata també mostrava una acumulació de H_2O_2 en la interacció amb *C. fulvum* (Borden i Higgins, 2002).

Els resultats d'aquest treball també van en la mateixa direcció, ja que les pomes resistents a una infecció fúngica tenen un major contingut en H_2O_2 , tal com s'observa en el capítol 1. El resultat té molt interès (és la primera vegada que es descriu tal relació en poma) i permet orientar i complementar la investigació en aquest sentit tal com es descriu en els capítols 2 a 4.

L'acumulació màxima de H_2O_2 en poma es dona entre 4 i 6 hores després de provocar la ferida i/o inoculació amb *P. expansum*. Aquesta acumulació depèn de l'estat de maduresa, ja que les pomes més madures, les més susceptibles, no mostren aquesta inducció en la formació de H_2O_2 . Resultats similars es van obtenir en altres espècies. En alvocat per exemple, Beno-Moualem i Prusky (2000) mostraven una acumulació en ROS tot just 2 hores després de la inoculació. En un altre estudi en poma, Castoria i col·laboradors (2003) van mostrar una acumulació contínua de ROS immediatament després de provocar la ferida i fins a les 4 hores. Les diferències existents entre aquests resultats i els obtinguts en els nostre estudi poden ser degudes a la utilització de diferents mètodes de determinació de H_2O_2 . Aquestes diferències poden ser també degudes a diferències de metodologia pel que fa a la presa de mostres, ja que Castoria i col·laboradors mesuraven la producció de H_2O_2 en el lloc de la ferida, mentre que en els nostres estudis l'anàlisi de H_2O_2 es realitzava en la zona perifèrica incloent part de teixit sa.

Diversos autors han revisat els possibles papers que el H_2O_2 podria tenir en les cèl·lules (Mehdy, 1994; Low i Merida, 1996; Baker i Orlandi, 1999). En el cas concret de la poma, l'acumulació de H_2O_2 observada podria intervenir o bé directament sobre el patògen, com substància antimicrobiana, o bé indirectament, mitjançant l'encreuament de proteïnes estructurals o d'altres tipus de substàncies de la paret cel·lular o finalment regulant certs gens de defensa (Figura 1).

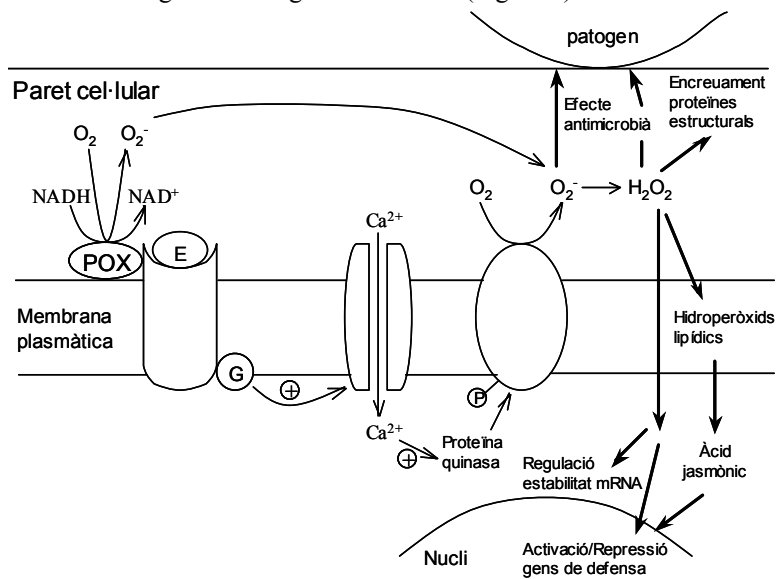


Figura 1: Model que mostra els possibles components involucrats en la generació de ROS i els seus efectes (Mehdy, 1994)

En aquesta tesi no s'ha estudiat l'efecte antifúngic que podria tenir l'acumulació de H_2O_2 ni s'ha estudiat l'expressió gènica que regula la defensa. No obstant, al principi de la tesi es van analitzar els canvis en l'activitat dels enzims quitinasa i β -1,3- glucanasa durant el procés d'infecció (resultats no presentats). No es van observar diferències significatives entre fruits sans i inoculats en aquestes activitats. Aquest resultat previ, però, no permet concloure que en poma el H_2O_2 no intervé en la regulació de les activitats quitinasa i β -1,3-glucanasa.

En aquest primer estudi no s'han diferenciat tampoc els fruits ferits dels fruits ferits i inoculats. Aquests resultats són corroborats si es considera Biggs (1997), que argumentava que les respostes de la planta a una ferida són una part dels processos normals de desenvolupament i les respostes a una infecció són essencialment similars o idèntiques a les respostes causades per una ferida. En un estudi realitzat en pomes inoculades amb *P. expansum* i *Botrytis cinerea*, el gen PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) respon, tot i que amb diferent extensió, tant a una ferida com a una infecció fúngica (Yao et al., 1999). Més recentment s'ha observat en *Arabidopsis* que alguns gens que estan involucrats en la traducció de senyal i que s'expressen per l'acció d'una ferida coincideixen amb els que s'expressen durant una infecció patògena (Cheong et al., 2002). Aquests fets porten a pensar que tant la ferida com la inoculació amb *P. expansum* fan que el fruit respongui de la mateixa manera. Una altra hipòtesi a considerar és que la ferida predomina i emmascara l'efecte que pot tenir el patogen. És aquesta última hipòtesi la que es retindrà, tal com s'ha demostrat en el capítol 4.

2. FONTS DE GENERACIÓ DE H_2O_2

Diversos autors han proposat diferents hipòtesis per explicar la generació de les ROS (Sutherland, 1991; Mehdy, 1994; De Gara et al., 2003), i tots ells coincideixen en la participació de NAD(P)H oxidases i de peroxidases en la formació de O_2^- i H_2O_2 . D'altra banda i com ja s'havia esmentat, el H_2O_2 i els altres radicals són tòxics per a les cèl·lules, i es necessiten sistemes de destoxificació cel·lular, entre els quals actuen la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) i l'ascorbat peroxidasa (APX) (De Gara et al., 2003).

En un estudi en cultius cel·lulars de tabac i patata amb el bacteri *Pseudomonas syringae*, es demostrava com l'estrès oxidatiu podia estar iniciat abans de la detecció de H_2O_2 (Baker et al., 2002). Aquest resultat és la conseqüència de l'acció dels enzims antioxidants com la peroxidasa que, amb la seva activitat, disminueixen les espècies actives d'oxigen presents en les cèl·lules.

Com en els cultius cel·lulars de tabac i arròs (Able et al., 2000; Kuta i Gaivaronskaya, 2004), en aquest treball amb cultiu cel·lular de poma (capítol 2), s'ha demostrat la participació de l'enzim NADPH oxidasa en la resposta de defensa. Altres enzims, CAT i SOD, sembla que no intervinguin majoritàriament en el procés de generació de les ROS. Contràriament, l'enzim POX, que s'inactiva durant la resposta oxidativa tan en el model *in vivo* com en l'*in vitro*, sembla ser un factor més important de regulació en poma.

Com ja s'ha esmentat en el capítol 1, l'acumulació del peròxid es dona en fruits resistents, que són els que mostren major activitat SOD. En canvi, els fruits susceptibles, on no es dona l'acumulació de peròxid, les activitats CAT i POX, eliminadores de H₂O₂ per a formar H₂O, es veuen incrementades. Això sembla indicar que el sistema de resistència involucra una "sobre-regulació" de l'enzim SOD simultàniament amb una "regulació a la baixa" dels enzims CAT i POX. Resultats diferents es van observar en fulles de blat inoculades amb *Puccinia recondita*, en les quals la resistència s'associava amb un augment d'activitat CAT (Ivanov et al., 2005). En aquest mateix estudi, l'activitat SOD era superior en les plantes resistents, i aquest canvi conjuntament amb la baixa activitat relativa de CAT donava com a resultat l'acumulació de H₂O₂ en plantes resistents. En préssecs tractats amb un inductor de la SAR (àcid benzo-tiadiazol-7-carbotiòic *S*-metil éster, BTH), mentre es donava un increment en el contingut de H₂O₂, l'enzim SOD incrementava la seva activitat en comparació amb els fruits no tractats (Liu et al., 2005). No obstant, l'activitat POX també incrementava per a poder eliminar l'excés de H₂O₂ i evitar danys a les membranes. En tomates es demostrava com un increment en la resistència dels fruits, en aquest cas provocat per un tractament amb calor, es correlacionava amb un increment de l'activitat POX, tant en forma soluble com en forma iònica (Lurie et al., 1997).

Aquests estudis, doncs, tenen en comú un increment en l'activitat SOD en les plantes o fruits resistents. L'activitat enzimàtica de CAT també sembla influir en el sentit de l'acumulació de les ROS, mentre que el paper que juguen les peroxidases està en controvèrsia. Degut a aquestes contradiccions sembla difícil d'establir un quadre general d'acció d'aquests enzims. No obstant, en el nostre model la POX sembla tenir un paper important. Aquest resultat es va confirmar en l'article 1, mitjançant l'anàlisi directe de l'activitat enzimàtica en els fruits resistents que es va dur a terme en aquests articles, i en l'article 3, pel paper predominant que juga aquest enzim en el procés de lignificació.

3. LA LIGNIFICACIÓ COM A MECANISME DE RESISTÈNCIA

Un cop es va definir el paper del H_2O_2 en la resistència dels fruits el pas següent era determinar si aquest H_2O_2 participava de manera indirecta en la resistència. Per aquest motiu es van determinar els canvis en lignines, que tal com es descriu en la bibliografia, actuen com a barreres estructurals de la defensa contra el patogen. En aquest estudi s'han analitzat solament els canvis en lignines.

Durant el procés de cicatrització de la ferida hi poden intervenir altres substàncies, com per exemple, la callosa o bé la suberina. La intervenció d'aquests compostos en la resistència s'ha demostrat en varies espècies. Així, per exemple, com a resposta a la ferida, el teixit de patata produïa ROS, involucrades en la suberització d'aquest teixit (Razem i Bernards, 2003). En un altre estudi en pomes Golden Delicious i Granny Smith, uns dies després de la realització de la ferida, els fruits cicatritzaven i es mostraven més resistents a l'atac per *P. expansum* i *B. cinerea* (Lakshiminarayana et al., 1987). Aquesta cicatrització suposava la deposició de components com lignines, callosa, tanins i substàncies fenòliques al voltant del punt on s'havia realitzat la ferida. També en un estudi en peres, en el qual s'analitzava el paper de la cicatrització, no es donava formació de lignines en la zona de la ferida, però s'acumulaven altres compostos com callosa, suberina, tanins, midó, gomes i substàncies pèctiques (Spotts et al., 1998). Tots aquests estudis mostren la importància que poden tenir els processos de cicatrització durant el procés de resistència. Com a resultat dels estudis realitzats (capítols 3 i 4), aquests processos de cicatrització semblen ser també importants per a definir la capacitat de resistència de la poma a *P. expansum*.

Degut a la relació existent entre la formació de lignines i l'activitat de l'enzim POX es va analitzar també aquesta activitat en diferents experiments. Els resultats indicaven que no hi havia una relació directa entre la quantitat d'enzim existent i la inducció de la formació de lignines. Especialment si es consideren els resultats del capítol 4, la POX no sembla ser un element limitant de l'acumulació de lignines. En aquest sentit, la POX sembla ser més determinant per a la regulació de H_2O_2 que per a l'acumulació de lignines.

El procés de lignificació també està associat a l'enzim fenilalanina amoni liasa (PAL), com és en el cas de flavedo de taronges infectat per *P. digitatum*, on la cicatrització de petites ferides s'associa amb un increment de l'activitat d'aquest enzim i la deposició de lignines (Ismail i Brown, 1979). En la polpa de pomes, l'activitat PAL no era prou significativament com per a poder detectar diferències entre fruit ferits i no ferits (resultats no mostrats). Això no vol dir que aquest enzim no

intervingui en el procés de resistència, però segurament ho fa de forma més reduïda i poc significat en comparació als processos oxidatius.

4. L'ENFOSQUIMENT ENZIMÀTIC COM A MECANISME DE RESISTÈNCIA

L'enfosquiment enzimàtic és una característica dels fruits que va lligada al seu estat de maduresa. Degut a que els diferents estats de maduresa de la poma mostraven una resistència diferent a l'atac patogen es va creure que l'enfosquiment podria determinar d'alguna manera la susceptibilitat de la fruita. No obstant, no s'ha mostrat cap tipus de correlació entre l'enfosquiment enzimàtic o bé l'activitat de l'enzim polifenol oxidasa (PPO), i la resistència dels fruits. Altres estudis, com el realitzat en plantes de tomata modificades genèticament, mostren com una sobreexpressió de l'enzim PPO desenvolupava major resistència contra *Pseudomonas syringae* (Li i Steffens, 2002). Aquest estudi demostra com un increment de l'oxidació dels compostos fenòlics per part de la PPO comportava un increment en la resistència de les plantes. Altres autors suggereixen un paper antifúngic per a aquests compostos fenòlics (Lattanzio et al., 1994).

5. MODEL D'INTERACCIÓ POMA-*Penicillium expansum*

La creació de models en la investigació serveix per a facilitar futurs experiments. És per això que durant la realització d'aquesta tesi es va voler dur a terme un estudi en cultiu cel·lular de poma inoculat amb *P. expansum*. De fet, no existia literatura que fes referència a l'estrès oxidatiu en aquest tipus d'interaccions, és a dir, en una interacció compatible (que causa malaltia) amb un fong necròtrof, com és *P. expansum*. Tampoc hi ha gaires estudis que utilitzin el cultiu cel·lular de poma com a model, ja que sempre s'utilitzen cultius cel·lulars de tabac, arròs i soia, entre altres, en interaccions incompatibles, és a dir, resistents a la infecció.

Els resultats obtinguts indiquen que aquest model segueix el patró d'altres models d'interacció compatible, és a dir, una acumulació de ROS (fase I) que comença pocs segons després de la inoculació (Baker i Orlandí, 1995). És també interessant apuntar que la concentració de ROS en el primer pic de producció depèn de la concentració de l'inòcul (dades no mostrades), tal com es demostrava en cultiu cel·lular de tabac inoculat amb *P. syringae* i *P. fluorescens* (Baker et al., 1997). Com era d'esperar i degut al fet de tractar-se d'una interacció compatible, unes 24 h després de la inoculació amb *P. expansum*, el cultiu cel·lular de

poma mostrava un fort olor a florit característic de *P. expansum*, al mateix temps que la textura del cultiu cel·lular canviava convertint-se en una massa filamentosa.

Els resultats més sorprenents obtinguts en els experiments realitzats en cultiu cel·lular de poma són aquells en que s'utilitzava la suspensió filtrada de *P. expansum* en aigua. Els resultats que s'observaren en l'acumulació de ROS eren els aplicables a un model incompatible, és a dir, un model en el que es distingien dues fases en la producció de ROS després de la inoculació amb el filtrat. Altres autors han utilitzat el que s'anomenen inductors (o elicitors) per a induir aquest tipus d'estrès oxidatiu (Lindner et al., 1988; Schwacke i Hager, 1992). Aquests inductors solen ser de natura abiòtica, com alguns detergents i metalls pesats (Yoshikawa, 1978), fosfats, silicats, o poden provenir de llevats, fongs o bé insectes, com ara lípids, glicoproteïnes i oligo- i polisacàrids (Darvil i Albersheim, 1984). Així doncs, el contacte de *P. expansum* amb l'aigua fa que s'alliberi algun component de la paret cel·lular del fong, que queda dissolt i pot passar a través d'un filtre de 0.2 µm. Aquest component pot induir la producció de ROS amb un model d'interacció incompatible després d'entrar en contacte amb el cultiu cel·lular de poma. Aquest filtrat, però, no està en les condicions òptimes per a generar un model d'interacció incompatible clàssic, degut a que la segona fase de producció de ROS s'indueix després d'un període de temps massa llarg si es compara amb les interaccions ja documentades (Apostol et al., 1989; Able et al., 2003). Algunes de les causes que sembla determinar aquesta falta d'optimització del filtrat són la concentració a la que s'utilitza el filtrat o un procediment de preparació no optimitzat si es compara amb la metodologia de preparació d'altres inductors.

6. MARCADORS DE RESISTÈNCIA

Un dels interessos més importants de la investigació és trobar marcadors per a facilitar la classificació dels fruits, i en aquest cas en concret, un marcador per a esbrinar la susceptibilitat de la poma a *P. expansum*. Degut a que el H₂O₂ és un inductor de diferents processos lligats amb el procés de resistència, es podria proposar aquest producte com a marcador. No obstant, els resultats obtinguts no són els adients, ja que l'anàlisi del contingut de H₂O₂ en pomes recent collides no està correlacionat amb la capacitat de resistència dels fruits.

Una característica que hauria de tenir en compte aquest marcador és la seva facilitat d'anàlisi. La mesura de l'enfosquiment enzimàtic compleix aquest requisit però, com s'ha vist, l'enfosquiment enzimàtic no intervé en els diferents processos de resistència que s'han estudiat.

La mesura del contingut en lignines, tot i ser un mètode més complex per a la seva extracció, tampoc podria esdevenir un marcador de resistència, degut a que la diferenciació entre fruits susceptibles i resistents només es dona un cop els fruits ja han estat ferits i no en el moment de la collita.

No s'ha obtingut de moment un marcador de la resistència, per tant, són necessaris altres treballs en aquest sentit. Aquests nous estudis es podrien orientar en la capacitat de cicatrització de la poma, determinant un marcador relacionat amb aquest procés, com per exemple determinar la composició en certs compostos fenòlics i activitats enzimàtiques relacionades amb el procés de cicatrització diferents de les ja analitzades.

7. REFERÈNCIES

ABLE, A.J., GUEST, D.I., SUTHERLAND, M.W. 2000. Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Physiology*, 124:899-910.

ABLE, A.J., SUTHERLAND, M.W., GUEST, D.I. 2003. Production of reactive oxygen species during non-specific elicitation, non-host resistance and field resistance expression in cultured tobacco cells. *Functional Plant Biology*, 30:91-99.

APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F., LOW, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiology*, 90:109-116.

BAKER, C.J., O'NEILL, N.R., DEAHL, K., LYDON, J. 2002. Continuous production of extracellular antioxidants in suspension cells attenuates the oxidative burst detected in plant microbe interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40:641-644.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. 1995. Active oxygen species in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 299-321.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. 1999. Active oxygen and pathogenesis in plants. A: *Plant-microbe interactions. Vol. 4*. STACEY, G., KEEN, N.T. (eds.) St. Paul, Minnesota: APS Press. The American Phytopathological Society. p. 81-119.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W., ANDERSON, A.J. 1997. Oxygen metabolism in plant cell culture/bacteria interactions: role of bacterial concentration and H₂O₂-scavenging in survival under biological and artificial oxidative stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51:401-415.

BENO-MOUALEM, D., PRUSKY, D. 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology*, 90:553-559.

BIGGS, A.R. 1997. Responses of angiosperm bark tissues to fungi causing cankers and canker rots. Consultat: març 2005. Disponible a internet: www.caf.wvu.edu/bark/cankers.htm

BORDEN, S., HIGGINS, V.J. 2002. Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61:227-236.

CASTORIA, R., CAPUTO, L., DE CURTIS, F., AND DE CICCO, V. 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: A possible new mechanism of action. *Phytopathology*, 93:564-572.

CHEONG, Y.H., CHANG, H.-S., GUPTA, R., WANG, X., ZHU, T., LUAN, S. 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129:661-677.

DARVIL, A. G., ALBERSHEIM, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors - A defense against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35:243-275.

DE GARA, L., DE PINTO, M.C., TOMMASI, F. 2003. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41:863-870.

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. *Physiological Plant Pathology*, 23:345-357.

ISMAIL, M.A., BROWN, G.E. 1979. Postharvest wound healing in citrus fruit: induction of Phenylalanine ammonia-lyase in injured 'Valencia' orange flavedo. *Journal of the American Society for the Horticultural Science*, 104:126-129.

IVANOV, S., MITEVA, L., ALEXIEVA, V., KARJIN, H., KARANOV, E. 2005. Alterations in some oxidative parameters in susceptible and resistant wheat plants infected with *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*. *Journal of Plant Physiology*, 162:275-279.

KUTA, D.D., GAIVARONSKAYA, L.M. 2004. Ca²⁺ and reactive oxygen species are involved in the defense responses of rice callus culture to rice blast disease. *African Journal of Biotechnology*, 3:76-81.

LAKSHIMINARAYANA, S., SOMMER, N.F., POLITO, V. FORTLAGE, R.J. 1987. Development of resistance to infection by *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in wounds of mature apple fruits. *Phytopathology*, 77:1674-1678.

- LATTANZIO, V., CARDINALI, A., PALMIERI, S. 1994. The role of phenolics in the postharvest physiology of fruits and vegetables: browning reactions and fungal diseases. *Italian Journal of Food Science*, 1:3-22.
- LI, L., STEFFENS, J.C. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215:239-247.
- LINDNER, W.A., HOFMANN, C., GRISEBACH, H. 1988. Rapid elicitor-induced chemiluminescence in soybean suspension cultured cells. *Phytochemistry*, 27:2501-2503.
- LIU, H., JIANG, W., BI, Y., LUO, Y. 2005. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, 35:263-269.
- LOW, P.S., MERIDA, J.R. 1996. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiologia Plantarum*, 96:533-542.
- LURIE, S., FALLIK, E., HANDROS, A., SHAPIRA, R. 1997. The possible involvement of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat treated tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50:141-149.
- MEHDY, M.C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*, 105:467-472.
- RAZEM, F.A., BERNARDS, M.A. 2003. Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH-dependent oxidase. *Journal of Experimental Botany*, 54:935-941.
- SCHWACKE, R., HAGER, A. 1992. Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca^{2+} and protein-kinase activity. *Planta*, 187:136-141.
- SPOTTS, R.A., SANDERSON, P.G., LENNOS, C.L., SUGAR, D., CERVANTES, L.A. 1998. Wounding, wound healing and staining of mature pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 13:27-36.
- SUTHERLAND, M.W. 1991. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39:79-93.

VERA-ESTRELLA, R., BLUMWALD, E., HIGGINS, V.J. 1992. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. *Plant Physiology*, 99:206-210.

YAO, C., CONWAY, W.S., REN, R., SMITH, D., ROSS, G.S., SAMS, C.E. 1999. Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Molecular Biology*, 39:1231-1241.

YOSHIKAWA, M. 1978. Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *Nature*, 275:546-547.

CONCLUSIONS

1. La resistència de la poma vindria determinada per una elevada producció de peròxid d'hidrogen al començament del procés d'infecció causat pel fong *P. expansum*.
2. La generació de H₂O₂ està parcialment determinada per les diferències en la capacitat enzimàtica de síntesi/degradació del H₂O₂ (activitats SOD, CAT i POX) en fruits sencers. En el model *in vitro*, aquests mateixos enzims sembla que no intervinguin directament en l'estrès oxidatiu i que la generació de H₂O₂ es més el resultat de l'activació de l'enzim NADPH oxidasa. La intervenció d'aquest tipus d'enzim en el fruit sencer queda per confirmar.
3. Els canvis metabòlics observats i que determinen la resistència del fruit (acumulació de H₂O₂ i de lignines) són deguts principalment a l'efecte ferida. El patogen no sembla tenir un paper important en la posada en marxa dels processos de resistència. Tal com s'ha mostrat amb les anàlisis en microscopia de fluorescència, el H₂O₂ s'acumula dins de les cèl·lules de poma i la resposta oxidativa sembla ser un fet degut a l'hoste.
4. L'enfosquiment enzimàtic i l'acumulació de melanines no semblen ser factors importants que determinen la resistència de la poma contra *P. expansum*.
5. Els canvis observats en els nivells de H₂O₂ se correlacionen amb una disminució de l'activitat POX en els dos models i intervien d'una forma preponderant activant els processos de lignificació en el fruit sencer. En aquest treball s'ha observat una correlació molt significativa entre la quantitat de lignines i el grau de resistència dels fruits.
6. L'estat de maduresa de les pomes, la data de collita, és un factor molt important que determina la resistència de la fruita contra un atac de *P. expansum* via una modulació de la seva capacitat d'acumular H₂O₂. La fruita més immadura és la que

demostra una major resistència al fong. Es van observar molt poques diferències entre varietats.

- 7. El sistema de producció de H₂O₂, tal com s'ha comprovat en el sistema *in vitro*, és el resultat d'un estrès oxidatiu similar al que s'observa en la fase I d'un model d'interacció compatible.**

- 8. La producció de H₂O₂ apareix també com el resultat d'un procés d'inducció provocat per una substància hidrosoluble del patogen, un inductor la naturalesa del qual queda encara per determinar. Aquest últim procés d'inducció s'ha comprovat *in vitro* però s'haurà de confirmar en fruits sencers.**

- 9. Cap dels anàlisis en què s'han centrat els experiments durant la realització d'aquesta tesi (el contingut en H₂O₂, el contingut en lignines i la capacitat d'enfosquiment enzimàtic) serviria com a marcador de resistència/susceptibilitat dels fruits. La diferenciació entre susceptibilitats dels fruits es produeix únicament després de la realització d'una ferida per a permetre l'entrada del fong.**

Les anteriors conclusions es poden resumir en l'esquema que es mostra (Figura 1).

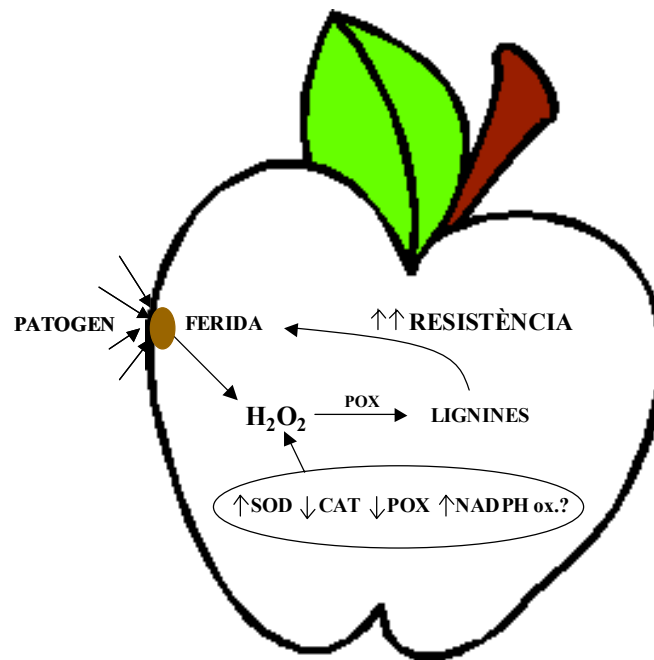


Figura 1: Esquema-resum dels agents involucrats en la inducció de resistència en la poma provocat per una ferida o bé un atac patogen

CONCLUSIONS

1. High hydrogen peroxide levels were found at the beginning of the infection process. Changes in H₂O₂ levels were directly correlated to decay incidence in whole fruit.
2. In whole fruit, the generation of H₂O₂ was partially determined by the changes in the enzymatic capacity of synthesis/degradation of H₂O₂ (SOD, CAT and POX activities). In the *in vitro* model, these enzymes did not seem to be directly involved in the oxidative burst, and the generation of H₂O₂ was mainly the result of the action of the NADPH oxidase enzyme. The role of this enzyme in apple fruit remains to be confirmed.
3. In whole fruit, the metabolic changes that determine the fruit resistance (H₂O₂ and lignins accumulation) were mainly due to wounding and the pathogen did not seem to have an important role. As it has been shown with the fluorescence microscopy analysis, H₂O₂ accumulated in the apple cells and the oxidative burst mainly corresponded to a host response.
4. Enzymatic browning and melanin accumulation were not related with disease resistance.
5. The observed changes in H₂O₂ levels are correlated with a decrease in POX activity in both models and are involved in resistance in a prevailing way activating lignification processes in apple fruit. In this work a significant correlation was observed between lignin content and the degree of fruit resistance.
6. Apple fruit maturity, harvest date, is a very important factor that determines fruit resistance to a *P. expansum* attack. Immature fruit showed a higher resistance to this fungus. Maturity-related changes in resistance were related to differential capacity to produce H₂O₂ during infection. Only few differences were found between cultivars.

7. Changes in H_2O_2 in apple cell culture were the result of an oxidative burst similar to that observed in phase I of a compatible interaction model.
8. H_2O_2 production in apple cells was also induced by a hydrosoluble fungal elicitor that triggered an incompatible response. The nature of such an elicitor and its action in whole fruit remain to be clarified.
9. None of the parameters studied in this thesis (H_2O_2 content, lignin content and enzymatic browning capacity) would be able to be used as a marker of fruit susceptibility at harvest.

The conclusions described above can be summarized in the following scheme (Figure 1):

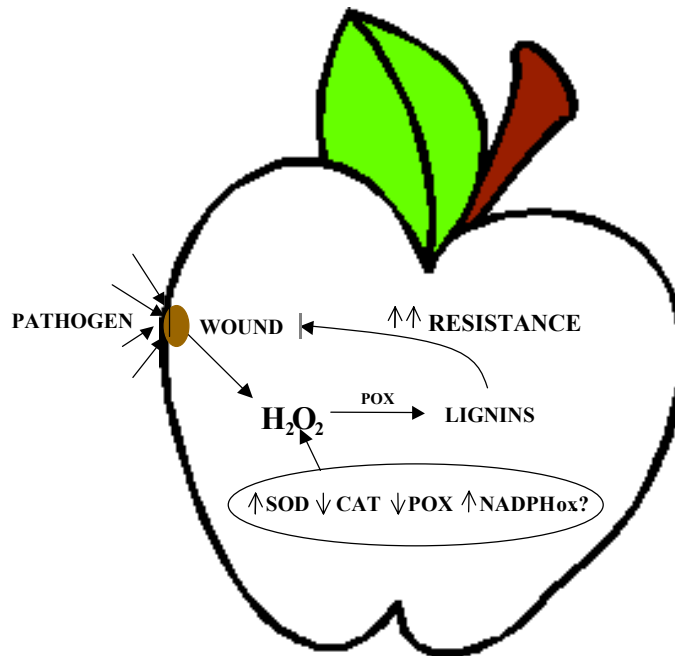


Figure 1: Scheme-summary of the agents involved in the resistance induction in apple fruit caused by wounding or a pathogen attack

PERSPECTIVES DE FUTUR

El principal component que determina la resistència de la poma, el H_2O_2 , pot induir altres processos de resistència. Seria molt interessant per a completar aquest estudi determinar el paper inductor que podria tenir aquest compost sobre altres processos involucrats en la resistència dels fruits, per exemple, com inductor de la SAR o de la formació de fitoalexines. Seria també interessant determinar el seu paper en l'acumulació d'altres compostos involucrats en el procés de cicatrizació de les ferides.

En aquest treball no s'ha pogut diferenciar les respostes induïdes pel patogen de les induïdes per la ferida. Aquesta qüestió encara queda oberta i seria interessant treballar en aquest tema i esbrinar si realment les dues classes d'estrès provoquen el mateix tipus de resposta.

Es podrien caracteritzar també els canvis que es produeixen durant el procés d'infecció, com per exemple, a nivell d'integritat de membranes i de l'acció específica de la NADPH oxidasa en fruits sencers.

A la vista dels resultats obtinguts en el cultiu cel·lular de poma amb el filtrat de la suspensió de *Penicillium expansum*, es podria en treballs futurs determinar la naturalesa de l'inductor i optimitzar la seva formulació per a possibles aplicacions en el fruit sencer.

Finalment, s'hauria de continuar treballant en la recerca d'un marcador susceptible de preveure el grau de susceptibilitat de les pomes, i fins i tot d'altres fruits. Aquesta cerca es podria iniciar per la determinació dels compostos fenòlics involucrats en la resistència, les seves concentracions i la seva relació amb la incidència de podridures causades per *P. expansum*.

