

**RESPUESTAS MITOCONDRIALES A LA PUDRICIÓN DE COGOLLO DE  
PALMAS DE ACEITE**

**LIZETH NATALIA RIOS PINZÓN**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

**RESPUESTAS MITOCONDRIALES A LA PUDRICIÓN DE COGOLLO DE  
PALMAS DE ACEITE**

**LIZETH NATALIA RIOS PINZÓN**

**Trabajo de grado para optar el título de  
Químico**

**Director**

**STELIA CAROLINA MÉNDEZ SANCHEZ**

**Dra. Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION .....	11
3. Resultados.....	14
3.1. Consumo de oxígeno de mitocondrias de cogollo de palma de aceite .....	14
3.2. Transporte de calcio mitocondrial.....	19
3.3. Enzimas Antioxidantes .....	21
3.4. Lipoperoxidación. ....	24
4. Discusión.....	24
5. Procedimiento experimental. ....	29
5.1. Material vegetal.....	29
5.2. Aislamiento de mitocondrias de cogollo de palma de aceite.....	30
5.3. Obtención del extracto bruto de proteínas .....	30
5.4. Determinación del consumo de oxígeno .....	31
5.5. Determinación de la captación y liberación de calcio por las mitocondrias .....	31
5.6. Determinación Actividad de Enzimas Antioxidantes.....	31
5.7. Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	33
5.8. Análisis estadístico.....	33
6. Agradecimientos .....	33
7. Referencias.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	39

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> . Actividad enzimática antioxidativa correspondiente a las enzimas mitocondriales y las existentes en el extracto bruto	21
<b>Figura 1.</b> Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma energizada con succinato	15
<b>Figura 2.</b> Consumo de oxígeno en mitocondrias en presencia de cianuro y SHAM	17
<b>Figura 3.</b> Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma de vivero	19
<b>Figura 4.</b> Transporte de calcio en las mitocondrias de palmas de aceite <i>Elaeis guineensis</i> Jacq en estado sana y enferma con pudrición de cogollo	20

## RESUMEN

**TÍTULO:** RESPUESTAS MITOCONDRIALES A LA PUDRICIÓN DE COGOLLO DE PALMAS DE ACEITE

**AUTOR:** Lizeth Natalia Rios Pinzón<sup>a,b</sup>

**PALABRAS CLAVE:** Palma de aceite, pudrición de cogollo, bioenergética mitocondrial, actividad enzimática antioxidante, lipoperoxidación.

La enfermedad conocida como “pudrición de cogollo” (PC) es una enfermedad que afecta el cultivo de palma de aceite a punto de convertirse en una emergencia fitosanitaria en el año 2010. Este cultivo produce el segundo aceite más consumido a nivel mundial. La PC es un problema que viene presentándose hace más de 30 años y que aún no tiene una solución clara. En esta investigación, se evaluaron algunas alteraciones mitocondriales sufridas por palmas en estado intermedio y avanzado de enfermedad. Las mitocondrias de cogollo de palma de aceite están desacopladas y el grado de desacoplamiento aumenta con la severidad de la enfermedad. Se observó respiración cianuro resistente, indicando la presencia de oxidasas alternativas (AOX). Se observó respiración SHAM resistente, indicando la posible presencia de AOX resistentes al inhibidor. El transporte de calcio se encuentra alterado en mitocondrias de palmas enfermas, observando que el flujo de calcio es menor y el eflujo es mayor. En la actividad de enzimas antioxidantes se demostró que la Catalasa y la superóxido dismutasa mitocondriales disminuyen su actividad en el grado avanzado de enfermedad, encuentra la Glutación peroxidasa (Gpx), la glutación reductasa y la peroxidación lipídica se estimulan. Los resultados aquí presentados sugieren que la palma de aceite responde a la enfermedad estimulando la respiración mitocondrial por proteínas desacopladoras y aumentando el estrés oxidativo.

<sup>a</sup> Trabajo de grado

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Química. Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez. Dra. Química.

## Abstract

**Title:** MITOCHONDRIAL ALTERATIONS OF PALM OIL WITH BUD ROT

**Author:** Lizeth Natalia Rios Pinzón<sup>a,b</sup>

**Keywords:** Oil palm, bud rot, mitochondrial bioenergetics, antioxidant activity, lipoperoxidation.

**Description:** The disease known as "bud rot" (BR). It is a disease that affects the oil palm cultivation to the point of becoming a phytosanitary emergency in 2010. This culture produces the second most consumed oil in the world. The BR is a problem that is presenting for over 30 years and does not have a clear solution. In this research were evaluated mitochondrial alterations in diseased palms with BR intermediary and advanced. Bud's mitochondria were uncoupled, and the degree of uncoupling increases with the severity of disease. Cyanide resistant respiration was observed, indicating the presence of alternative oxidase (AOX). Additionally SHAM resistant respiration was observed, indicating the possible presence of AOX resistant to SHAM. Calcium transport is altered in mitochondria of diseased palms. Calcium influx is smaller and the efflux is larger than the healthy palm mitochondria. About the activity of antioxidant enzymes was demonstrated that mitochondrial catalase and superoxide dismutase decrease their activity in advanced disease grade, while glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase and lipid peroxidation was stimulated.

These results suggest that oil palm responds to disease by stimulating mitochondrial respiration for uncoupling proteins and increasing oxidative stress.

<sup>a</sup> Bachelor Thesis

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Química. Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez. Dra. Química.

**RESPUESTAS MITOCONDRIALES A LA PUDRICIÓN DE COGOLLO DE  
PALMAS DE ACEITE**

Rosa Ludy Rodríguez<sup>1</sup>

Natalia Ríos<sup>1</sup>

Stelia Carolina Méndez-Sánchez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM). Universidad Industrial de Santander.

**\* Autor de correspondencia**

**Stelia Carolina Méndez Sánchez**

**Universidad Industrial de Santander, Carrera 27 Calle 9, Bucaramanga –  
Santander - Colombia**

**6344000 – 2791**

**scmendez@uis.edu.co**

## Resumen

La enfermedad conocida como “pudrición de cogollo” (PC) es una enfermedad que afecta el cultivo de palma de aceite a punto de convertirse en una emergencia fitosanitaria en el año 2010. Este cultivo produce el segundo aceite más consumido a nivel mundial. La PC es un problema que viene presentándose hace más de 30 años y que aún no tiene una solución clara. En esta investigación, se evaluaron algunas alteraciones mitocondriales sufridas por palmas en estado intermedio y avanzado de enfermedad. Las mitocondrias de cogollo de palma de aceite están desacopladas y el grado de desacoplamiento aumenta con la severidad de la enfermedad. Se observó respiración cianuro resistente, indicando la presencia de oxidasas alternativas (AOX). Se observó respiración SHAM resistente, indicando la posible presencia de AOX resistentes al inhibidor. El transporte de calcio se encuentra alterado en mitocondrias de palmas enfermas, observando que el influjo de calcio es menor y el eflujo es mayor. En la actividad de enzimas antioxidantes se demostró que la Catalasa y la superóxido dismutasa mitocondriales disminuyen su actividad en el grado avanzado de enfermedad, encuentra la Glutación peroxidasa (Gpx), la glutación reductasa y la peroxidación lipídica se estimuladas. Los resultados aquí presentados sugieren que la palma de aceite responde a la enfermedad estimulando la respiración mitocondrial por proteínas desacopladoras y aumentando el estrés oxidativo.

Palabras Claves: Palma de aceite, pudrición de cogollo, bioenergética mitocondrial, actividad enzimática antioxidante, lipoperoxidación.

## INTRODUCCION

El cultivo de palma de aceite es uno de los principales productos agrícolas en Colombia con aproximadamente 427.000 hectáreas (~1.055.000 acres) sembradas en distintas regiones del país (fedepalma, 2012). Este cultivo presente en regiones tropicales de América Latina afronta un problema fitosanitario conocido como pudrición de los cogollo (PC)(Franqueville, 2001).

Esta enfermedad es la responsable en la disminución de aproximadamente un 30% de la producción de fruto fresco. Afecta los tejidos inmaduros de las hojas en desarrollo, deteriora la emisión y maduración de nuevas flechas afectando la zona meristemática, en donde se inicia el proceso de formación de la planta y el desarrollo de tejidos nuevos (Héctor *et al.*, 2011).

Según estudios realizados por Cenipalma (centro de investigación en palma de aceite) el patógeno responsable de las lesiones iniciales en la palma es un pseudohongo conocido con el nombre de *Phytophthora palmivora* (Sarria *et al.*, 2008). No en tanto, en los tejidos enfermos se han reportado la presencia de otros microorganismos como *Ceratostyxis paradoxa*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Curvularia lunata*, *Fusarium chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. lateritium*, *F. moniliformis*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *Pestalotiopsis disseminata*, *P. olivacea*, *Pythium catenulatum*, *P. cucurbitacearum*, *Rhizoctonia solani* y *Thielaviopsis paradoxa* (Martinez *et al.*, 2010).

Otra hipótesis que intenta explicar la inducción de la PC, sugiere que la deficiencia

de Calcio es el principal causante de la enfermedad. Esta hipótesis es postulada debido a que se han encontrado casos de palmas que crecen saludablemente contiguas a sitios denominados "focos de infección" debatiendo la hipótesis biótica como la causante de la enfermedad. La explicación dada para las plantas sanas está relacionada a las condiciones meteorológicas, edáficas, y agronómicas que influyen para que exista una menor deficiencia de Calcio (Laing, 2011).

Para evaluar el grado de severidad de la enfermedad se usa una escala de 0 a 5 en donde el grado 0 corresponde a las palmas sanas y el grado 5 a las de mayor severidad (Torres *et al.*, 2008).

De la bioquímica de la enfermedad, poco se conoce. En el único trabajo reportado se evaluó la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa, catalasa, peroxidasa, glutatióna reductasa, superóxido dismutasa y fenilalanina amonio-liasa, en hojas de palmas en grado 1, 3 y 5 de enfermedad, encontrando que en todas estas enzimas aumentan su actividad a la vez que aumenta el grado de la enfermedad. Se estudió además las variables en el intercambio de gas de las palmas, concluyendo que hay una disminución significativa en la capacidad fotosintética y eficiencia del uso del agua en estados más avanzados de pudrición de cogollo. Además se han realizado mediciones del contenido de clorofila y carotenoides en grupos de palmas enfermas. Se determinó que el contenido total de clorofila disminuye a medida que la gravedad de la enfermedad aumenta contrario a lo que ocurre con el contenido de carotenoides los cuales aumentan con el progreso de la enfermedad (Moreno-Chacón *et al.*, 2013).

Como forma de control de la PC se ha propuesto la aplicación de poliaminas (Rocha *et al.*, 2005), aspersiones de fungicidas (Héctor *et al.*, 2011), la eliminación del tejido afectado y, en los casos más avanzados, la erradicación de la palma enferma (Torres *et al.*, 2008). Ninguno de los métodos de control ha sido 100% efectivo lo que implica grandes pérdidas económicas para los palmicultores.

Es conocido que en enfermedades con procesos de necrosis, la mitocondria juega un papel muy importante, desacoplando la producción de ATP del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria (Vianello *et al.*, 1994), alterando el transporte de calcio (Manzoor *et al.*, 2012), aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (Shugaev *et al.*, 2011) y controlando los procesos de inducción de necrosis. Estos procesos generan respuestas en cadena como el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes, la activación de mecanismos de resistencia como la resistencia sistémica adquirida y la respuesta de hipersensibilidad, por lo menos para otras plantas (Jones, 2000).

Para contribuir al conocimiento bioquímico de la PC, nosotros analizamos la bioenergética de mitocondrias aisladas del cogollo de palmas en grado 0, 3 y 5 de enfermedad, el transporte de calcio mitocondrial, la actividad de enzimas antioxidantes y el grado de metilación de las pectinas del cogollo de la palma de aceite *Elaeis guineensis*.

### **3. Resultados.**

#### **3.1. Consumo de oxígeno de mitocondrias de cogollo de palma de aceite**

Se realizaron controles respiratorios (relación de velocidad de consumo de oxígeno en presencia de ADP o estado 3 / velocidad de consumo de oxígeno una vez agotado el ADP o estado 4) de mitocondrias aisladas de los cogollos de cada una de las palmas colectadas. En los tres estados analizados se obtuvieron mitocondrias no acopladas, con controles respiratorios bajos, de aproximadamente 1.3 (CR: sana 1.39, intermedia 1.31 y avanzada 1.37) sin encontrar mayores variaciones entre las tres, Figura 1. Sin embargo, las velocidades en el estado tres y el estado cuatro si muestran diferencias para cada uno de los grados de enfermedad, encontrando velocidades más altas en las mitocondrias de palmas sanas figura 1a ( $11.7 \pm 1.18$  y  $8.98 \pm 2.85$ ), seguida de la intermedia figura 1b ( $9.78 \pm 5.31$  y  $7.46 \pm 5.10$ ), y finalmente velocidades más bajas en el estado avanzado de enfermedad figura 1c ( $8.44 \pm 0.36$  y  $6.13 \pm 0.15$ ).

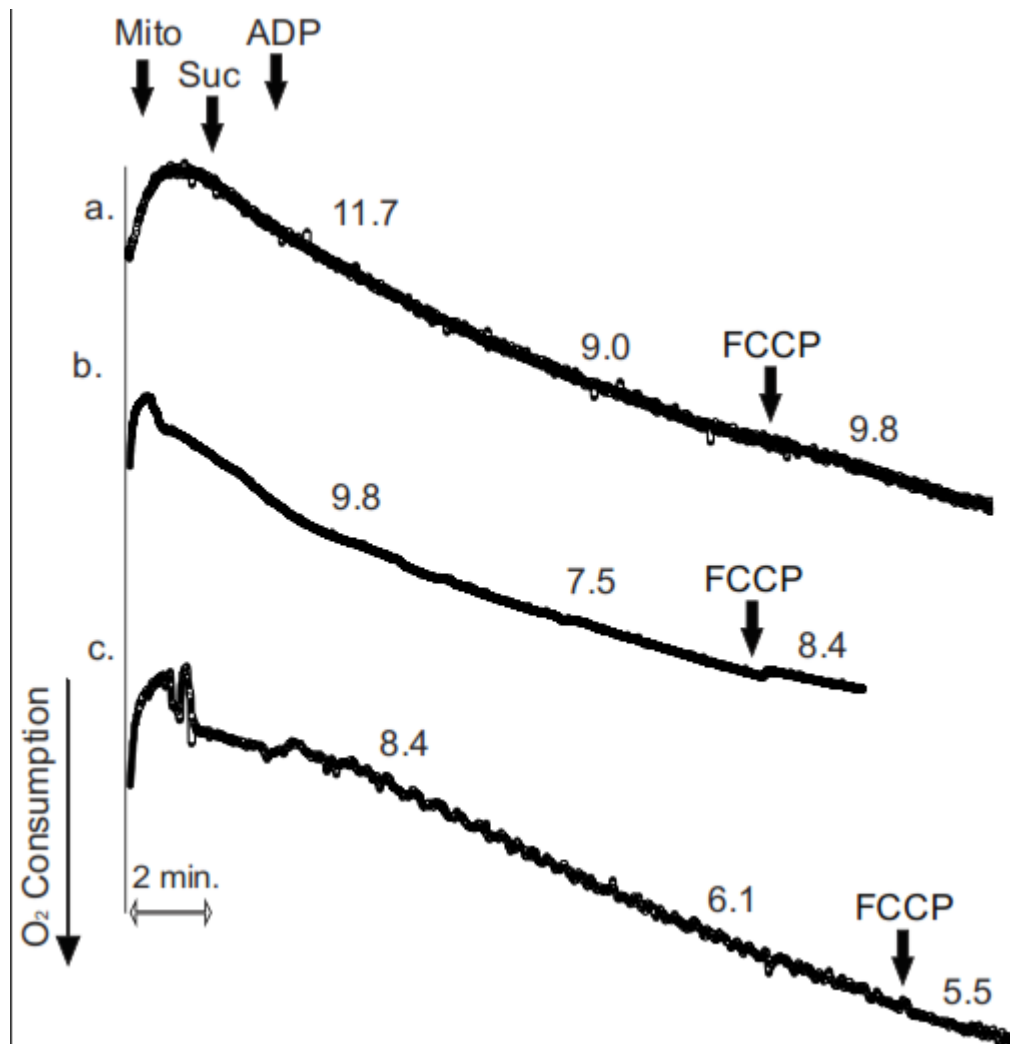


Figura 1 Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma energizada con succinato (a) Palma Sana. (b) palma estado intermedio de enfermedad. (c) palma estado avanzado.

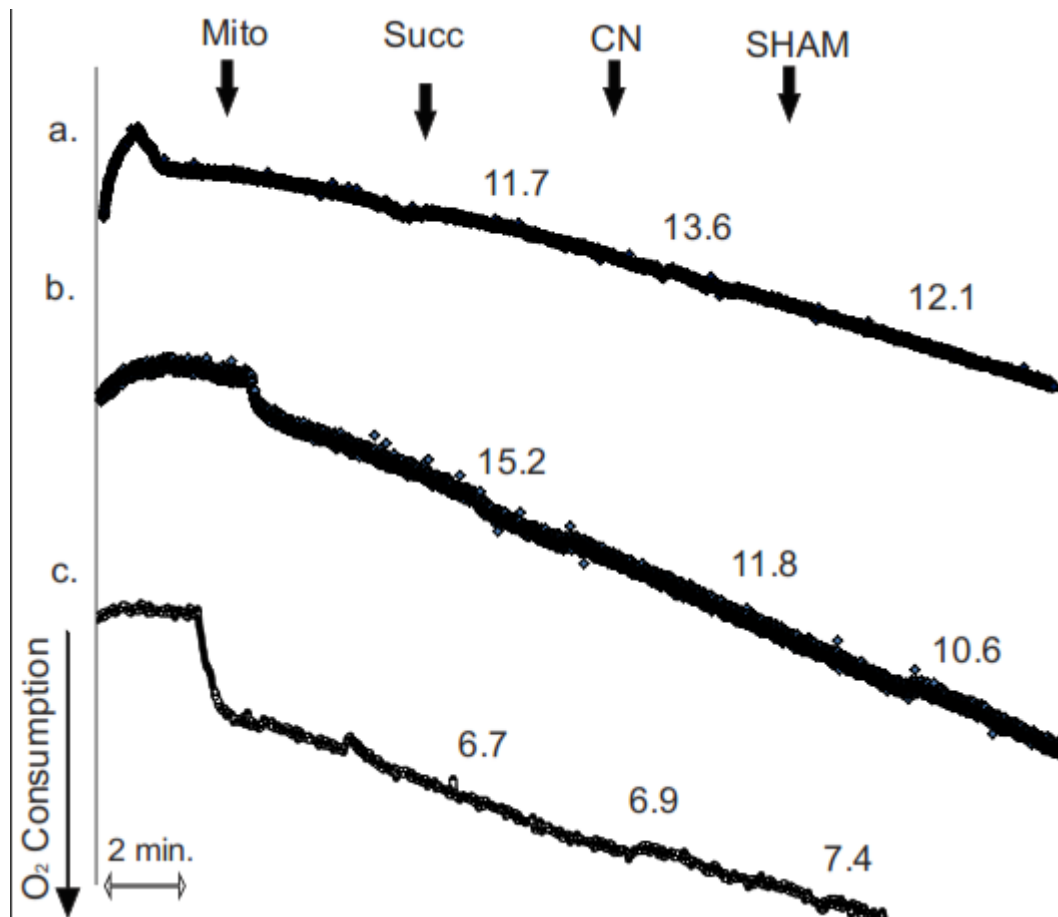
Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L-1 (pH 7.4), sacarosa 250 mmol.L-1, KCl 2 mmol.L-1 y suplementadas con glutamato de sodio 5 mmol.L-1, malato 2mM, succinato de sodio 3 mmol.L-1, Pi 1.6 mmol.L-1 y ADP 0.6 mmol.L-1. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

La adición de FCCP, un ionóforo que colapsa el potencial de membrana, induce que las mitocondrias de palma sana figura 1a respiren más rápido ( $9.76 \pm 4.17$ ),

pero en las mitocondrias en estado intermedio esta velocidad ( $8.40 \pm 4.16$ ) es un poco mayor que la del estado 4 pero menor que la encontrada en el estado 3. En las mitocondrias de palmas enfermas figura 1c esta velocidad en presencia de FCCP ( $5.51 \pm 0.62$ ) es bastante menor comparada con el estado 3 ( $8.44 \pm 0.36$ ).

Adicionalmente se realizaron experimentos para evaluar si la respiración mostrada era debida a la presencia de oxidasas alternativas, teniendo presente que las mitocondrias de células vegetales, además de las proteínas de la fosforilación oxidativa, presentan otras proteínas que pueden contribuir al consumo de oxígeno, desacoplando la fosforilación al evitar que se forme potencial de membrana (Hourton-Cabassa *et al.*, 2004).

Para estudiar la respiración celular debida a la oxidasa alternativa, mitocondrias energizadas con succinato fueron tratadas con cianuro, inhibidor del complejo IV de la cadena respiratoria, figura 2. Se observa que las mitocondrias de cogollos de palma de aceite respiran después de adicionar cianuro, lo que confirma la presencia de las AOX, este resultado es independiente de la presencia o ausencia de la enfermedad. Las velocidades de respiración fueron de  $13.6 \pm 4.19$ ,  $11.8 \pm 3.84$  y  $6.99 \pm 2.03$  nmol de oxígeno/minuto en palmas sanas, con PC en estado intermedio y con PC en estado avanzado, respectivamente. Las AOX son activadas por la presencia de ácidos grasos (Casolo *et al.*, 2000) y teniendo en cuenta que se evalúa en palmas productoras de aceite, se puede sugerir que el alto contenido de ácidos grasos es el responsable de el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.



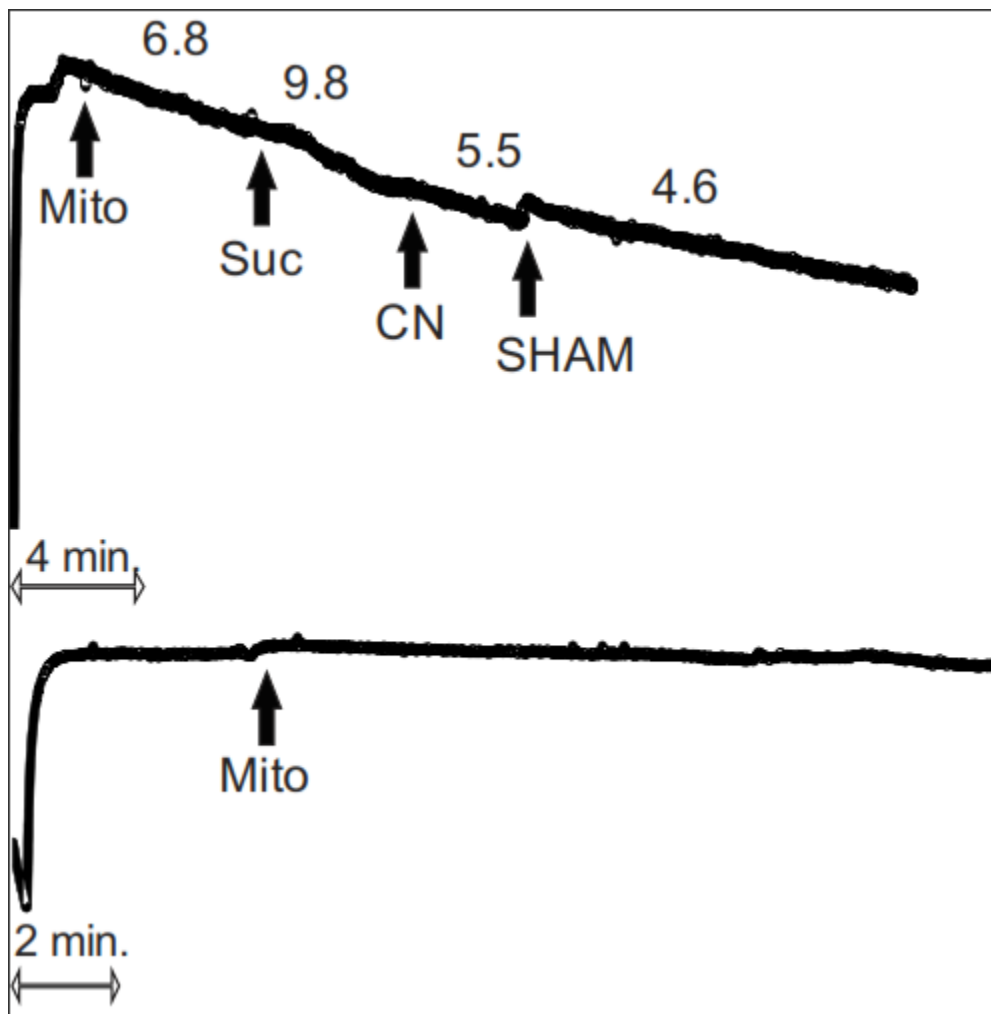
**Figura 2.** Consumo de oxígeno en mitocondrias en presencia de cianuro y SHAM. (a) Palma Sana. (b) palma estado intermedio de enfermedad. (c) palma estado avanzado. Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L-1 (pH 7.4), sacarosa 250 mmol.L-1, KCl 2 mmol.L-1 y suplementadas con rotenona 10mM, succinato 3mM, Pi 1.6 mmol.L-1, ADP 0.6 mmol.L-1, cianuro de potasio 1mM, SHAM 1mM. Resultado representativo de 2 palmas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

Con la adición posterior de SHAM, un conocido inhibidor de las AOX, se observa que las mitocondrias continúan respirando ( $12.1 \pm 5.64$  para las sanas,  $10.6 \pm 4.26$  para estado intermedio de PC y  $7.41 \pm 3.41$  para el estado avanzado de enfermedad), lo que podría indicar que las mitocondrias de palma tuviesen

oxidasas alternativas resistentes a SHAM o la presencia de otras proteínas que transfieran electrones para facilitar el consumo de oxígeno.

Con la finalidad de evaluar si las mitocondrias de palma de aceite realmente presentan AOX resistentes a SHAM, se aislaron mitocondrias de palmas de vivero sanas, de aproximadamente 1 año de edad. Por ser una planta pequeña, de aproximadamente 1 metro de altura, el proceso de obtención del cogollo y el de aislamiento de las mitocondrias se realizó inmediatamente.

El consumo de oxígeno de estas mitocondrias, figura 3, fue similar al observado en mitocondrias de palmas sanas. Se evaluó el consumo de oxígeno de mitocondrias energizadas con succinato en presencia de cianuro (5.45 nmol O<sub>2</sub>/min, Figura 3a) y SHAM (4.60 nmol O<sub>2</sub>/min, Figura 3a). El cianuro inhibió la velocidad de respiración en aproximadamente 50%, sugiriendo nuevamente la presencia de AOX. La consecuente adición de SHAM inhibió levemente la velocidad de respiración mitocondrial, confirmando que sí las mitocondrias tienen AOX, estas proteínas son resistentes a SHAM. En la figura 3b se presenta el consumo de oxígeno de mitocondrias no energizadas, demostrando que la respiración presentada en la figura 3a, es debida a mitocondrias y no a una posible presencia de peroxisomas.

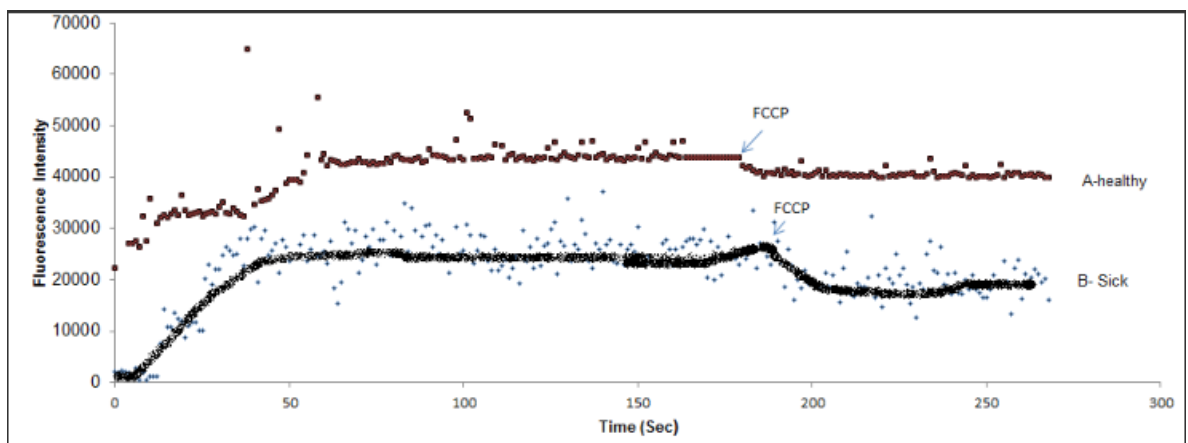


**Figura 3.** Consumo de oxígeno en mitocondrias de palma de vivero. (a) en presencia de cianuro y SHAM. (b). Mitocondria en ausencia de sustratos oxidables.

Sistema de reacción: Mitocondrias de cogollo de palma de aceite 1mg/mL, HEPES 10 mmol.L-1 (pH 7.4), sacarosa 250 mmol.L-1, KCl 2 mmol.L-1 y suplementadas con rotenona 10mM, succinato 3mM, Pi 1.6 mmol.L-1, ADP 0.6 mmol.L-1, cianuro de potasio 1mM, SHAM 1mM. Resultado representativo de 2 palmas diferentes. Los números representan la velocidad de consumo de oxígeno en nmol de oxígeno por minuto.

### 3.2. Transporte de calcio mitocondrial

Se determinó el flujo de calcio en las mitocondrias energizadas con succinato observando un aumento de la intensidad de fluorescencia por adición de calcio y disminución de la intensidad de fluorescencia como consecuencia de la adición de FCCP, permitiendo estudiar el flujo de salida del calcio de la organela Figura 4. En este ensayo se compararon solo dos grupos de palmas, las sanas y las que presentaron estado intermediario de enfermedad.



**Figura 4.** Transporte de calcio en las mitocondrias de palmas de aceite *Elaeis guineensis* Jacq en estado sana y enferma con pudrición de cogollo

Sistema de reacción: Mitocondria  $9,5 \times 10^{-2}$  mg/mL, sacarosa 125mM, KCl 65mM, HEPES 10mM (pH 7,2). Fura 2AM  $5 \mu\text{M}$ . Suplementadas con: Rotenona 10mM, succinato 3mM,  $\text{CaCl}_2$  35mM y FCCP 10mM.  $\lambda$  emisión 340nm y  $\lambda$  excitación 510nm

Al comparar la intensidad de fluorescencia de los dos grupos de palmas, se observa que las palmas enfermas captaron menos calcio y liberaron más calcio en presencia de FCCP (Figura 4), sugiriendo que la mitocondria presenta una menor capacidad de almacenamiento del catión, lo que puede generar el aumento de la concentración de Ca en el citoplasma; dicho aumento de calcio citoplasmático

podría desencadenar una serie de reacciones que podrían finalizar en la muerte celular, por activación de proteínas dependientes de GTP y aumentando la producción de ERO (White and Broadley, 2003).

### 3.3. Enzimas Antioxidantes

**Las enzimas antioxidantes fueron analizadas desde extracto de proteínas totales y desde mitocondrias, ambas de cogollo de palma de aceite, tabla 1.**

En la fase intermedia de la enfermedad o grado 3 disminuye la actividad de la Gred, como se muestra en la tabla 1 lo cual implica que se reduce la concentración de la GSH, un cofactor esencial para la actividad de la Gpx. Se ha informado que cuando la intensidad del estrés es mayor, la concentración de GSH disminuye y el estado redox se desplaza hacia el estado oxidado, lo que ocasiona un deterioro del sistema (Polkowska *et al.*, 2007, Gill *et al.*, 2013, Frendo *et al.*, 2013) producido por el aumento de especies reactivas de oxígeno.

**Tabla 1.** Actividad enzimática antioxidativa correspondiente a las enzimas mitocondriales y las existentes en el extracto bruto.

Grados de enfermedad								
<b>Actividad</b>	Sana		Tres		Cuatro		Cinco	
<b>enzimática</b>	M	E.B	M	E.B	M	E.B	M	E.B
<b>mitocondrial</b>	M	E.B	M	E.B	M	E.B	M	E.B

<b>SOD (% de actividad)</b>	35,63±	68,67±	28,48±	71,98±	20,69±	370,77±	3,56±	68,17±
	6,58	22,52	7,38	25,17	10,31	80,23 <sup>a,b</sup>	1,55 <sup>a</sup>	9,25
<b>CAT (nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reducido/min)</b>	2,82±	1,93±	3,17±	1,94±	2,95±	1,87±	0,49±	1,99±
	1,52	0,35	2,34	0,54	0,93	1,045	0,16 <sup>c</sup>	0,11
<b>Gpx (nmol de NADP+/mg proteína)</b>	4869,07±	103,35±	8553,05±	114,83±	747,60±	238,48±	13697,74±	235,79±
	3801,34	30,84	6027,73	27,23	184,89	35,72	407,29	67,88
<b>Gred (nmol de NADP+/mg proteína)</b>	2329,17±	139,33±	2861,71±	47,14±	621,65±	522,51±	5535,90±	198,28±
	1661,98	63,12	2211,28	14,16 <sup>a</sup>	192,92	166,13 <sup>b</sup>	292,96	50,02
<b>Lipoperoxidación (nM de MDA generado)</b>	23,74±7,61		94,82±58,21 <sup>a</sup>		31,29±5,42		60,05 ±2,42	

---

**a, b, c** señalan las diferencias estadísticamente significativas en comparación al grado 0, al grado 3 y al grado 4 de enfermedad, respectivamente.

Al analizar el estado 4, se evidencia un aumento en la actividad de la Gred como consecuencia del aumento de las ROS; esta hipótesis se confirma ya que se acompaña de un incremento de la actividad de las enzimas SOD y Gpx, mostrado en la tabla 1. Esto implica que aumentó la concentración del radical  $O_2^{\cdot-}$  quien está siendo reducido a  $H_2O_2$ . A su vez la concentración de peróxido es disminuida por la actividad de Gpx quien se encarga de reducirlo hasta agua junto a otros peróxidos lipídicos (Schweikert *et al.*, 2003). La Gred aumenta su actividad en el grado 4 lo cual es congruente con el aumento de actividad de la Gpx también en grado 4 ya que la Gred es la que suministra el cofactor, glutatióna reducida para la actividad de la Gpx, pues convierte el glutatión oxidado GSSH en glutatión reducido GSH (Gill *et al.*, 2013).

La actividad de la SOD en grado avanzado o grado 5, decae lo que implica que la planta en grados más bajos de enfermedad intenta disminuir la concentración de ERO; una vez la enfermedad ha avanzado a un punto de mayor pudrición de los tejidos la planta para de reducir las ERO para que el incremento de estas especies ayude a aislar el patógeno del resto de la palma; lo cual ocurre con la SOD; sin embargo con la Gpx se observa que en el grado más avanzado de enfermedad no

presenta diferencias significativas en relación al estado 4, sugiriendo que intenta disminuir la producción de otro tipo de peróxidos.

En el caso de la Catalasa, no se evidencia diferencias en la actividad de esta enzima en los diferentes grados de la enfermedad tanto en mitocondrias como en EB.

### **3.4. Lipoperoxidación.**

Al realizar la prueba de TBARS se observa que en el grado 3 de la enfermedad hay un aumento de la lipoperoxidación en relación al grado 0 ( $94,82 \pm 58,21$  nM de MDA), tal como se muestra en la tabla 1. Sin embargo la lipoperoxidación decae en el grado 4 ( $31,29 \pm 5,42$  nM de MDA) seguida de un nuevo aumento en el grado 5 de enfermedad ( $60,05 \pm 2,42$  nM de MDA). Esto nos indica que en mitocondrias está aumentado el estrés oxidativo en los grados 3 y 5 de la enfermedad.

## **4. Discusión**

La mitocondria es una organela que participa activamente en las respuestas metabólicas de las plantas a ataques por patógenos y por factores abióticos (Møller, 2001; Minibayeva *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2013). En este trabajo se analizaron algunas alteraciones mitocondriales de palmas de aceite en presencia de la enfermedad pudrición de cogollo.

Se encontraron mitocondrias altamente desacopladas tanto en mitocondrias de palmas sanas como enfermas (figura 1). Es posible que las mitocondrias se

encuentren normalmente desacopladas por la activación de PUMP (plant uncoupling mitochondria protein). Mas si se tiene en cuenta que las PUMP son activadas por la presencia de ácidos grasos (Sluse *et al.*, 1998; Pastore *et al.*, 2000; Grabel'nich *et al.*, 2009; Hourton-Cabassa *et al.*, 2004) y que estas palmas son productoras de aceite. El desacoplamiento mitocondrial aumentó a medida que aumentó el grado de enfermedad.

Las AOX son otro grupo de proteínas que contribuyen a la disipación del potencial de membrana y por consiguiente a disminución de la producción de energía mitocondrial (Atteia *et al.*, 2004). Para evaluar la posible actividad de estas proteínas fue adicionado CN a todas las preparaciones mitocondriales. Se observó respiración resistente a CN, con velocidades de consumo de oxígeno menor a medida que aumentó el grado de enfermedad. Este resultado confirma la actividad de las AOX.

Se ha reportado que las AOX son activadas para proteger a la planta de la excesiva generación de radicales de oxígeno (Hourton-Cabassa *et al.*, 2004), lo que llevaría a pensar que a medida que aumenta el grado de pudrición de cogollo, las mitocondrias de palma de aceite regulan menos esta vía, facilitando el vazamiento de electrones y la formación de especies reactivas de oxígeno (Maxwell *et al.*, 1999; Bhate and Ramasarma, 2009; Møller, 2001; Vanlerberghe, 2013).

Para inhibir las AOX fue adicionado SHAM. No en tanto, se observó una respiración celular resistente al inhibidor en todas las preparaciones mitocondriales. Este resultado sugiere que las mitocondrias de palma de aceite, tanto sanas como enfermas tienen AOX resistentes a SHAM y/o presentan contaminación por peroxisomas.

Teniendo en cuenta que la respiración aparentemente resistente a SHAM, no está directamente relacionada con la pudrición de cogollo, se aislaron mitocondrias de palmas jóvenes, sanas, cultivadas en condiciones de vivero y se observó su respiración en presencia y ausencia de sustratos oxidables (figura 3), encontrando resultados similares a los reportados con palmas en edad productiva (figura 2a) y una muy baja velocidad de respiración en ausencia de sustrato (figura 2b), descartando una alta contaminación por peroxisomas.

AOX no sensibles a SHAM solo han sido estudiadas a partir de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Berthold, 1998), por lo que con esta planta se abrirían nuevas posibilidades para entender la actividad de las AOX y su mecanismo de inhibición por SHAM.

Otro factor importante durante la respiración celular, es la capacidad de captar y almacenar calcio por la mitocondria. Nosotros encontramos que las mitocondrias energizadas de palmas enfermas presentan menor capacidad de captación de calcio y mayor liberación de ion al adicionar el desacoplador FCCP, cuando comparadas con las mitocondrias de palmas sanas. En la literatura se ha

reportado que la presencia de elicitores de defensa en plantas genera picos elevados de concentración de calcio citoplasmático y mitocondrial (Manzoor *et al.*, 2012). Por otro lado, en mitocondrias animales y vegetales, el aumento de la concentración de calcio está relacionada con la formación de un canal mitocondrial, el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) (Saviani *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2008; Petrusa *et al.*, 2004; Vianello *et al.*, 2012). La formación de este poro induce hinchamiento mitocondrial, aumento de ROS y una mayor liberación de calcio al citoplasma (Odagiri *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que las palmas con pudrición de cogollo, pueden sufrir alteraciones en el transporte de calcio mitocondrial como respuesta a la enfermedad y que esas alteraciones inducen la formación del PTPM, esta hipótesis deberá ser corroborada en próximos trabajos.

En relación al estrés oxidativo, se demostró que la actividad de actividad de la CAT no ejerce un factor resaltante en la respuesta de la planta a la pudrición de cogollo, por lo menos a nivel del cogollo. En estudios realizados en hojas de palma de aceite (Moreno *et al.*, 2013) se muestra tendencia a aumentar su actividad de acuerdo al avance de la enfermedad, resultados que a principio contradicen los aquí reportados. Sin embargo como se muestra en estudios similares llevados a cabo en plantas de tomate la actividad enzimática antioxidante no es igual en las diferentes partes de la planta como son las hojas, el tallo y raíces (Mazhoudi *et al.*, 1997). Probablemente los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son mayores en las hojas para tratar

de detener el ataque inicial del patógeno y en los tallos el mecanismo de defensa esté basado en otra estrategia.

Las mitocondrias son organelas implicadas en la activación de la muerte celular programada, por

tal motivo la célula debe controlar los niveles de ROS que llegan a estos compartimentos durante el ataque de los patógenos. (Mittler 2002) En las células de palma se evidencia el esfuerzo por controlar el anión superóxido al presentar mayor actividad en la SOD presente en el extracto de proteínas en todos los grados de la enfermedad cuando comparado con la actividad de la enzima en mitocondrias. Debido a la baja actividad presentada por la CAT, la célula debe reducir el peróxido formado de la actividad de la SOD por otros mecanismos, uno de ellos es el ciclo de la Gpx y Gred. Estas enzimas muestran una tendencia a aumentar su actividad tanto en mitocondrias como en extracto bruto en los distintos estados de la enfermedad, lo cual concuerda con los estudios realizados en hojas de palma de aceite (Moreno *et al.*, 2013).

El aumento del estrés oxidativo en respuesta al grado de enfermedad también es observado con el aumento la peroxidación lipídica en los grados 3 y 5 de enfermedad. Se sugiere que este aumento corresponde al aumento de ROS generados por la inducción, por parte de la planta, de respuesta de hipersensibilidad o SAR para aislar el patógeno (Otulak and Garbaczewska, 2010).

La bioquímica de las respuestas de la palma de aceite a la pudrición de cogollo no es muy clara, mas los resultados aquí descritos permites asegurar que está

relacionada con el aumento de EROs y de alteraciones mitocondriales que conllevan al aumento del estrés oxidativo.

## **5. Procedimiento experimental.**

### **5.1. Material vegetal**

En este estudio fueron usados cogollos y meristemas de palmas de aceite *Elaeis guineensis* Jacq. Sanas y enfermas en estado intermedio fueron colectadas en Cenipalma (municipio Sabana de Torres, Finca la Vizcaína, Santander Colombia material de siembra Deli x Avros Dumpy. Los cogollos y meristemas de palmas en grado avanzado de enfermedad fueron colectada en el municipio de Sabana de Torres, Finca Bellavista, Santander Colombia material de siembra Deli Avros x Yagambi, todas las palmas colectadas tienen edades entre 8 y 9 años. Sabana de Torres está a una altitud de 110 *msnm* con una temperatura promedio de 28,5°C, humedad relativa of 85%, 2.200 mm precipitación anual y las condiciones agroecológicas de la selva tropical.

Los grupos de palmas fueron clasificados según el grado de severidad de la enfermedad usando la escala CENIPALMA para pudrición de cogollo (Torres *et al.*, 2008), las palmas fueron derrumbadas y los tejidos fueron llevados a las instalaciones de la Universidad Industrial de Santander donde fueron analizados aproximadamente 12 horas después de la colecta. Durante todo el proceso los tejidos se mantuvieron a 4°C.

## **5.2. Aislamiento de mitocondrias de cogollo de palma de aceite.**

Para analizar la bionergética mitocondrial de las palmas con PC, las mitocondrias fueron aisladas como descrito por Mariano et al, 2008, con algunas modificaciones. Los tejidos vegetales fueron procesadas en un extractor de zumos, utilizándose como medio de aislamiento: Sacarosa 250 mM, Cisteína 3 mM, HEPES-Na 10 mM, pH 7,2, EGTA 2 mM y BSA 0,2 g%. El extracto fue filtrado y la suspensión obtenida fue centrifugada a 1000 x g a 4°C durante 10 minutos, para eliminación de células intactas, membranas y núcleos. El sedimento fue descartado y el sobrenadante centrifugado a 13000 x g durante 12 minutos a 4°C. El precipitado obtenido, fue resuspendido y centrifugado a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante de éste último proceso fue nuevamente centrifugado a 13000xg durante 12 minutos. Las mitocondrias obtenidas fueron resuspendidas en medio de extracción (sin BSA y sin EGTA) y mantenidas a 4°C hasta su utilización.

Para los ensayos de lipoperoxidación las mitocondrias fueron resuspendidas en un medio conteniendo Manitol 250mM, HEPES 10mM, pH 7,2 y EGTA 2mM y centrifugadas nuevamente a 12000xg durante 10 minutos.

## **5.3. Obtención del extracto bruto de proteínas**

De la primera centrifugación de protocolo de aislamiento anterior, se tomó una alícuota del sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 2000xg durante 10

minutos. El sobrenadante fue usado como fuente de proteínas totales para evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes.

#### **5.4. Determinación del consumo de oxígeno**

Fueron usadas mitocondrias de cogollo y meristemo de palma de aceite (1mg) aisladas como descrito anteriormente y medio de incubación compuesto de: HEPES 10 mM (pH 7.4), Sacarosa 250 mM, KCl 2 mM y suplementadas con glutamato de sodio 5 mM o succinato de sodio 3 mM, Pi 1.6 mM y ADP 0.6 mM. Usando un oxígrafo con electrodo tipo Clarck, de Hansatech.

#### **5.5. Determinación de la captación y liberación de calcio por las mitocondrias.**

Los movimientos de calcio a través de la membrana mitocondrial interna fueron monitoreados con un Fluorímetro marca Photon Technology Inc (PTI), modelo QM40, lámpara de Xenon de 75W usando Fura 2 AM siguiendo el procedimiento descrito por Scarpa (Scarpa, 1979). En este ensayo las mitocondrias (3,5mg/mL) fueron incubadas durante 20 minutos con 5 $\mu$ M de Fura 2 AM, en oscuridad a 28°C, posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 8100xg.

Las mitocondrias con la sonda fura 2, fueron tratadas con CaCl<sub>2</sub> 35mM siendo que la entrada de calcio fue activada por la adición de succinato de sodio 3mM y la salida por la adición de 1  $\mu$ M de FCCP.

#### **5.6. Determinación Actividad de Enzimas Antioxidantes.**

Los ensayos realizados para evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes fueron hechos usando mitocondrias y extracto bruto como fuentes enzimáticas donde las proteínas fueron cuantificadas usando el método de Bradford (Bradford, 1976).

La actividad de la SOD fue evaluada de acuerdo al método descrito por Nishimiki (Nishimiki *et al.*, 1972), con algunas modificaciones, usando como sistemas de reacción TRIS-HCl 10 mM (pH 8,0), NADH 340  $\mu$ M, NBT 72  $\mu$ M, PMS 30  $\mu$ M y mitocondrias o proteínas resuspendidas 250  $\mu$ g proteína/mL, seguido a 560 nm.

La actividad de la catalasa fue acompañada por la disminución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el cual fue medido con la absorbancia a 240 nm (Aeby, 1984) en un sistema de reacción constituido por tampón fosfato 50 mM (pH 7,0), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM y enzimas mitocondriales o extracto bruto 130  $\mu$ g de proteína/mL.

La actividad de la Gpx fue evaluada de acuerdo a la técnica propuesta por Flohe y Gunzler (Flohe y Gunzler, 1984). La reacción fue medida usando monitoreo espectrofotométrico a 340nm y la actividad enzimática fue definida como nmol de NADP<sup>+</sup>/mg proteína.

La actividad de la Gred fue evaluada de acuerdo a los descrito por Sies (Sies *et al.*, 1979), en un sistema de reacción constituido por tampón fosfato 100mM (pH 7), EDTA 1 mM, GSSG 0,66 mM, NADPH 0,075 mM y enzimas mitocondriales o extracto bruto 50  $\mu$ g de proteína/mL. La reacción seguida a 340 nm, la actividad fue reportada como nmol de NADP<sup>+</sup>/mg proteína.

### **5.7. Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

La lipoperoxidación fue evaluada de acuerdo al método descrito por Buege y Aust, 1978, en un medio que contienen proteína mitocondrial (1mg/mL), 10mM HEPES (pH 7.2), 250mM manitol. La peroxidación lipídica se estimó por la absorbancia de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) ( $\epsilon_{535} = 1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

### **5.8. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con un análisis de varianza y la prueba de Tukey para la comparación promedio de los ensayos mitocondriales. Los ensayos de actividad enzimáticas fueron analizados por estadística no paramétrica usando el test de Mann-Whitney. Los valores se consideraran con diferencias significativas con  $P < 0,05$ .

## **6. Agradecimientos**

A CENIPALMA en especial a Fausto Prada, Oscar Obando, Luis Villareal de la finca La Vizcaína por la colaboración prestada. Este trabajo está enmarcado dentro del Convenio de Cooperación Institucional entre la Universidad Industrial de Santander y el Laboratorio Químico Ganacampo y es financiado por la VIE-UIS proyecto 5195.

## 7. Referencias

- Atteia, A., Lis, R. van, Hellemond, J.J. van, Tielens, A.G.M., Martin, W. and Henze, K.** (2004) Identification of prokaryotic homologues indicates an endosymbiotic origin for the alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX). *Gene*, **330**, 143–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087133> [Accessed February 14, 2014].
- Berthold, D. a** (1998) Isolation of mutants of the *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol: oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 73–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9554960>.
- Bhate, R.H. and Ramasarma, T.** (2009) Evidence for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the product of reduction of oxygen by alternative oxidase in mitochondria from potato tubers. *Arch. Biochem. Biophys.*, **486**, 165–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375411> [Accessed January 24, 2014].
- Casolo, V., Braidot, E., Chiandussi, E., Macrì, F. and Vianello, a** (2000) The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **474**, 53–7.
- fedepalma** (2012) *La agroindustria de la palma de aceite en Colombia y en el mundo,*.
- Franqueville, H.** (2001) *La pudrición del cogollo de la palma aceitera en america latina*, Available at: [http://www.bio-nica.info/biblioteca/Franqueville 2001 pudricion cogollo palma aceitera.PDF](http://www.bio-nica.info/biblioteca/Franqueville%2001%20pudricion%20cogollo%20palma%20aceitera.PDF).
- Frendo, P., Baldacci-Cresp, F., Benyamina, S.M. and Puppo, A.** (2013) Glutathione and plant response to the biotic environment. *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 724–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912161> [Accessed January 2, 2014].
- Gill, S.S., Anjum, N. a, Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E. and Tuteja, N.** (2013) Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.*, **70**, 204–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792825> [Accessed January 2, 2014].
- Grabel'nich, O.I., Pivovarova, N.Y., Pobezhimova, T.P., Kolesnichenko, a. V. and Voinikov, V.K.** (2009) The role of free fatty acids in mitochondrial

energetic metabolism in winter wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.*, **56**, 332–342. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S1021443709030054> [Accessed January 24, 2014].

**Héctor, A., Francia, V., Gerardo, M. and Gerardo, C.** (2011) manejo químico de la pudrición del cogollo en cuatro materiales de palma de aceite en Tumaco, Colombia. *Palmas*, **32**, 45–52. Available at: <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1597> [Accessed January 23, 2014].

**Hourton-Cabassa, C., Rita Matos, A., Zachowski, A. and Moreau, F.** (2004) The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.*, **42**, 283–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120112> [Accessed January 24, 2014].

**Jones, a** (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci.*, **5**, 225–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10785669>.

**Laing, D.** (2011) LA DEFICIENCIA TRANSITORIA DE CALCIO COMO CAUSA PRIMORDIAL DE LA PUDRICIÓN DE COGOLLO EN PALMA DE ACEITE. *Inf. Agron.*, **3**, 26–52.

**Lin, J., Wang, Y. and Wang, G.** (2006) Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J. Plant Physiol.*, **163**, 731–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616584> [Accessed January 25, 2014].

**Manzoor, H., Chiltz, A., Madani, S., Vatsa, P., Schoefs, B., Pugin, A. and Garcia-Brugger, A.** (2012) Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. *Cell Calcium*, **51**, 434–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410211> [Accessed January 27, 2014].

**Mariano, A.B., Valente, C., Maurer, J.B.B., Cadena, S.M.S.C., Rocha, M.E.M., Oliveira, M.B.M. de, Salgado, I. and Carnieri, E.G.S.** (2008) Functional characterization of mitochondria isolated from the ancient gymnosperm *Araucaria angustifolia*. *Plant Sci.*, **175**, 701–705. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945208002124> [Accessed November 16, 2012].

- Martinez, G., Sarria, G.A., Torres, G.A. and Varon, F.** (2010) Avances en la investigación de *Phytophthora palmivora*, el agente causal de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. *PALMAS*, **31**, 55–63.
- Maxwell, D.P., Wang, Y. and McIntosh, L.** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 8271–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Habib Ghorbal, M. and Ferjani, E. El** (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Sci.*, **127**, 129–137. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945297001167>.
- Minibayeva, F., Dmitrieva, S., Ponomareva, A. and Ryabovol, V.** (2012) Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.*, **59**, 11–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22386760> [Accessed January 26, 2014].
- Møller, I.M.** (2001) PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. , **52**, 561–91.
- Moreno-chacón, A.L., Camperos-reyes, J.E., Andrés, R., Diazgranados, Á. and Mauricio, H.** (2013) Plant Physiology and Biochemistry Biochemical and physiological responses of oil palm to bud rot caused by *Phytophthora palmivora*. *Plant Physiol. Biochem.*, **70**, 246–251. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.026>.
- Moreno-Chacón, A.L., Camperos-Reyes, J.E., Ávila Diazgranados, R.A. and Romero, H.M.** (2013) Biochemical and physiological responses of oil palm to bud rot caused by *Phytophthora palmivora*. *Plant Physiol. Biochem.*, **70**, 246–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796724> [Accessed January 21, 2014].
- Odagiri, K., Katoh, H., Kawashima, H., Tanaka, T., Ohtani, H., Saotome, M., Urushida, T., Satoh, H. and Hayashi, H.** (2009) Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **46**, 989–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318235> [Accessed February 13, 2014].

- Otulak, K. and Garbaczewska, G.** (2010) Localisation of hydrogen peroxide accumulation during *Solanum tuberosum* cv. Rywal hypersensitive response to Potato virus Y. *Micron*, **41**, 327–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20117938> [Accessed February 14, 2014].
- Pastore, D., Fratianni, A., Pede, S. Di and Passarella, S.** (2000) Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. *FEBS*, **470**, 88–92.
- Petrussa, E., Casolo, V., Peresson, C., Braidot, E., Vianello, A. and Macrì, F.** (2004) The K(ATP)+ channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria. *Mitochondrion*, **3**, 297–307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120362> [Accessed February 12, 2014].
- Polkowska-Kowalczyk, L., Wielgat, B. and Maciejewska, U.** (2007) Changes in the antioxidant status in leaves of *Solanum* species in response to elicitor from *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.*, **164**, 1268–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17175062> [Accessed January 17, 2014].
- Rocha, P.J., Mendoza, C. and Cayon, G.** (2005) Application of polyamines in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) stops advance of bud rot disease. *J. oil palm Res.*, **17**, 168–175.
- Sarria, G.A., Torres, G.A., Aya, H., Ariza, J., Rodriguez, J., Velez, D., Varon, F. and Martinez, G.** (2008) *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo ( PC ) de la Palma de aceite en Colombia. *PALMAS*, **29**, 31–41.
- Saviani, E.E., Orsi, C.H., Oliveira, J.F.P., Pinto-Maglio, C. a F. and Salgado, I.** (2002) Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Lett.*, **510**, 136–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801241>.
- Schweikert, C., Liskay, A. and Schopfer, P.** (2002) Polysaccharide degradation by Fenton reaction--or peroxidase-generated hydroxyl radicals in isolated plant cell walls. *Phytochemistry*, **61**, 31–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165299>.
- Shao, H.-B., Song, W.-Y. and Chu, L.-Y.** (2008) Advances of calcium signals involved in plant anti-drought. *C. R. Biol.*, **331**, 587–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606388> [Accessed January 21, 2014].
- Shugaev, a. G., Lashtabega, D. a., Shugaeva, N. a. and Vyskrebentseva, E.I.** (2011) Activities of antioxidant enzymes in mitochondria of growing and

dormant sugar beet roots. *Russ. J. Plant Physiol.*, **58**, 387–393. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S1021443711020208> [Accessed January 22, 2014].

- Sluse, F.E., Almeida, a M., Jarmuszkiewicz, W. and Vercesi, a E.** (1998) Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **433**, 237–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9744802>.
- Torres, G., Sarria, G., Salcedo, S., Varon, F., Aya, H., Ariza, J., Morales, L. and Martinez, G.** (2008) Opciones de manejo de la Pudrición del cogollo ( PC ) de la Palma de aceite en áreas de baja incidencia de la enfermedad. *PALMAS*, **29**, 63–72.
- Vanlerberghe, G.C.** (2013) Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 6805–47. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3645666&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 24, 2014].
- Vianello, a, Petrusa, E. and Macrì, F.** (1994) ATP/ADP antiporter is involved in uncoupling of plant mitochondria induced by low concentrations of palmitate. *FEBS Lett.*, **349**, 407–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8050605>.
- Vianello, A., Casolo, V., Petrusa, E., Peresson, C., Patui, S., Bertolini, A., Passamonti, S., Braidot, E. and Zancani, M.** (2012) The mitochondrial permeability transition pore (PTP) - an example of multiple molecular exaptation? *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 2072–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22771735> [Accessed January 1, 2014].
- White, P.J. and Broadley, M.R.** (2003) Calcium in plants. *Ann. Bot.*, **92**, 487–511.
- Xiao, Y., Wang, J. and Dehesh, K.** (2013) Review of stress specific organelles-to-nucleus metabolic signal molecules in plants. *Plant Sci.*, **212**, 102–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24094057> [Accessed January 29, 2014].

## BIBLIOGRAFÍA

- Atteia, A., Lis, R. van, Hellemond, J.J. van, Tielens, A.G.M., Martin, W. and Henze, K.** (2004) Identification of prokaryotic homologues indicates an endosymbiotic origin for the alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX). *Gene*, **330**, 143–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087133> [Accessed February 14, 2014].
- Berthold, D. a** (1998) Isolation of mutants of the *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol: oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 73–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9554960>.
- Bhate, R.H. and Ramasarma, T.** (2009) Evidence for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the product of reduction of oxygen by alternative oxidase in mitochondria from potato tubers. *Arch. Biochem. Biophys.*, **486**, 165–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375411> [Accessed January 24, 2014].
- Casolo, V., Braidot, E., Chiandussi, E., Macri, F. and Vianello, a** (2000) The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **474**, 53–7.
- fedepalma** (2012) *La agroindustria de la palma de aceite en Colombia y en el mundo,*.
- Franqueville, H.** (2001) *La pudrición del cogollo de la palma aceitera en america latina*, Available at: [http://www.bio-nica.info/biblioteca/Franqueville 2001 pudricion cogollo palma aceitera.PDF](http://www.bio-nica.info/biblioteca/Franqueville%2001%20pudricion%20cogollo%20palma%20aceitera.PDF).
- Frendo, P., Baldacci-Cresp, F., Benyamina, S.M. and Puppo, A.** (2013) Glutathione and plant response to the biotic environment. *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 724–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912161> [Accessed January 2, 2014].
- Gill, S.S., Anjum, N. a, Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E. and Tuteja, N.** (2013) Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.*, **70**, 204–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792825> [Accessed January 2, 2014].

- Grabel'nich, O.I., Pivovarova, N.Y., Pobezhimova, T.P., Kolesnichenko, a. V. and Voinikov, V.K.** (2009) The role of free fatty acids in mitochondrial energetic metabolism in winter wheat seedlings. *Russ. J. Plant Physiol.*, **56**, 332–342. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S1021443709030054> [Accessed January 24, 2014].
- Héctor, A., Francia, V., Gerardo, M. and Gerardo, C.** (2011) manejo químico de la pudrición del cogollo en cuatro materiales de palma de aceite en Tumaco, Colombia. *Palmas*, **32**, 45–52. Available at: <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1597> [Accessed January 23, 2014].
- Hourton-Cabassa, C., Rita Matos, A., Zachowski, A. and Moreau, F.** (2004) The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.*, **42**, 283–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120112> [Accessed January 24, 2014].
- Jones, a** (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends Plant Sci.*, **5**, 225–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10785669>.
- Laing, D.** (2011) LA DEFICIENCIA TRANSITORIA DE CALCIO COMO CAUSA PRIMORDIAL DE LA PUDRICIÓN DE COGOLLO EN PALMA DE ACEITE. *Inf. Agron.*, **3**, 26–52.
- Lin, J., Wang, Y. and Wang, G.** (2006) Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *J. Plant Physiol.*, **163**, 731–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616584> [Accessed January 25, 2014].
- Manzoor, H., Chiltz, A., Madani, S., Vatsa, P., Schoefs, B., Pugin, A. and Garcia-Brugger, A.** (2012) Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. *Cell Calcium*, **51**, 434–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410211> [Accessed January 27, 2014].
- Mariano, A.B., Valente, C., Maurer, J.B.B., Cadena, S.M.S.C., Rocha, M.E.M., Oliveira, M.B.M. de, Salgado, I. and Carnieri, E.G.S.** (2008) Functional characterization of mitochondria isolated from the ancient gymnosperm *Araucaria angustifolia*. *Plant Sci.*, **175**, 701–705. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945208002124> [Accessed November 16, 2012].

- Martinez, G., Sarria, G.A., Torres, G.A. and Varon, F.** (2010) Avances en la investigación de *Phytophthora palmivora*, el agente causal de la pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. *PALMAS*, **31**, 55–63.
- Maxwell, D.P., Wang, Y. and McIntosh, L.** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 8271–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Habib Ghorbal, M. and Ferjani, E. El** (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Sci.*, **127**, 129–137. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945297001167>.
- Minibayeva, F., Dmitrieva, S., Ponomareva, A. and Ryabovol, V.** (2012) Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.*, **59**, 11–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22386760> [Accessed January 26, 2014].
- Møller, I.M.** (2001) PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. , **52**, 561–91.
- Moreno-chacón, A.L., Camperos-reyes, J.E., Andrés, R., Diazgranados, Á. and Mauricio, H.** (2013) Plant Physiology and Biochemistry Biochemical and physiological responses of oil palm to bud rot caused by *Phytophthora palmivora*. *Plant Physiol. Biochem.*, **70**, 246–251. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.026>.
- Moreno-Chacón, A.L., Camperos-Reyes, J.E., Ávila Diazgranados, R.A. and Romero, H.M.** (2013) Biochemical and physiological responses of oil palm to bud rot caused by *Phytophthora palmivora*. *Plant Physiol. Biochem.*, **70**, 246–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796724> [Accessed January 21, 2014].
- Odagiri, K., Katoh, H., Kawashima, H., Tanaka, T., Ohtani, H., Saotome, M., Urushida, T., Satoh, H. and Hayashi, H.** (2009) Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **46**, 989–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318235> [Accessed February 13, 2014].

- Otulak, K. and Garbaczewska, G.** (2010) Localisation of hydrogen peroxide accumulation during *Solanum tuberosum* cv. Rywal hypersensitive response to Potato virus Y. *Micron*, **41**, 327–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20117938> [Accessed February 14, 2014].
- Pastore, D., Fratianni, A., Pede, S. Di and Passarella, S.** (2000) Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. *FEBS*, **470**, 88–92.
- Petrussa, E., Casolo, V., Peresson, C., Braidot, E., Vianello, A. and Macrì, F.** (2004) The K(ATP)+ channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria. *Mitochondrion*, **3**, 297–307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16120362> [Accessed February 12, 2014].
- Polkowska-Kowalczyk, L., Wielgat, B. and Maciejewska, U.** (2007) Changes in the antioxidant status in leaves of *Solanum* species in response to elicitor from *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.*, **164**, 1268–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17175062> [Accessed January 17, 2014].
- Rocha, P.J., Mendoza, C. and Cayon, G.** (2005) Application of polyamines in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) stops advance of bud rot disease. *J. oil palm Res.*, **17**, 168–175.
- Sarria, G.A., Torres, G.A., Aya, H., Ariza, J., Rodriguez, J., Velez, D., Varon, F. and Martinez, G.** (2008) *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo ( PC ) de la Palma de aceite en Colombia. *PALMAS*, **29**, 31–41.
- Saviani, E.E., Orsi, C.H., Oliveira, J.F.P., Pinto-Maglio, C. a F. and Salgado, I.** (2002) Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Lett.*, **510**, 136–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801241>.
- Schweikert, C., Liskay, A. and Schopfer, P.** (2002) Polysaccharide degradation by Fenton reaction--or peroxidase-generated hydroxyl radicals in isolated plant cell walls. *Phytochemistry*, **61**, 31–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165299>.
- Shao, H.-B., Song, W.-Y. and Chu, L.-Y.** (2008) Advances of calcium signals involved in plant anti-drought. *C. R. Biol.*, **331**, 587–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606388> [Accessed January 21, 2014].
- Shugaev, a. G., Lashtabega, D. a., Shugaeva, N. a. and Vyskrebentseva, E.I.** (2011) Activities of antioxidant enzymes in mitochondria of growing and

dormant sugar beet roots. *Russ. J. Plant Physiol.*, **58**, 387–393. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S1021443711020208> [Accessed January 22, 2014].

- Sluse, F.E., Almeida, a M., Jarmuszkiewicz, W. and Vercesi, a E.** (1998) Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Lett.*, **433**, 237–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9744802>.
- Torres, G., Sarria, G., Salcedo, S., Varon, F., Aya, H., Ariza, J., Morales, L. and Martinez, G.** (2008) Opciones de manejo de la Pudrición del cogollo ( PC ) de la Palma de aceite en áreas de baja incidencia de la enfermedad. *PALMAS*, **29**, 63–72.
- Vanlerberghe, G.C.** (2013) Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 6805–47. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3645666&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract> [Accessed January 24, 2014].
- Vianello, a, Petrusa, E. and Macrì, F.** (1994) ATP/ADP antiporter is involved in uncoupling of plant mitochondria induced by low concentrations of palmitate. *FEBS Lett.*, **349**, 407–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8050605>.
- Vianello, A., Casolo, V., Petrusa, E., Peresson, C., Patui, S., Bertolini, A., Passamonti, S., Braidot, E. and Zancani, M.** (2012) The mitochondrial permeability transition pore (PTP) - an example of multiple molecular exaptation? *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 2072–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22771735> [Accessed January 1, 2014].
- White, P.J. and Broadley, M.R.** (2003) Calcium in plants. *Ann. Bot.*, **92**, 487–511.
- Xiao, Y., Wang, J. and Dehesh, K.** (2013) Review of stress specific organelles-to-nucleus metabolic signal molecules in plants. *Plant Sci.*, **212**, 102–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24094057> [Accessed January 29, 2014].