

La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión de la Resistencia a Enfermedades en Plantas

Micaela Benezzer-Benezzer, Elda Castro-Mercado y Ernesto García-Pineda, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Lab. de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Edif. B1, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México CP 58040. Correspondencia: egpineda@zeus.umich.mx

(Recibido: Septiembre 10, 2007 Aceptado: Enero 10, 2008)

Benezzer-Benezzer, M., Castro-Mercado, E. y García-Pineda, E. 2008. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:56-61.

Resumen. Las plantas responden a la infección por patógenos, al daño mecánico o herida inducida por herbívoros con una producción localizada de especies reactivas de oxígeno (ERO), un fenómeno referido con frecuencia como “explosión oxidativa”. Si bien se han identificado algunas fuentes potenciales de ERO, no es claro cuales mecanismos predominan durante las interacciones planta patógeno. Las ERO tienen una función importante en el inicio de la respuesta hipersensible, una forma de muerte celular programada inducida por patógenos incompatibles (avirulentos), y efectos directos sobre el patógeno, el entrecruzamiento oxidativo incrementando los polímeros de pared celular y la inducción de expresión de genes que responden a patógeno. En este artículo se revisa la química y la función de estos compuestos durante una interacción planta-patógeno.

Palabras clave adicionales: Antioxidantes, respuestas de defensa.

Abstract. Plants respond to pathogen infection and mechanical or herbivore-induced wounding by localized production of reactive oxygen species (ROS), a phenomenon often referred to as the “oxidative burst”. Although some potential sources of ROS in plant cells have been identified, it is still unclear which mechanisms predominate during plant-pathogen interactions. ROS have a role in initiating the hypersensitive response, a form of programmed cell death induced by incompatible (avirulent) pathogens, and direct effects on the pathogen, increased oxidative cross-linking of cell wall polymers and induction of pathogen response gene expression. In this paper we focus on the chemistry and the role of these compounds during a plant-pathogen interaction.

Additional keywords: Antioxidants, defense responses.

INTRODUCCIÓN

Cuando una célula vegetal detecta la presencia de un

patógeno se activa una reacción de defensa inducida. Esta reacción es más severa a nivel local, en el tejido que está directamente en contacto con el patógeno, y más débil a nivel sistémico, en los tejidos no infectados de la planta. Este tipo de reacción permite potenciar las barreras de defensa, tanto químicas como estructurales en el tejido que está siendo atacado. A la reacción local se le llama respuesta de hipersensibilidad (HR) y puede conducir a la necrosis del tejido infectado. La necrosis se produce fundamentalmente por la acumulación abundante de compuestos químicos, entre los cuales se encuentran la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las fitoalexinas. Específicamente, el término “especies reactivas de oxígeno” incluye a todas las moléculas derivadas del oxígeno, a los radicales y a los no radicales. El término también incluye al óxido nítrico (ON), una molécula de señalización importante en animales y plantas (Halliwell *et al.*, 1999). Un radical libre es cualquier especie capaz de tener una existencia independiente que contiene uno o más electrones no apareados (Halliwell y Gutteridge, 2006). Existen diversos tipos de radicales libres en sistemas biológicos, pero esta revisión se enfocará específicamente a los radicales libres derivados del oxígeno, debido a su importancia durante la patogénesis. ¿Cómo se producen las especies reactivas de oxígeno?, ¿Qué daños provocan a las células?, ¿Cuál es su función durante la patogénesis?, y ¿Cómo se regula su producción?, son algunas de las preguntas cuyo análisis es el objetivo de esta revisión.

La química del oxígeno activo. El oxígeno molecular en su forma más estable (O_2 , en esta forma se encuentra en el aire que nos rodea) se puede considerar como un radical libre pues tiene dos electrones no apareados, con giros paralelos, y es un potente agente oxidante, sin embargo, para oxidar una molécula no radical y aceptar un par de electrones estos electrones deben de tener el mismo giro (paralelo) para ocupar los orbitales vacantes en el O_2 . Los electrones de un átomo o de una molécula no cumplen con este criterio puesto que tienen giro antiparalelo. Esta restricción de giro hace que el O_2 acepte sólo un electrón a la vez y explica porqué reacciona lentamente con la mayoría de las moléculas no radicales. Por el contrario, reacciona notablemente rápido con radicales por transferencia de un solo electrón (Halliwell y Gutteridge, 2006).

Así, aunque el oxígeno molecular en su estado basal es poco reactivo, su reducción parcial genera ERO, incluyendo el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH). La primera reacción en la reducción parcial del oxígeno molecular es la adición de un electrón para formar O_2^- . Este puede ser protonado a pH bajo ($pK_a = 4.8$) para formar el radical perhidroxilo (HO_2). El O_2^- y HO_2 sufren una dismutación espontánea para producir H_2O_2 (Fig. 1). El H_2O_2 es estable y menos reactivo que el O_2^- . Sin embargo, en la presencia de metales de transición reducidos como el Fe^{2+} , que pueden estar libres o formando complejos con agentes quelantes o proteínas, puede ocurrir la formación del OH dependiente de H_2O_2 , y el O_2^- puede actuar como el agente reductor inicial para el metal. El OH es un oxidante muy fuerte y puede iniciar reacciones en cadena de radicales con una gran variedad de moléculas orgánicas, esto puede llevar a la peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas, y degradación de ácidos nucleicos. La mayoría de las moléculas biológicas no son radicales y cuando un radical libre reacciona con un no radical, se forma un nuevo radical y sucede una reacción en cadena (Halliwell y Gutteridge, 2006).

Óxido nítrico (ON). La importancia del ON durante la patogénesis y las respuestas de defensa se han reportado en diversas investigaciones. El ON es una molécula gaseosa considerablemente móvil y es capaz de atravesar libremente las membranas biológicas. Está formada por dos átomos, un átomo de oxígeno (O) y otro de nitrógeno (N), cuando estos dos átomos se encuentran sus electrones se aparean para formar una molécula de ON, que contiene un electrón desapareado. La presencia del electrón desapareado permite al ON interactuar rápidamente con otros átomos que son abundantes en los sistemas biológicos, tal como el N y el azufre (S), que forman parte de las proteínas. La unión del ON

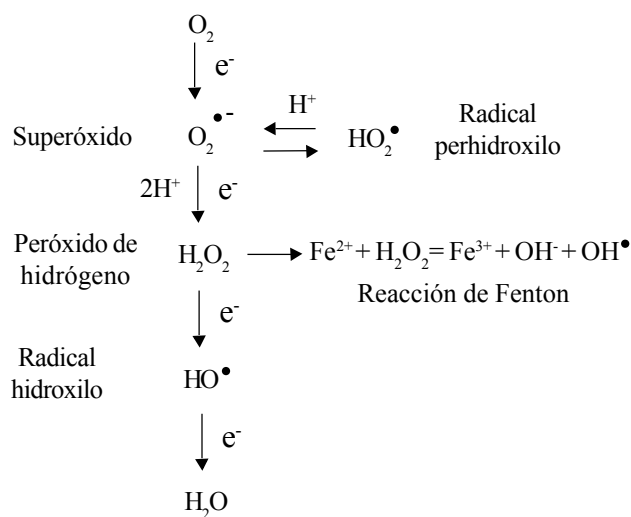


Fig. 1. Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO normalmente son generadas por una reducción secuencial del oxígeno molecular (tomado de Desikan *et al.*, 2005).

a las proteínas, u otras moléculas, se llama nitrosación, y este proceso es la base química que permite al ON ejercer diversas funciones en los organismos. El ON también interactúa con átomos metálicos como el hierro (Fe), el cual forma parte de proteínas que se conocen como ferroproteínas o hemoproteínas. Estas proteínas son fundamentales en la regulación de un gran número de funciones biológicas como la producción de energía, el transporte y almacenamiento del oxígeno y la transducción de señales (Gow y Ischiropoulos, 2001). Por otro lado, el ON reacciona rápidamente con el oxígeno molecular (O_2) y sus diferentes formas altamente reactivas, como los radicales superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e hidroxilo (OH), los cuales son sumamente tóxicos. La interacción del NO con el O_2^- genera peroxinitrito y otras formas reactivas del N que también son tóxicas, por lo tanto, la combinación del ON con las formas reactivas del O_2 constituye el principal mecanismo mediante el cual el ON daña a las células. El óxido nítrico regula las defensas antimicrobianas en mamíferos, particularmente la muerte celular programada, debido a lo cual ha generado un interés considerable en los biólogos vegetales. Esta molécula emerge como una señal importante durante las interacciones planta-patógeno (Delledonne, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2004; Wendehenne *et al.*, 2004). Además de su papel en la respuesta hipersensible tiene otras funciones durante la defensa de la planta y puede influenciar la virulencia de los patógenos (Greenberg y Yao, 2004). El ON en sistemas biológicos puede ser producido por mecanismos enzimáticos o no enzimáticos. Las enzimas descritas para producirlo son la óxido nítrico sintasa (ONS) y la nitrato reductasa (NR). La ONS cataliza la oxidación en dos pasos de la L-arginina para producir ON y citrulina (Boucher *et al.*, 1992). La NR genera ON de nitrito utilizando NADPH como donador de electrones (Kaiser *et al.*, 2002; Yamasaki y Sakihama, 2000).

Formación de las especies reactivas de oxígeno. Las ERO generadas durante la patogénesis son producidas de manera característica fuera de la membrana plasmática de las células vegetales (apoplasto) (Doke y Ohashi, 1988; Levine *et al.*, 1994). Mediante el uso de inhibidores específicos, se han postulado dos mecanismos enzimáticos como los responsables más probables de esta producción en el apoplasto. El primero involucra a la enzima NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática, la cual se considera como la principal fuente de ERO en respuesta a varios patógenos (Torres *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2003). Esta enzima es similar al sistema enzimático que produce superóxido en las células fagocíticas animales (Lambeth, 2004). En plantas, lo mismo que en animales, existe una familia génica de estas oxidasas (llamadas Rboh, Respiratory burst oxidase homologs), al igual que una familia génica de GTPasas rac/rop reguladoras de la actividad de la enzima (Torres y Dangl, 2005). Ello sugiere que diferentes miembros de esta familia de oxidasas puedan mediar la producción de ROS en diferentes situaciones, no sólo ante la acción de patógenos sino también en otras respuestas al entorno, así como en procesos del

desarrollo. El segundo mecanismo está formado por las peroxidases de la pared celular, las cuales pueden contribuir a la producción apoplástica de ERO en algunas interacciones planta patógeno (Bolwell *et al.*, 1998). Ambos mecanismos enzimáticos pueden producir ERO en diferentes contextos espacio/temporales (Soylu *et al.*, 2005), lo cual sugiere una diferencia funcional entre las ERO producidas fuera de la célula vegetal.

ERO en la interacción planta/patógeno. En 1983 Doke reportó la generación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno como una nueva respuesta distinta a las defensas clásicas en plantas. Demostró la producción de O_2^- después de la inoculación con una raza incompatible de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, pero no después del tratamiento con una raza compatible. Desde entonces la generación rápida de oxidantes ha sido descrita en varias interacciones planta/patógeno, y como una característica de la RH. Con la clonación de genes R surgió un gran interés en la explosión oxidativa como una de las primeras respuestas al ataque por patógenos (Alvarez y Lamb, 1996; Baker y Orlandi, 1995; Dixon *et al.*, 1994; Mehdy, 1994). Las ERO desempeñan un papel importante durante la defensa de las plantas en contra de patógenos. Como resultado de la respuesta de la planta, se producen ERO por un incremento en la actividad de las enzimas NADPH oxidasa, ubicada en la membrana plasmática, peroxidases unidas a la pared celular y aminooxidasa ubicadas en el apoplasto. A diferencia del anión superóxido, el peróxido de hidrógeno puede difundirse al interior de la célula y activar los genes de defensa, conduciendo a la muerte celular programada (MCP) (Davison *et al.*, 2002; Grant y Loake, 2000; Hammond-Kosack y Jones, 2000). Además, la actividad de las enzimas que detoxifican a las ERO, tales como catalasa y ascorbato peroxidasa son suprimidas por ácido salicílico y óxido nítrico (Klessig *et al.*, 2000.), como resultado se crea un balance en favor de la acumulación de ERO. La inducción de la MCP eventualmente limita el avance del patógeno más allá del sitio de infección. Durante reacciones incompatibles, cuando un patógeno es detectado como un enemigo y las respuestas de defensa se activan, la producción de H_2O_2 muestra un comportamiento bifásico. Una acumulación inicial rápida de H_2O_2 (fase I) es seguida por una segunda y más prolongada producción de H_2O_2 (fase II). En las interacciones compatibles, cuando un patógeno vence los sistemas de defensa de la planta y provoca una enfermedad, solamente se observa el primer pico de producción de H_2O_2 . Se ha observado que la fase I es una reacción biológicamente inespecífica, mientras que la fase II requiere de la acción de los genes *avr* del patógeno durante una interacción raza-cultivar específica y correlaciona con la resistencia de la planta (Baker y Orlandi, 1995).

Función de las ERO en la respuesta contra patógenos. La correlación entre la acumulación de ERO y el establecimiento de las defensas sugiere que las ERO podrían tener una función tóxica directa sobre los patógenos, o sobre las células en donde se producen. Las evidencias además indican que

las ERO actúan como señales regulando el establecimiento de la reacción de defensa a nivel de la expresión génica o el fortalecimiento de la pared celular vía entrecruzamiento de proteínas de la pared (Apostol *et al.*, 1989; Babior, 1992; Bleichert *et al.*, 1995). También se ha postulado que las ERO participan en la inducción de la muerte celular programada en el sitio de infección, lo que contribuye a limitar la invasión de los potenciales patógenos (Bokoch, 1994). Las ERO pueden tener funciones opuestas en diferentes interacciones planta/patógeno siendo en algunos casos reguladores positivos de las reacciones de defensa y muerte celular, mientras que en otros casos actúan como reguladores negativos (Montillet *et al.*, 2005). En rutas de transducción de señales inducidas por patógenos o estimuladores, las ERO participan en la activación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK; Mitogen Activated Protein Kinases), en el cambio en los niveles de Ca^{2+} , y en la modificación del estado redox celular (Rentel y Knight, 2004). En plantas el estado redox regula a NPR1, un activador esencial de las respuestas de defensa que dependen del ácido salicílico. NPR1 se acumula en el citosol como un oligomero inactivo mantenido así por enlaces disulfuro, después de la estimulación su reducción libera unidades monoméricas que migran hacia el núcleo e interactúan con el factor de transcripción reducido TGA1, el cual en turno activa la expresión de genes de defensa dependientes de ácido salicílico (Mou *et al.*, 2003). Así, la cascada de señalización activada por ERO inicia un cambio global en el transcriptoma para ejecutar programas genéticos apropiados. En células de *Arabidopsis* tratadas con H_2O_2 se observaron cambios en el perfil de expresión de 175 genes (de 11,000 analizados). Estos genes codifican para enzimas antioxidantes, proteínas asociadas con la defensa o con funciones de señalización tales como cinasas o factores de transcripción (Desikan *et al.*, 2001) (Fig. 2). Se ha propuesto que las ERO, en combinación con el ácido salicílico, puedan ser moléculas reguladoras del establecimiento de las defensas sistémicas en contra de patógenos (Bolwell *et al.*, 1995). La rápida producción de ERO y la capacidad de difusión del H_2O_2 a través de membranas ha hecho pensar que esta molécula puede actuar como segundo mensajero intra o intercelular (Pitzschke y Hirt, 2006; Van Breusegem y Dat, 2006). Aunque la acumulación de ERO correlaciona normalmente con el establecimiento de las respuestas de resistencia a la enfermedad, algunos organismos patógenos pueden salir beneficiados con su acumulación e incluso se postula que inducen su producción con este propósito. Es, por ejemplo, el caso de algunos necrótrofos que estimulan la acumulación de ERO para inducir mayor muerte celular, lo que favorece la diseminación de la infección (Chamnonngpol *et al.*, 1996; Chandra y Low, 1995).

Defensas en contra de la producción de las ERO. Para disminuir el daño provocado por la producción de ERO los organismos aeróbicos han evolucionado mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen al ascorbato, glutatión, tocoferol,

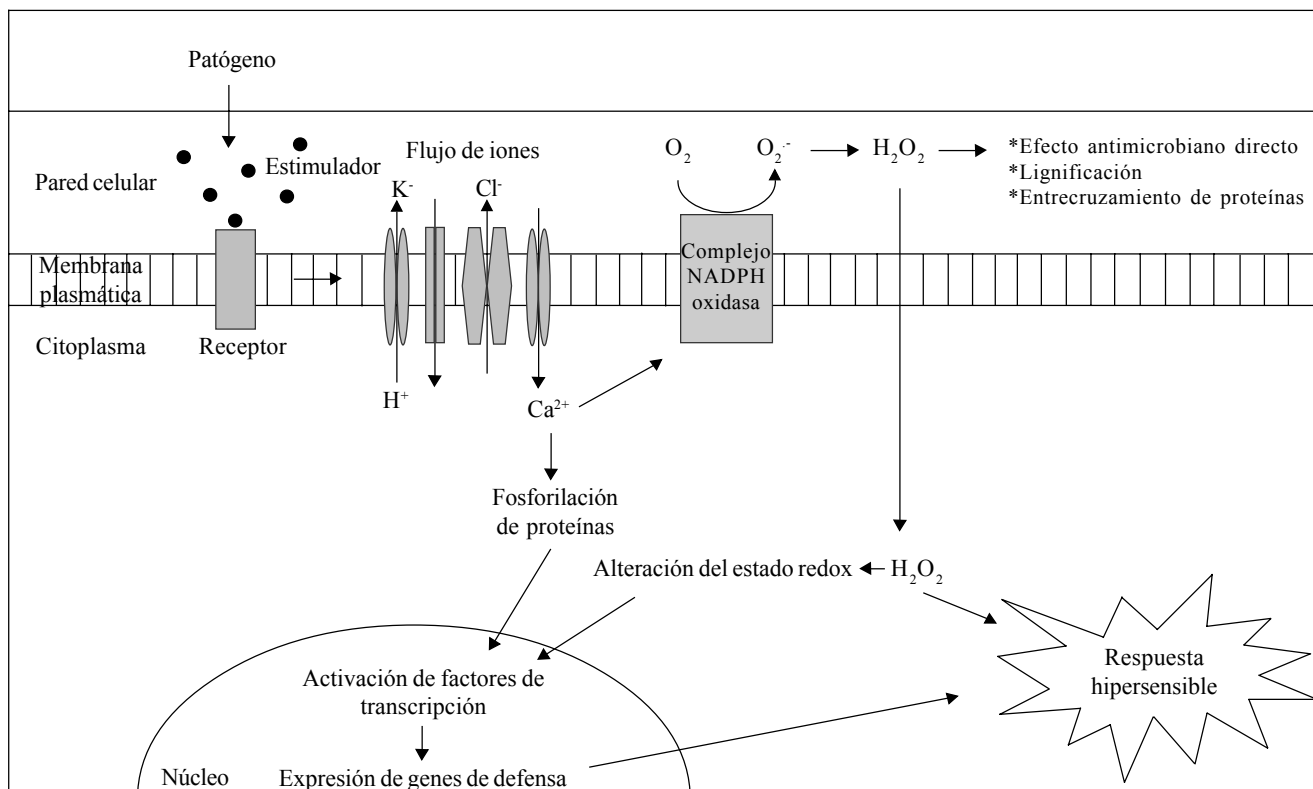


Fig. 2. Inducción de respuestas de defensa en plantas. Durante el proceso de patogénesis el patógeno libera moléculas que son reconocidas por receptores de la célula, este reconocimiento modifica la función de transportadores de iones, uno de los cuales, el calcio incrementa su concentración intracelular, activando la reacción de fosforilación que estimula la expresión de genes de defensa. El calcio también puede activar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la enzima NADPH oxidasa (modificado de Yang *et al.*, 1997).

flavonoides, alcaloides y carotenoides. Estos eliminan directamente al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno por su capacidad antioxidante intrínseca (Halliwell, 2006). Los mecanismos enzimáticos incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (AP), glutatión peroxidasa (GP) y catalasa (CAT). SOD actúa como la primera línea de defensa en contra de las ERO transformando el $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . Las enzimas AP, GP y CAT subsecuentemente lo detoxifican reduciéndolo a H_2O . A diferencia de la mayoría de los organismos, las plantas tienen múltiples genes que codifican para SOD y AP, las cuales están específicamente localizadas en los cloroplastos, la mitocondria, peroxisomas, citosol y apoplasto (Asada, 2006). La extensión del estrés oxidativo en una célula está determinada por la cantidad de superóxido, H_2O_2 y radicales hidroxilo. Por lo tanto, el balance de las actividades de SOD, AP y CAT es crucial para suprimir los niveles tóxicos de ERO en la célula. Si cambia el balance de estas enzimas se inducen mecanismos compensatorios que involucran a otras enzimas, por ejemplo, cuando se reduce la actividad de CAT otras enzimas como ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión peroxidasa (GPX) son inducidas.

CONCLUSIÓN

La producción de ERO en plantas es esencial para la defensa en contra de la infección por patógenos.

Agradecimientos. Los autores agradecen el apoyo financiero otorgado por el CONACYT para la realización de esta investigación (P43438-Z).

LITERATURACITADA

- Alvarez, M.E., and Lamb, C. 1996. Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance. pp 500-530. In: J. Scandalios (ed.). *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, New York, USA. 890 p.
- Apostol, I., Heinstejn, P.F., and Low, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plants cells: role in defense and signal transduction. *Plant Physiology* 90:109-116.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141:391-396.
- Babior, B.M. 1992. The respiratory burst oxidase. *Advances*

- in Enzymology and Related Areas in Molecular Biology 65:49-95.
- Baker, C.J., and Orlandi, E.W. 1995 Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33:299-321.
- Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z., and Zenk, M.H. 1995. The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:4099-4105.
- Bokoch, G.M. 1994. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 6:212-218.
- Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R., and Zimmerlin, A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* 23:517-32.
- Bolwell, G.P., Davies, D.R., Gerrish, C., Auh, C.K., and Murphy, T.M. 1998. Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiology* 116:1379-1385.
- Boucher, J.L., Genet, A., Vadon, S., Delaforge, M., Henry, Y., and Mansuy, D. 1992. Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N- ω -hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187:880-886.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Camp, W. 1996. Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant Journal* 10:491-503.
- Chandra, S., and Low, P.S. 1995. Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:4120-4123.
- Davison, P.A., Hunter, C.N., and Horton, P. 2002. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* 418:203-206.
- Delledonne, M. 2005. NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8:390-396.
- Desikan, R., Mackerness, S.A.-H., Hancock, J.T., and Neill, S.J. 2001. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127:159-172.
- Desikan, R., Hancock, J., and Neill, S. 2005. Reactive oxygen species as signaling molecules. pp. 169-191. In: N. Smirnov (ed). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK. 302 p.
- Dixon, R.A., Harrison, M.J., and Lamb, C.J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32:479-501.
- Doke, N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology* 23:345-347.
- Doke, N., and Ohashi, Y. 1988. Involvement of an O₂⁻-generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32:163-175.
- Gow, A.J., and Ischiropoulos, H. 2001. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *Journal of Cellular Physiology* 187:277-282.
- Grant, J.J., and Loake, G.J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124:21-29.
- Greenberg, J.T., and Yao, N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant/pathogen interactions. *Cell Microbiology* 6:201-211.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141:312-322.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Oxford University Press. New York, USA. 888 p.
- Halliwell, B., Zhao, K., and Whiteman, M. 1999. Nitric oxide and peroxynitrite: the ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radical Research* 31:651-669.
- Hammond-Kosack, K., and Jones, J.D.G. 2000. Responses to plant pathogens. pp 1102-1154. In: B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones (eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Waldorf, MD, USA. 1367 p.
- Kaiser, W.M., Weiner, H., Kandlbinder, A., Tsai, C.B., Rockel, P., Sonoda, M., and Planchet, E. 2002. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany* 53:875-882.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., and Silva, H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:8849-8855.
- Lambeth, J.D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Natural Review in Immunology* 4:181-189.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C.J. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Mehdy, M.C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105:467-472.
- Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., Van de Cotte, B., Agnel, J.P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F., and Triantaphylides, C. 2005. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* 138:1516-1526.
- Mou, Z., Fan, W.H., and Dong, X.N. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113:935-944.
- Pitzschke, A., and Hirt, H. 2006. Mitogen-activated protein

- kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiology* 141:351-356.
- Rentel, M.C., and Knight, M.R. 2004. Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135:1471-1479.
- Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D., and Delledonne, M. 2004. Nitric oxide signaling functions in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiology* 6:795-803.
- Soylu, S., Brown, I., and Mansfield, J.W. 2005. Cellular reactions in *Arabidopsis* following challenge by strains of *Pseudomonas syringae*: From basal resistance to compatibility. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66:232-243.
- Torres, M.A., and Dangl, J.L. 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8:397-403.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D. 2002. *Arabidopsis* gp91 phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:517-522.
- Van Breusegem, F., and Dat, J.F. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141:384-390.
- Wendehenne, D., Durner, J., and Klessig, D.F. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 7:449-455.
- Yamasaki, H., and Sakihama, Y. 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* 468:89-92.
- Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D.F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes and Development* 11: 1621-1639.
- Yoshioka, H., Numata, N., and Nakajima, K. 2003. Nicotiana benthamiana gp91 phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15:706-718.