



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

## DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

### EFFECTOS DEL VIRUS MOSAICO DEL TABACO Y DE INDUCTORES DE RESISTENCIA SOBRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN JITOMATE

#### T E S I S

Que como requisito parcial para obtener el título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta

**Negrete Herrera José Eduardo**



Bajo la supervisión de: **Lozoya Saldaña Héctor, Ph.D.**



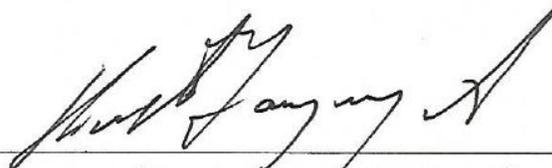
Chapingo, Estado de México. Junio de 2021

**EFFECTOS DEL VIRUS MOSAICO DEL TABACO Y DE INDUCTORES DE RESISTENCIA SOBRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN JITOMATE**

Tesis realizada por **JOSÉ EDUARDO NEGRETE HERRERA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

DIRECTOR:



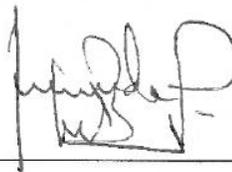
Ph. D. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR:



Dr. CAMILO HERNÁNDEZ JUÁREZ

ASESOR:



Dr. JOEL PINEDA PINEDA

ASESOR:



M.C. LUIS EMILIO CASTILLO MÁRQUEZ

## CONTENIDO

LISTA DE CUADROS .....	V
LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE APENDICES .....	VII
DEDICATORIA .....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
DATOS BIOGRÁFICOS.....	X
RESUMEN GENERAL.....	XI
GENERAL ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Objetivo general.....	2
1.1.1. Objetivos particulares.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Interacción planta-patógeno.....	3
2.1.1. Interacción planta-virus .....	4
2.2. Mecanismos de defensa de la planta.....	5
2.3. Metabolitos secundarios .....	6
2.3.1. Terpenos.....	6
2.3.2. Fenoles .....	7
2.3.2.1. Cumarina .....	7
2.3.2.2. Lignina .....	7
2.3.2.3. Taninos .....	8
2.3.2.4. Flavonoides.....	8
2.3.2.5. Derivados del ácido benzoico .....	9
2.3.3. Metabolitos secundarios que contiene azufre .....	9
2.3.4. Metabolitos secundarios que contiene nitrógeno .....	9
2.4. Inductores de resistencia .....	10

2.5. Literatura citada .....	10
3. EFECTOS DEL VIRUS MOSAICO DEL TABACO Y DE INDUCTORES DE RESISTENCIA SOBRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN JITOMATE .....	17
3.1. Resumen.....	17
3.2. Abstract.....	18
3.3. INTRODUCCIÓN .....	18
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.4.1. Diseño experimental y tratamientos.....	20
3.4.2. Muestras .....	21
3.4.3. Determinación enzimática.....	21
3.4.3.1 Polvo de acetona .....	21
3.4.3.2. Fenoles totales (FEN) .....	22
3.4.3.3. Peroxidasa (POX) .....	22
3.4.3.4. Polifenol oxidasa (PFO) .....	23
3.4.3.5. Ácido salicílico (AS) .....	23
3.4.4. Análisis estadístico .....	23
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
3.5.1. Desarrollo de la planta .....	24
3.5.2. Severidad.....	25
3.5.3. Fenoles totales.....	25
3.5.4. Ácido salicílico .....	27
3.5.5. Peroxidasa .....	29
3.5.6. Polifenol oxidasa .....	30
3.5.7. Análisis de correlaciones .....	32
3.6. CONCLUSIONES.....	34
3.7. BIBLIOGRAFÍA .....	35

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos, con los productos y dosis usados.....	20
<b>Cuadro 2.</b> Coeficientes de correlación (r) con significancia estadística entre variables. ....	33
<b>Cuadro 3.</b> Análisis de varianza del desarrollo de la planta.....	39
<b>Cuadro 4.</b> Análisis de varianzas de Fenoles totales (FEN) por fechas. ....	40
<b>Cuadro 5.</b> Análisis de varianzas de Ácido salicílico (AS) por fechas.....	41
<b>Cuadro 6.</b> Análisis de varianzas de Peroxidasa (POX) por fechas. ....	42
<b>Cuadro 7.</b> Análisis de varianzas de Polifenol oxidasa (PFO) por fechas. ....	43
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias por tratamiento del desarrollo de la planta con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). ....	44
<b>Cuadro 9.</b> Comparación de medias por tratamiento del contenido de Fenoles totales (FEN) con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). ....	44
<b>Cuadro 10.</b> Comparación de medias por tratamiento del contenido de Ácido salicílico (AS) con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). ....	45
<b>Cuadro 11.</b> Comparación de medias por tratamiento de la actividad de la Peroxidasa (POX) con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). ....	45
<b>Cuadro 12.</b> Comparación de medias por tratamiento de la actividad de la Polifenol oxidasa (PFO) con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). ....	46

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Contenido de fenoles totales promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada .....	26
<b>Figura 2</b> Contenido de ácido salicílico promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular. ....	28
<b>Figura 3</b> Actividad de POX promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular.....	30
<b>Figura 4</b> Actividad de PFO promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular.....	32
<b>Figura 5</b> Longitud promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular. ....	47
<b>Figura 6</b> Grosor de la base de tallo promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular. ....	47
<b>Figura 7</b> Numero de hojas verdaderas promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular. ....	48
<b>Figura 8</b> Grado de severidad promedio de los tratamientos inoculados con el virus TMV. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular. ....	48
<b>Figura 9</b> Análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.05$ ), 1: VirusStop® inoculada con TMV, 2: VirusStop® sin inocular, Actigard 50 GS® inoculada con TMV, 4: Actigard 50 GS® sin inocular, 5: SeaZyme® inoculada con TMV, 6: SeaZyme® sin inocular, 7: Ácido salicílico inoculada con TMV, 8: Ácido salicílico sin inocular. 9: Testigo inoculada con TMV, 10: Testigo sin inocular.....	49

## LISTA DE APENDICES

Apéndice 1. Análisis de varianzas. ....	39
Apéndice 2. Comparación de medias. ....	44

## DEDICATORIA

*A mi familia, por ser un pilar importante  
en mi formación, brindándome su cariño,  
apoyo moral y comprensión,  
durante todos estos años.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento proporcionado durante esta investigación.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado del departamento de Parasitología Agrícola.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por sus consejos, paciencia y su valioso aporte para desarrollar esta investigación. Así mismo al Dr. Camilo Hernández Juárez y Dr. Joel Pineda Pineda, por su apoyo, consejos y contribuciones para el término y mejora de este trabajo. Al M.C. Luis Emilio Castillo Márquez por su ayuda, paciencia y comprensión para resolver todas las dudas que surgieron de estadística.

Al Ing. Cecilio Bautista “Don Cecilio” por el apoyo y paciencia que me brindo al momento de explicarme los protocolos, para la determinación enzimática en el laboratorio, que, sin su ayuda este trabajo no habría concluido.

Al M.C. Antonio Segura Miranda y Maribel por el apoyo y consejos brindados durante la maestría.

A todos mis compañeros del posgrado, cada uno de ellos apporto algo diferente durante la maestría. Deseándoles éxito en todos sus proyectos personales y profesionales. A Diana, Iliana e Ivón que escucharon todas mis quejas y me daban consejos. A Gaby, Ana y Alejo, que se convirtieron en grandes amigos.

Y por último y no menos importante, a todos mis amigos que siempre me han apoyado en todos esos momentos importantes.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

### **Datos personales**

Nombre	José Eduardo Negrete Herrera
Fecha de nacimiento	16 Noviembre de 1992
Lugar de nacimiento	Puebla, Pue.
Cartilla militar	D-1267307
CURP	NEHE921116HPLGRD02
Cédula profesional	10630220

### **Desarrollo académico**

Preparatoria	Preparatoria Agrícola, UACH.
Licenciatura	Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola, UACH.

## RESUMEN GENERAL

Las plantas poseen mecanismos de respuesta al agobio abiótico y biótico, siendo capaces de contrarrestar, detener o disminuir sus efectos. Sin embargo, existen sustancias comerciales inductoras de resistencia. El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad y/o síntesis de algunos metabolitos en plantas de jitomate sanas o inoculadas con TMV expuestas o no a aplicaciones foliares de inductores de resistencia. Se tuvo un testigo sano y uno inoculado, ambos con aplicaciones de agua. Se realizó un muestreo previo a las aplicaciones y los siguientes muestreos se obtuvieron 15 días después de cada aplicación. Artigard 50GS® estimuló la actividad de la peroxidasa (POX) y de la polifenol oxidasa (PFO), tanto en planta sana como en inoculada, mientras que VirusStop® en planta inoculada promovió más actividad y/o síntesis de PFO con 4 aplicaciones, igual que el ácido salicílico exógeno (AS) con dos. La exposición al AS exógeno, 1µM, indujo más síntesis de AS endógeno y Seazyme® aumentó los fenoles (FEN), ambos con 4 aplicaciones, en plantas sanas. Se encontró en todos los tratamientos relación entre POX/PFO ( $r=1$ ), además solo Seazyme® con una aplicación en planta sana favoreció la interacción entre FEN/POX ( $r=0.97$ ) y FEN/PFO ( $r=0.97$ ). Se concluye que los inductores de resistencia si favorecieron la síntesis y/o actividad de enzimas de defensa, aunque con diferente modo de acción, independientemente de la presencia/ausencia del virus.

**Palabras clave:** *Solanum lycopersicum* L., fenoles totales, peroxidasa, polifenol oxidasa, ácido salicílico, TMV.

## GENERAL ABSTRACT

Plants have response mechanisms to abiotic and biotic stress, being capable of counteracting, stopping or reducing their effects. However, there are commercial resistance-inducing substances. The objective of this work was to determine the activity and/or synthesis of some metabolites in healthy tomato plants or inoculated with TMV exposed or not to foliar applications of resistance inducers. There was a healthy control and an inoculated one, both with water applications. A sampling was carried out prior to the applications and the following samples were obtained 15 days after each application. Artigard 50GS® stimulated the activity of peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PFO), both in healthy and inoculated plants, while VirusStop® in inoculated plants promoted more activity and/or synthesis of PFO with 4 applications, same as exogenous salicylic acid (SA) with two. Exposure to exogenous SA, 1 µM, induced more endogenous SA synthesis and Seazyme® increased phenols (FEN), both with 4 applications, in healthy plants. A relationship between POX/PFO ( $r = 1$ ) was found in all treatments, in addition only Seazyme® with an application in healthy plants favored the interaction between FEN/POX ( $r = 0.97$ ) and FEN/PFO ( $r = 0.97$ ). It is concluded that the resistance inducers did favor the synthesis and/or activity of defense enzymes, although with different modes of action, regardless of the presence/absence of the virus.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum* L., total phenols, peroxidase, polyphenol oxidase, salicylic acid, TMV.

# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más cultivadas a nivel mundial, en el 2019 la FAO (2021) reportó una producción anual de 180.7 millones de toneladas; siendo China el principal productor y consumidor, mientras que Estados Unidos fue el principal importador, así mismo, México fue el principal exportador con el 23 % del total, para este mismo en el 2018, el cultivo representó el segundo producto agropecuario más importante en exportaciones (FIRA, 2019), obteniendo un valor de 2,227 millones de dólares (Comtrade, 2021), representando una superficie cultivada de 47,372.94 ha y una producción de 3.44 millones de toneladas en 2019 (SIAP, 2020).

Debido a la expansión del comercio internacional, hay una constante demanda en el aumento de producción, así mismo hay un incremento de considerables plagas, que afectan el rendimiento y aumentan costos de producción (Blancard, 2011). Sin embargo, hay plagas como es el caso de los virus, que su manejo es difícil, debido a que estos son parásitos obligados, microscópicos que tienen la capacidad de producir varias enfermedades, dependiendo de la época de infección y pueden causar pérdidas de hasta el 100 % (Ramírez et al., 2010), además no existen viricidas en el mercado.

Las plantas poseen genes que codifican numerosas “armas químicas”, extremadamente eficientes, que constituyen mecanismos de defensa cuya activación las protege del ataque de microorganismos patógenos. Estos mecanismos involucran la participación de un gran número de pequeñas moléculas exógenas, denominadas inductores de resistencia, capaces de activar los mecanismos (Gómez y Reis, 2011), sustancias que pueden provenir de un amplio rango de compuestos bióticos y abióticos (Walters et al., 2014).

Los conocimientos sobre los inductores de resistencia han tenido un gran auge en los últimos años, incorporando conceptos nuevos de manejo de cultivos, en búsqueda de una agricultura más sustentable, siendo indispensable investigar

métodos opcionales de control de plagas, que sean al mismo tiempo eficientes y menos agresivos a la salud humana y a la ecología.

### **1.1. Objetivo general**

Conocer el efecto de diferentes inductores de resistencia sobre el desarrollo y algunos metabolitos de defensa en jitomate con y sin el virus mosaico del tabaco (TMV).

#### **1.1.1. Objetivos particulares**

- Evaluar los efectos que tienen los diferentes inductores de resistencia en el desarrollo de las plantas sanas e inoculadas con TMV.
- Determinar la actividad enzimática al usar los inductores de resistencia en plantas sanas e inoculadas con TMV.
- Conocer la correlación que existe en el desarrollo de la planta y la actividad enzimática con el uso de inductores de resistencia en plantas sanas e inoculadas con TMV.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

Uno de los principales desafíos actuales es el rápido crecimiento de la población lo que ha generado la necesidad de satisfacer la creciente demanda de alimentos, esto requiere del uso de estrategias agrícolas sostenibles en la producción de cultivos. Sin embargo, las enfermedades de las plantas ocasionadas por diversos organismos (hongos, bacterias, virus y nematodos) desafían continuamente la producción, afectando desde la etapa de siembra, la cosecha y almacenamiento de los productos (Doughari, 2015). Para sobrevivir a estos efectos nocivos las plantas de manera natural poseen una gran cantidad de defensas y han desarrollado múltiples mecanismos de defensa mediante los cuales pueden hacer frente a varios tipos de estrés biótico y abiótico (Ballhorn et al., 2009). La planta tiene una serie de interconexiones entre vías de respuesta de señalización distintas y opuestas para la defensa contra patógenos, herbívoros e insectos y también parece haber múltiples vías de respuesta invocadas, dependiendo del contexto de estrés específico (Kusnierczyk et al., 2007). Existen varios modos de defensa que incluyen la construcción de barreras poliméricas para impedir la penetración de patógenos y la síntesis de enzimas que degradan la pared celular del patógeno (Hammond et al., 1996). Además, las plantas emplean sistemas específicos de reconocimiento y señalización que permiten la detección rápida de la invasión de patógenos y el inicio de respuestas defensivas vigorosas.

### 2.1. Interacción planta-patógeno

Las plantas relacionan con diferentes condiciones abióticas y bióticas, tanto en entornos naturales como en sistemas de producción, entre las interacciones que destacan son con agentes patogénicos que tienen la capacidad de producir anomalías, llamadas enfermedades. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa (Madriz, 2002). Ante la combinación de interacciones entre una planta y un agente, las plantas presentan una amplia flexibilidad de respuestas frente a

benéficos y patogénicos (Verhagen et al., 2004; Ramírez y Rodríguez, 2012). Para que una enfermedad ocurra, la planta debe ser un hospedero susceptible y compatible con el patógeno, además de que las condiciones ambientales le deben favorecer e incluso la interacción del hombre es factor, es decir el éxito de la interacción debe tener cuatro componentes: patógenos, hospedero, medio ambiente y la intervención del hombre (Moschini, 2006). Para el caso del hospedero, la enfermedad se presenta cuando sus mecanismos de defensa no son suficientes para verificar la entrada del patógeno, el patógeno evita la activación oportuna del sistema de defensa activo de la planta ya sea en tejido vegetal o defensa por respuesta metabólica, el factor ambiental favorable, es requerido para el patógeno y el entorno desfavorable para el hospedero (Surico, 2013). El hombre interviene en los otros factores (Moschini, 2006). De lo contrario, incluso la planta más susceptible expuesta a grandes cantidades de patógeno no desarrollará enfermedad (Surico, 2013). El potencial de cualquier fitopatógeno para causar enfermedad también depende de la presencia o ausencia de factores de reconocimiento, receptores del hospedero, sitios para toxinas y disponibilidad de nutrientes esenciales y crecimiento (Anderson et al., 2010). El primer paso en el proceso de infección es la comunicación de célula a célula entre el hospedero y el patógeno. Las especies o variedades de plantas no pueden ser infectadas por un patógeno si sus células superficiales carecen de reconocimiento específico (enzimas o estructuras), si este no reconoce a la planta como anfitrión, puede que no se adhiera a la superficie del hospedero o que no produzca infección (Van Baarlen et al., 2007).

### **2.1.1. Interacción planta-virus**

Los virus de plantas son agentes infecciosos, submicroscópicos, constituidos por uno o más ácidos nucleicos, encapsulados por proteínas o lipoproteínas, llamado cápside, que se replican exclusivamente en células vivas, utilizando la energía y proteínas de la célula hospedera, transmitidos mecánicamente y por vectores (Matthews, 2012). En cada etapa del ciclo viral se forman diferentes interacciones entre planta y virus. La planta puede desconocer las partículas virales siendo

favorable para el virus, originando una reacción de compatibilidad, siendo lo contrario sí se reconoce al virus, en esta condición, se desencadena una respuesta de defensa, que, puede limitar la replicación y el movimiento del virus, restringiéndolo al sitio de infección (Hammond y Jones, 2000). Cuando el virus logra la infección después de entrar a la célula y replicarse, se mueve localmente de una célula a otra y sistemáticamente a otros órganos y tejidos por vía del sistema vascular de la planta (Ivanov et al., 2014).

## **2.2. Mecanismos de defensa de la planta**

Los mecanismos de defensa, que se activan como resultado al ataque de agentes, siendo los que proveen la resistencia, actuando en conjunto para contener el avance del patógeno. Actuando principalmente en la muerte celular programada, la acumulación de metabolitos secundarios y la deposición de sustancias, entre otros (Madriz, 2002). El inicio de la producción de defensa frente a un potencial ataque de un patógeno, requiere de un diálogo molecular entre los organismos involucrados (Gust et al., 2012). La respuesta de protección, inicia por un reconocimiento gen-gen, que limita la replicación y puede estar acompañada por la producción de ROS (Reactive oxygen species), fundamental para la respuesta de hipersensible (HR), dando paso a la programación de muerte celular, que impide su movimiento. Esta resistencia dada por genes R está asociada con la activación de la señalización del RSA (resistencia sistémica adquirida) que reconoce la expresión de proteínas relacionadas con patogénesis (Glazebrook, 2005). La RSA es la defensa que se induce contra una amplia gama de patógenos, ocurriendo en segmentos de la planta distantes y libres de patógenos, posteriormente de una inoculación primaria (Attila, 2018). Sin embargo existe otra línea de defensa, la resistencia sistémica inducida (RSI), teniendo un extenso espectro de efectividad (Howe, 2004), inducida por organismos patógenos y benéficos (Vlot et al., 2008), esta defensa es mediada por rutas metabólicas sensibles al ácido jasmónico y etileno, siendo independientes de la expresión de las proteínas de patogenicidad y del ácido salicílico (Pieterse y Van Loon, 1999).

### **2.3. Metabolitos secundarios**

Los organismos producen una gran cantidad y complejidad de compuestos orgánicos, necesarios para su funcionamiento, llamados metabolitos primarios, sin embargo, en el reino vegetal se destina energía y recursos en producir otras moléculas que no tienen función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, síntesis de proteínas, entre otros procesos primarios, conocidos como metabolitos secundarios (García y Carril, 2011). Recientemente de estos, se ha descubierto que poseen diferentes funciones, entre la que destaca, la protección del ataque de diferentes agentes bióticos y abióticos (Taiz y Zeiger, 2006). Los metabolitos secundarios se dividen químicamente en cuatro principales grupos: terpenos, fenoles, compuestos que contienen nitrógeno y azufre, siendo su participación en diferentes rutas metabólicas que intervienen en los mecanismos de defensa.

#### **2.3.1. Terpenos**

Constituyen el grupo más amplio de metabolitos secundarios y están unidos por su origen común a partir de acetil-CoA reductasa o intermedios glicolíticos (Katagiri y Tsuda, 2010). Estos compuestos dan lugar a metabolitos primarios y secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas, se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico y la ruta del metileritritol fosfato (García y Carril, 2011). Los secundarios se presume que están relacionados a los mecanismos de defensa, como, toxinas y sustancias de persuasión alimenticia contra un amplio grupo de animales (Katagiri y Tsuda, 2010). Sin embargo, los primarios constituyen o forman parte de: hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), fotosíntesis (carotenoides, clorofilas y plastoquinonas), la respiración (ubiquinonas) y estructuras de membranas (esteroles) (García y Carril, 2011). El aceite esencial de *Satureja montana*, que contiene monoterpenos, fue aplicado en plantas inoculadas con virus, resultando en la disminución de lesiones locales (Dunkić, 2010).

### **2.3.2. Fenoles**

Los compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides son derivados del fenol, conformados por anillos aromáticos con grupos hidroxilo (García y Carril, 2011). En condiciones de estrés biótico, se producen los fenoles, funcionando como defensa química y de señalización (Leiss et al., 2010). Estos son sintetizados por dos vías: la del ácido malónico y del ácido shikímico, favoreciendo una alta actividad antioxidante, la primer vía es la principal para hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores, mientras que la segunda vía es responsable de la biosíntesis de la mayoría de fenoles en plantas (Taiz y Zaiger, 2006). Los principales compuestos fenólicos derivan de la fenilamina, que al ser degradada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) produce el ácido cinámico. Básicamente la canalización es la adición de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes, dando paso a diferentes compuestos que a su vez son precursores de moléculas más complejas como la cumarina, lignina, taninos y flavonoides (García y Carril, 2011). Compuestos fenólicos extraídos de *Cassia siamea*, se han usado como inhibidores de TMV, teniendo resultados promotores (Li et al., 2015).

#### **2.3.2.1. Cumarina**

Son compuestos simples derivados de la ruta del ácido shikímico, sintetizados en plantas vasculares, se especula que interviene en diversos mecanismos de defensas, contra insectos y microorganismos (Brooker et al., 2008). Un ejemplo es la psoralina, una furacoumarina lineal básica, se reconoce su uso en la defensa contra ciertos hongos (Ali et al., 2008). Sin embargo en este grupo se encuentra la aflatoxina, posiblemente el carcinogénico más potente de las toxinas naturales, producida por algunos hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, que contaminan diferentes alimentos (García y Carril, 2011). Se han extraído diferentes cumarinas de *Nicotiana tabacum* y probadas como inhibidoras de TMV, teniendo resultados prometedores (Liu et al., 2016).

#### **2.3.2.2. Lignina**

Es un polímero altamente ramificado de grupos fenilpropanoides, siendo el compuesto más abundante después de la celulosa en plantas. Su principal función es estructural, ya que, proporciona rigidez y dureza, es encontrada en la pared secundaria, fortaleciendo tallos y tejidos vasculares, dando paso al crecimiento vertical, al flujo de agua y nutrientes a través del xilema. Siendo creado a partir de tres alcoholes, el coniferilo, cumarilo y sinapilo, que se oxida a radicales libres (ROS) (García y Carril, 2011). Se ha encontrado que las lignificaciones bloquean el desarrollo de algunos patógenos, por lo que es una respuesta frecuente a infecciones o heridas (Mazid, 2011). El uso de un nuevo elicitor, provocó el aumento de la concentración de lignina y otros metabolitos, cuando fue aplicado en plantas inoculadas con TMV, provocando una disminución en los síntomas y en las lesiones locales (Zhang et al., 2011).

#### **2.3.2.3. Taninos**

Son fenoles poliméricos, que tienen la función de desnaturalizar proteínas. Catalogados en taninos condensados e hidrolizables. Generalmente son toxinas debido a su capacidad de unirse a proteínas (García y Carril, 2011). Por lo general son toxinas, que repercuten en el desarrollo y sobrevivencia de herbívoros, asimismo son repelentes de alimentación para una variedad extensa de animales (Mazid, 2011).

#### **2.3.2.4. Flavonoides**

De la gran variedad de compuestos fenólicos, destacan los flavonoides, que tienen como estructura 15 carbonos, dispuestos en anillos aromáticos, enlazados por un puente de tres carbonos. Clasificados en base a su grado de oxidación del enlace de carbono, originando las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas (García y Carril, 2011). Entre sus funciones destacan la pigmentación y defensa. En el caso de las flavonas y flavonoles, protegen las células de radiación UV, acumulándose en la epidermis, absorbiendo el espectro de luz ultra violeta (Lake et al., 2009). Entre la ruta de biosíntesis de los flavonoides, la enzima estibeno sintetasa da paso a la formación de compuestos de estibeno, que participan en los mecanismos de defensa contra patógenos

(García y Carril, 2011). Los isoflavonoides se encuentran en toda la planta, participando en su desarrollo y en la activación de sus defensas. Un claro ejemplo de su participación es en las leguminosas, promoviendo la formación de la simbiosis con bacterias del genero *Rhizobium*, fijadoras naturales de nitrógeno (Sreevidya et al., 2006). Flavonoides extraídos de la corteza de *Fístula cassia*, demostraron tener efectos anti-TMV, teniendo una tasa de inhibición mejor que productos comerciales (Zhao et al., 2013).

#### **2.3.2.5. Derivados del ácido benzoico**

Los derivados del ácido benzoico están dentro de los compuestos fenólicos, que poseen fenilpropanoides, que han perdido un segmento de dos carbonos. En este grupo se puede encontrar la vainillina y el ácido salicílico (AS), este último, funge como regulador de crecimiento (García y Carril, 2011). El AS es primordial en los procesos de la RSI, así como en HR. Se ha demostrado su participación en la defensa contra patógenos y en la fabricación de las proteínas relacionadas a la patogenicidad (Rangel et al., 2010). El uso de AS (exógeno) en cultivos de tejidos de papa infectados por el Virus Y de la Papa (PVY) y el Virus del Enrollamiento de las Hojas de la Papa (PLRV), tuvieron una mayor tasa de supervivencia, además de tener mayor éxito en quedar libres de virus después de la termoterapia de las que no fueron tratadas con AS (Pasayo y Huarte, 2011).

#### **2.3.3. Metabolitos secundarios que contienen azufre**

Algunos metabolitos que se les tienen relacionados directamente o indirectamente con la activación de las defensas de las plantas contra patógenos, son el glutatión reducido (GSH), glucosinolatos (GSL), fitoalexinas, tioninas, defensinas y alina. Inclusive se cree que tienen relación con la RSI (Mazid, 2011).

#### **2.3.4. Metabolitos secundarios que contiene nitrógeno**

Esta clase de metabolitos están sintetizados a partir de aminoácidos comunes, aquí se encuentran alcaloides, glucósidos cianogénicos y aminoácidos no proteicos. Tienen su importancia debido a que proporcionan una defensa contra

herbívoros, además, algunos de ellos son tóxicos para los humanos (Mazid, 2011).

#### **2.4. Inductores de resistencia**

Son sustancias que actúan sobre las plantas activando diferentes mecanismos de defensa, impidiendo o retrasando el desarrollo de plagas, sin tener efecto directo sobre estas (Kuč, 2001). Se puede inducir las defensas de una planta, por el uso directo o indirecto de un amplio rango de compuestos bióticos y abióticos (Da Rocha y Hammerschmidt, 2005; Walters, Ratsep y Havis, 2014). Dentro de los bióticos podemos encontrar a virus, bacterias, levaduras y hongos (Punja y Utkhede, 2003), proporcionando la inmunización de la planta, en algunos casos y en otros, son promotoras del desarrollo de la planta y la disminución de síntomas (Ryu et al., 2004). En el caso de los compuestos abióticos, se incluyen sustancias sintéticas o de origen natural, como es el caso del ácido salicílico, el acibenzolar-s-metil, extractos de algas, entre otras sustancias, que activan la señalización de los mecanismos de defensa o son precursores del algún metabolito secundario (Walters et al., 2014).

#### **2.5. Literatura citada**

Ali S. T., Mahmooduzzafar-Abdin M. Z., Iqbal M. (2008). Ontogenetic changes in foliar features and psoralen content of *Psoralea corylifolia* Linn. Exposed to SO<sub>2</sub> stress. *Journal of Environmental Biology*, 29(5): 661-668.

Anderson, J. P., Gleason, C. A., Foley, R. C., Thrall, P. H., Burdon, J. B., & Singh, K. B. (2010). Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. *Functional plant biology*, 37(6), 499-512.

Ádám, A. L., Nagy, Z. Á., Kátay, G., Mergenthaler, E., & Viczián, O. (2018). Signals of systemic immunity in plants: progress and open questions. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1146.

- Ballhorn D. J., Kautz S., Heil M., Hegeman A. D. (2009). Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature. *Plant Signaling and Behavior*, 4(8): 735-745
- Blancard, D. (2011). Enfermedades del tomate. Identificar, conocer, controlar. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 212 p.
- Brooker N., Windorski J., Blumi E. (2008). Halogenated coumarins derivatives as novel seed protectants. *Communication in Agriculture and Applied Biological Sciences*, 73(2): 81-89.
- Comtrade. (2021, 22 de marzo). United Nations Comtrade Database – International Trade Statistics. Import/Export Data. Recuperado de <https://comtrade.un.org/data>
- Da Rocha, A. B. y Hammerschmidt, R. (2005). History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HorTechnology* (15), 518-528.
- Doughari, J. (2015). An overview of plant immunity. *J. Plant Pathol. Microbiol*, 6(11), 10-4172.
- Dunkić, V., Bezić, N., Vuko, E., & Cukrov, D. (2010). Antiphytoviral activity of *Satureja montana* L. ssp. *variegata* (Host) PW Ball essential oil and phenol compounds on CMV and TMV. *Molecules*, 15(10), 6713-6721.
- FAO. (2021, 14 de mayo). Organización de las naciones unidad para la alimentación y agricultura (FAO). FAOSTAT. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- FIRA. (2019). *Panorama Agroalimentario. Tomate Rojo*. México: Autor. Recuperado de <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2019/06/Panorama-Agroalimentario-Tomate-rojo-2019.pdf>
- García, A. Á., y Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).

- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227.
- Gómez, D. E., y Reis, E. M. (2011). Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Química viva*, 10(1), 6-17.
- Gust A., Willmann R., Desaki Y., Grabherr H.M., Nürnberger T. (2012). Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in Plant Science*. (In press).
- Hammond-Kosack K. E. y Jones J. D. G. (1996). Resistance gene dependent plant defence responses. *Plant Cell*, 8: 1773-1791.
- Buchanan, B. B. (2000). In BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds. *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1366.
- Howe, G. A. (2004). Jasmonates as signals in the wound response. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(3), 223-237.
- Ivanov K. I., Eskelin K., Lohmus A. y Makinen K. (2014). Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J Gen Virol* 95, 1415-1429. DOI: 10.1099/ vir.0.064220-0
- Katagiri, F., & Tsuda, K. (2010). Understanding the plant immune system. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(12), 1531-1536.
- Kuč J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application. *European Journal of Plant Pathology* 107: 7-12.
- Kusnieczyk A., Winge P., Midelfart H., Armbruster W. S., Rossiter J. T., Bones A. M. (2007). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with different glucosinolate profiles after attack by polyphagous *myzus persicae* and oligophagous *Brevicoryne brassicae*. *Journal of Experimental Botany*, 58(10): 2537-2552.

- Lake J. A., Field K. J., Davey M. P., Beerling D. J., Lomax B. H. (2009). Metabolomic and physiological responses reveal multi-phasic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to chronic UV radiation. *Plant, cell & environment*, 32(10): 1377-1389.
- Leiss, K. A., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Klinkhamer, P. G. (2011). An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10(2), 205-216.
- Li, Y. K., Zhou, B., Wu, X. X., Du, G., Ye, Y., Gao, X. M., & Hu, Q. F. (2015). Phenolic compounds from *Cassia siamea* and their anti-tobacco mosaic virus activity. *Chemistry of natural compounds*, 51(1), 50-53.
- Liu, C. B., Shen, Q. P., Wang, Y., Zhang, F. M., He, P., Si, X. X., ... & Liu, Z. H. (2016). Coumarins from the leaves of *Nicotiana tabacum* and their anti-tobacco mosaic virus activities. *Chemistry of Natural Compounds*, 52(6), 992-995.
- Madriz O. K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Mechanisms of defense in plant-pathology interactions. *Manejo Integrado de Plagas (CATIE)(no. 63) p. 22-32.*
- Matthews, R. E. F. (2012). *Plant virology* (3.<sup>a</sup> ed.) [Libro electrónico]. Academia Press.  
[https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=E\\_RYI9F3YB4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Matthews,+R.+C.+\(2012\).+Plant+virology.+Elsevier.+&ots=hQ-LIznGRm&sig=-CxgwYJRAVRCTv9sRHpkZaysjE#v=onepage&q=Matthews%2C%20R.%20C.%20\(2012\).%20Plant%20virology.%20Elsevier.&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=E_RYI9F3YB4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Matthews,+R.+C.+(2012).+Plant+virology.+Elsevier.+&ots=hQ-LIznGRm&sig=-CxgwYJRAVRCTv9sRHpkZaysjE#v=onepage&q=Matthews%2C%20R.%20C.%20(2012).%20Plant%20virology.%20Elsevier.&f=false)
- Mazid M., Khan T. A., Mohammad F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3 (2) Special Issue: 232-249.

- Moschini, R. C. (2006). En: Redes de estaciones meteorológicas automáticas y sus aplicaciones productivas. *Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, (145).
- Pasayo, R. G., & Huarte, M. (2011). Efecto del ácido salicílico en la eliminación de PLRV y PVY en plantas de papa. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 16(1), 58-67.
- Pieterse C. M. J. y Van Loon L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4:52-58.
- Punja Z. K. y Utkhede R. S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* (21), 400-407.
- Ramírez G. M. y Rodríguez A. 2012. Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrízica: una revisión. *Rev. Colomb. Biotecnol* (14): 271-284.
- Ramírez E. R. G., Gómez E. H., Gómez R. C., Madrigal R. Q., Cantú D. H. N., y Ruiz, I. D. F. (2010). Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades del jitomate en Chiapas, (145).
- Sánchez, G. R., Mercado, E. C., Peña, E. B., de la Cruz, H. R., & Pineda, E. G. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, 12(2), 90-95.
- Ryu C. M., Murphy J. F., Mysore K. S. y Kloepper J. W. (2004). Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *Plant J.* (39), 381-392.
- SIAP. (2020, 2 de diciembre). Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP), SADER. Sistema de información agroalimentaria de consulta (SIACON). Recuperado de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sreevidya V. S., Srinivasa R. C., Rao C., Sullia S. B., Ladha J. K., Reddy P. M. (2006). Metabolic engineering of rice with soyabean isoflavone synthase

- for promoting nodulation gene expression in rhizobia. *Journal of Experimental Botany*, 57(9): 1957-1969.
- Surico G. (2013). The concepts of plant pathogenicity, virulence/avirulence and effector proteins by a teacher of plant pathology. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 399-417.
- Taiz L. y Zeiger E. (2006). Metabolitos secundarios y defensa de las plantas. In: Fisiología vegetal. L. Taiz and E. Zeiger (eds). Universitat Jaume I. D. L. pp. 530-580.
- Van Baarlen, P., Van Belkum, A., Summerbell, R. C., Crous, P. W., & Thomma, B. P. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps?. *FEMS microbiology reviews*, 31(3), 239-277.
- Verhagen B., Glazebrook J., Zhu T., Chang H., Van Loon L., Pieterse C. (2004). The transcriptome of rhizobacteria induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact.* 17: 895-908.
- Vlot A. C., Liu P. P., Cameron R. K., Park S. W., Yang Y., Kumar D., Zhou F., Padukkavidana T., Gustafsoon C., Pichersky E. & Klessig D. F. (2008). Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 56(3), 445-456.
- Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of experimental botany*, 64(5), 1263-1280.
- Zhang, W., Yang, X., Qiu, D., Guo, L., Zeng, H., Mao, J., & Gao, Q. (2011). PeaT1-induced systemic acquired resistance in tobacco follows salicylic acid-dependent pathway. *Molecular biology reports*, 38(4), 2549-2556.

Zhao, W., Zeng, X., Zhang, T., Wang, L., Yang, G., Chen, Y. K., & Miao, M. (2013).  
Flavonoids from the bark and stems of *Cassia fistula* and their anti-tobacco  
mosaic virus activities. *Phytochemistry letters*, 6(2), 179-182.

# EFFECTOS DEL VIRUS MOSAICO DEL TABACO Y DE INDUCTORES DE RESISTENCIA SOBRE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN JITOMATE

## EFFECTS OF TOBACCO MOSAIC VIRUS AND RESISTANCE INDUCTORS ON ENZYMATIC ACTIVITY IN TOMATO

José Eduardo Negrete-Herrera<sup>1</sup>, Héctor Lozoya-Saldaña<sup>2</sup>, Camilo Hernández-Juárez<sup>1</sup>, Joel Pineda-Pineda<sup>3</sup>, Luis Emilio Castillo-Márquez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Parasitología Agrícola, <sup>2</sup> Departamento de Fitotecnia, <sup>3</sup> Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5 Chapingo Edo. de México. CP 56230.

### Resumen

Las plantas poseen mecanismos de respuesta al agobio abiótico y biótico, siendo capaces de contrarrestar, detener o disminuir sus efectos. Sin embargo, existen sustancias comerciales inductoras de resistencia. El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad y/o síntesis de algunos metabolitos en plantas de jitomate sanas o inoculadas con TMV expuestas o no a aplicaciones foliares de inductores de resistencia. Se tuvo un testigo sano y uno inoculado, ambos con aplicaciones de agua. Se realizó un muestreo previo a las aplicaciones y los siguientes muestreos se obtuvieron 15 días después de cada aplicación. Artigard 50GS® estimuló la actividad de la peroxidasa (POX) y de la polifenol oxidasa (PFO), tanto en planta sana como en inoculada, mientras que VirusStop® en planta inoculada promovió más actividad y/o síntesis de PFO con 4 aplicaciones, igual que el ácido salicílico exógeno (AS) con dos. La exposición al AS exógeno, 1µM, indujo más síntesis de AS endógeno y Seazyme® aumentó los fenoles (FEN), ambos con 4 aplicaciones, en plantas sanas. Se encontró en todos los tratamientos relación entre POX/PFO ( $r=1$ ), además solo Seazyme® con una aplicación en planta sana favoreció la interacción entre FEN/POX ( $r=0.97$ ) y FEN/PFO ( $r=0.97$ ). Se concluye que los inductores de resistencia si favorecieron la síntesis y/o actividad de enzimas de defensa, aunque con diferente modo de acción, independientemente de la presencia/ausencia del virus.

**Palabras clave:** *Solanum lycopersicum* L., fenoles totales, peroxidasa, polifenol oxidasa, ácido salicílico, TMV.

## Abstract

Plants have response mechanisms to abiotic and biotic stress, being capable of counteracting, stopping or reducing their effects. However, there are commercial resistance-inducing substances. The objective of this work was to determine the activity and/or synthesis of some metabolites in healthy tomato plants or inoculated with TMV exposed or not to foliar applications of resistance inducers. There was a healthy control and an inoculated one, both with water applications. A sampling was carried out prior to the applications and the following samples were obtained 15 days after each application. Artigard 50GS® stimulated the activity of peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PFO), both in healthy and inoculated plants, while VirusStop® in inoculated plants promoted more activity and/or synthesis of PFO with 4 applications, same as exogenous salicylic acid (SA) with two. Exposure to exogenous SA, 1  $\mu$ M, induced more endogenous SA synthesis and Seazyme® increased phenols (FEN), both with 4 applications, in healthy plants. A relationship between POX/PFO ( $r = 1$ ) was found in all treatments, in addition only Seazyme® with an application in healthy plants favored the interaction between FEN/POX ( $r = 0.97$ ) and FEN/PFO ( $r = 0.97$ ). It is concluded that the resistance inducers did favor the synthesis and/or activity of defense enzymes, although with different modes of action, regardless of the presence/absence of the virus.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum L.*, total phenols, peroxidase, polyphenol oxidase, salicylic acid, TMV.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas de manera natural poseen diversas estrategias de protección, desarrollado múltiples mecanismos de defensa, mediante los cuales pueden hacer frente a varios tipos de estrés biótico y abiótico (Ballhorn et al., 2009). Estos mecanismos involucran la participación de un gran número de pequeñas moléculas exógenas, denominadas inductores de resistencia (Gómez y Reis, 2011). Se pueden clasificar como compuestos

bióticos y abióticos, estos últimos, incluyen sustancias sintéticas o de origen natural, como es el caso del ácido salicílico, el acibenzolar-s-metil, extractos de algas, aminoácidos, terpenoides, entre otras sustancias, que activan la señalización de los mecanismos de defensa o son precursores de algún metabolito secundario (Walters et al., 2014). Asimismo, los metabolitos secundarios poseen diferentes funciones, entre la que destaca, la protección del ataque de diferentes agentes patogénicos (Taiz y Zeiger, 2006). Los fenoles (FEN), funcionan como defensa química y de señalización, siendo parte de la pared celular y precursor de la lignina (Leiss et al., 2010). La polifenol oxidasa (PFO), es un grupo de enzimas catalizadoras de moléculas que participa en el pardeamiento vegetal, además tiene efectos tóxicos para ciertos organismos, así mismo pueden estar involucradas en la síntesis de fenoles y precursores de la lignina, participando en la activación de mecanismos de defensas (Mayorga e Higuera, 2007). El incremento en la actividad de la peroxidasa (POX), tiene una correlación con la resistencia de las plantas contra diferentes agentes (Lovrekovich et al., 1968; Ye et al., 1990). Se ha demostrado la participación del Ácido salicílico (AS) en la defensa contra patógenos y en la fabricación de las proteínas relacionadas a la patogenicidad (Rangel et al., 2010). El virus mosaico de tabaco (TMV) al infectar jitomate, generalmente presenta síntomas externos de mosaicos y clorosis, ya que son afectados los cloroplastos y la expresión de genes responsables de estos (Abdelkhalek et al., 2019). Se han realizado estudios donde el uso de sustancias promueve la activación de defensa, disminuyendo o deteniendo los síntomas causados por virus, Trejo et al. (2013) utilizaron Benzothiadiazole, para disminuir los efectos causados por el virus mosaico dorado del chile (PepGMV) en el cultivo de chile, Lee y Ryu (2016) asperjaron en hojas de chile, *Bacillus amyloliquefaciens*, activando mecanismos para protegerse del virus mosaico

del pepino (CMV) y Santiago et al. (2020) evaluaron diferentes productos, que disminuyeron los síntomas de TMV en jitomate. Con base a los antecedentes descritos, el objetivo general de este estudio fue, cuantificar los efectos del virus mosaico del tabaco y de inductores de resistencia sobre actividad enzimática en jitomate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental y tratamientos

Bajo condiciones de invernadero, plántulas de jitomate, cv. Rio Grande se inocularon mecánicamente con el virus mosaico del tabaco siete días después del trasplante (aprox. 15 cm de altura), macerando 1 g de tejido enfermo con solución amortiguadora de fosfato (pH: 7) a una proporción 1:10, y a los 3, 17, 31 y 45 días posteriores a la inoculación, se hicieron aspersiones foliares de diversos productos inductores de resistencia (Cuadro 1), en un diseño completamente al azar (diez tratamientos con cuatro repeticiones)

**Cuadro 1.** Tratamientos, con los productos y dosis usados.

	Tratamientos	Ingrediente activo	Dosis
1	VirusStop® V	Aminoácidos y	1 ml/L H <sub>2</sub> O
2	VirusStop® SV	Terpenoides	
3	Actigard 50 GS® V	Acibenzolar-s-metil	0.25 g/L H <sub>2</sub> O
4	Actigard 50 GS® SV		
5	SeaZyme® V	Extracto de <i>Ascophyllum nodosum</i> + nutrientes	3.75 ml/L H <sub>2</sub> O
6	SeaZyme® SV		

<b>7</b>	Ácido salicílico V	Ac. Salicílico	0.001 mmol/L
<b>8</b>	Ácido salicílico SV		H <sub>2</sub> O
<b>9</b>	Testigo V	Sin producto -	-
<b>10</b>	Testigo SV		

V: inoculada con VMT, SV: sin inocular.

## Muestreos

El primer muestreo se obtuvo antes de la inoculación del virus, posteriormente se obtuvieron muestras de cada tratamiento a los 17, 31, 45 y 59 días después de la inoculación, cada muestra se conformó por una planta y a su vez transportada en hielo, para ser guardada a -20 °C, en el laboratorio de usos múltiples del departamento de fitotecnia, hasta su posterior análisis. Se tomó la altura y grosor del tallo y número de hojas dos veces por semana durante todo el experimento. Respecto a los síntomas, se usó la escala de severidad del 0 al 4, utilizada en el por Pérez et al. (2010), donde: 0= plantas sanas, sin ningún síntoma aparente, 1= síntomas ligeros, mosaicos y enchinamientos ligeros, 2= regulares, síntomas fuertes de virosis y enchinamiento, 3=fuertes, reducción foliar y de altura y porte endeble, 4=intensos, necrosis y/o muerte de planta.

## Determinación enzimática

### Polvo de acetona

Utilizando la metodología propuesta por Alia-Tejacal et al. (2003) se procesó el tejido vegetal con acetona a 4 °C, licuando por 30 segundos y filtrando al vacío, adaptando la cantidad utilizada de acetona al peso fresco de cada muestra, obteniendo un extracto y

polvo de acetona, se repitió el proceso hasta obtener un polvo blanco, este se dejó secar a temperatura ambiente, siendo pesado y guardado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente ser utilizado en la determinación de peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PFO); en el caso del extracto de acetona se guardó en refrigeración utilizándolo para determinar los fenoles totales (FEN).

### **Fenoles totales (FEN)**

Se midió el volumen del extracto de acetona y adaptando el protocolo Folin-Ciocalteu descrito por Waterman y Mole en 1994, se determinó la concentración. En tubos de fondo plano se le adicionó 200  $\mu\text{L}$  de extracto de acetona de las muestras y se completó a 4 mL de agua destilada. A continuación, se le agregaron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu, seguido se agitó y reposó durante 8 minutos, pasado el tiempo se le incorporó 750  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 %, dejando la mezcla en obscuridad por una hora. Concluyendo el tiempo se tomó la lectura de absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (marca).

### **Peroxidasa (POX)**

En seguimiento al método descrito por Flukey y Jen (1978), se determinó la actividad enzimática para la POX. Se pesaron 50 mg de polvo de acetona en tubos de fondo plano, a estos se le agregó 5 mL de Tris-HCL (pH 7.1) + Polivinilpirrolidona (PVP) al 1 %, homogenizando la mezcla en frío durante 30 segundos, seguido se centrifugó a 16000 rpm por 30 minutos a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En una celda de cuarzo se adicionó 2.6 mL de TRIS-HCL (0.1 M, pH 7.1) + 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno al 0.25 % + 250  $\mu\text{L}$  de gualcol 0.1 M + 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de muestra a temperatura ambiente, continuado se mezcló por inmersión y seguido se tomó lecturas de cambio de absorbancia a los 30, 60, 90 y 120

segundos en un espectrofotómetro a 470 nm y usando como blanco TRIS-HCL (0.1 M, pH7.1).

### **Polifenol oxidasa (PFO)**

Con base al método descrito por Laminkara (1995), se determinó la actividad enzimática de la PFO. Pesando 50 mg de polvo de acetona en tubos de fondo plano, a estos se le adiciono 5 mL de Tris-HCL (pH 7.1) + Polivinilpirrolidona (PVP) al 1 %, homogenizando la mezcla en frio durante 30 segundos. Se decantó en tubos aptos para ser centrifugados a 16000 rpm por 30 minutos a 5 °C. En una celda de cuarzo se hizo una mezcla de 2.8 mL de catechol (60 mM) + 200 µL del sobrenadante de muestra a temperatura ambiente, continuado se mezcló por inmersión y se tomó lectura de cambio de absorbancia a los 10, 20, 30 y 60 segundos en un espectrofotómetro a 420 nm, se usó como blanco TRIS-HCL (0.1 M, pH7.1).

### **Ácido salicílico (AS)**

Empleando el método descrito por Warriar et al. (2013), se determinó la concentración de AS. En tubos de fondo plano, se pesó por muestra 5 mg de hoja, después se le adiciono 5 mL de agua bidestilada, homogenizando la mezcla por 30 segundos, posteriormente se centrifugo a 10,000 rpm por 15 minutos a 15 °C. Pasado el tiempo, en tubos de fondo plano se hizo una mezcla de 3.9 mL de FeCl<sub>3</sub> al 0.1 % recién preparado + 100 µL de sobrenadante de muestra, seguido se tomó lectura a 540 nm en un espectrofotómetro, utilizando agua bidestilada como blanco.

### **Análisis estadístico**

Se realizó el análisis con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System), donde se obtuvo el análisis de varianzas y comparaciones de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), para las variables altura, grosor de tallo y número de hojas. La actividad enzimática se analizó por fecha y tratamiento. Para el grado de severidad se realizó un análisis no paramétrico. Finalmente, se realizó un análisis de correlación general para conocer la relación de las respuestas de las plantas entre las variables cuantificadas.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Desarrollo de la planta**

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con los productos ni al comparar plantas sanas con las inoculadas respecto a cualquiera de las variables fenotípicas cuantificadas en el estudio (longitud y grosor del tallo, y número de hojas, datos no incluidos para el artículo. Ver apéndice para la tesis). Para esto se debe considerar que hubo limitaciones de crecimiento tanto radical como del follaje por los recipientes utilizados de un litro. Además, las condiciones ambientales artificiales del invernadero, con calor excesivo comparado con el exterior, pudieron inhibir la libre manifestación del crecimiento y desarrollo vegetativo por efecto de los tratamientos. Este resultado arroja una apreciación positiva de los productos, al no manifestarse toxicidad y conservar apariencias similares a la de los testigos sanos, como un avance en el conocimiento de su efecto sobre las plantas. La limitación de espacio en el crecimiento radical tiene una correlación con el crecimiento de las plantas y el tipo de sustrato también es un cofactor (Poorter et al., 2012). El uso de tezontle con tierra en proporción 1:1, no

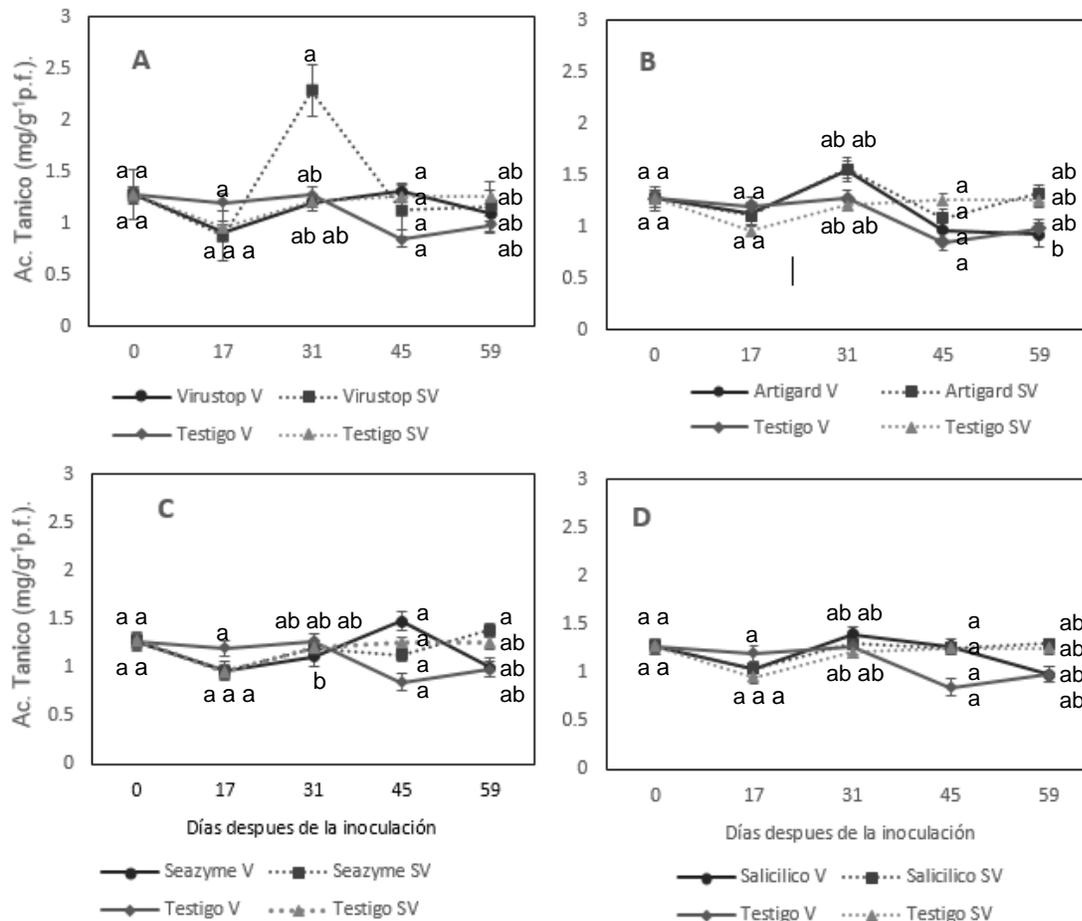
es favorable para el crecimiento de plantas de jitomate, comparado con otros sustratos, como lo demostró Ortega et al. (2010).

### **Severidad**

Los tratamientos sin inocular no mostraron ningún síntoma aparente, por lo que se asume que no se contaminaron. En los primeros 7 días después de la inoculación (ddi), todos los tratamientos inoculados tuvieron síntomas ligeros, después fueron aumentando con el paso del tiempo. A pesar de ver una atenuación en el grado de severidad, al usar los inductores de resistencia comparado con el testigo, el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, arrojó que no hubo diferencia entre los tratamientos inoculados (datos no incluidos para el artículo. Ver apéndice para la tesis). La expresión de síntomas causados por virus puede ser afectada por diferentes temperaturas (Chung et al., 2015).

### **Fenoles totales**

No hubo cambios significativos en el contenido de FEN tanto en plantas enfermas como en las sanas, con comportamiento similar al de los testigos y tampoco hubo incremento a lo largo del tiempo (Figura 1). Aunque sí hubo un incremento en plantas sanas aplicadas con VirusStop®, a los 31 ddi (2<sup>da</sup> aplicación), no hubo diferencias en el análisis de varianza (Cuadro 4), por lo que no se considera la comparación de medias (Cuadro 9). A los 59 ddi, si hubo estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) diferencia entre tratamientos, siendo, en plantas sanas de Seazyme®, el que tuvo mayor contenido de fenoles y con menor contenido en plantas enfermas aplicadas con Artigard®. Los demás tratamientos produjeron el mismo contenido de fenoles.

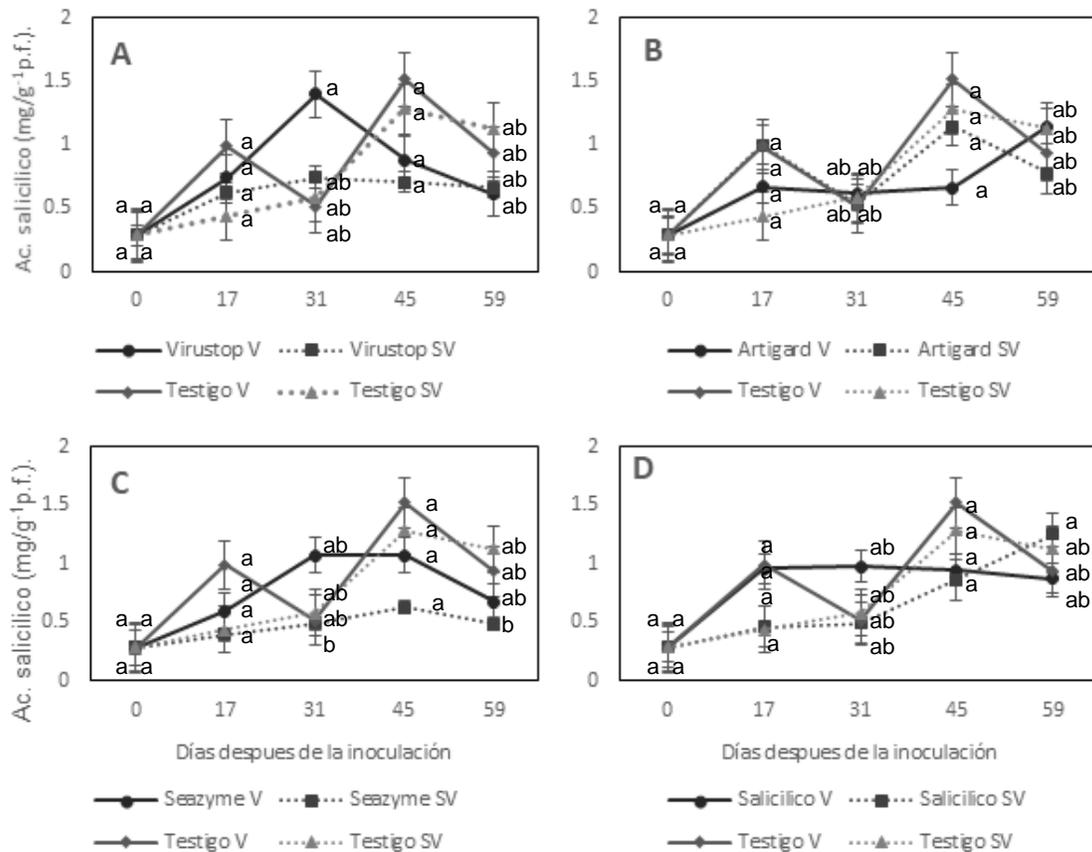


**Figura 1.** Contenido de fenoles totales promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada

Las plantas tuvieron agobio ambiental e hídrico, por lo que la actividad enzimática estuvo presente en todos los tratamientos. Las plantas desencadenan diferentes mecanismos de defensa a estrés abiótico y biótico (Reddy et al., 2004). La concentración de compuestos fenólicos se ve afectada, tanto por la inoculación de TMV, el estrés a la planta y la aplicación de un producto (Ibrahim et al., 2015).

## Ácido salicílico

A los 17 ddi (1<sup>ra</sup> aplicación) hubo un aumento en el contenido de AS en todos los tratamientos (Figura 2), sin diferencia estadística entre ellos (Cuadro 5), lo contrario ocurrió a los 31 ddi (2<sup>da</sup> aplicación), con diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), donde, la aplicación de VirusStop® en planta enferma produjo mayor contenido de AS y con menor contenido, al aplicar Seazyme® en plantas sanas, mientras que los demás tratamientos fueron estadísticamente iguales (Cuadro 10). Para los 45 ddi (3<sup>ra</sup> aplicación) hubo un incremento en el contenido de AS en algunos tratamientos, mientras que se mantuvo en otros y solo las plantas enfermas aplicadas con VirusStop® bajo su concentración, pero no hubo diferencia estadística entre tratamientos. En los 59 ddi (4<sup>ta</sup> aplicación), existiendo una diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), se produjo una disminución en el contenido de AS en la mayoría de tratamientos y solo la planta enferma tratada con Artigard® y planta sana aplicada con ácido salicílico aumentaron su concentración (Figura 2B y 2D), siendo esta última, la que tuvo la mayor concentración.



**Figura 2.** Contenido de ácido salicílico promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inculada con TMV, SV: sin inocular.

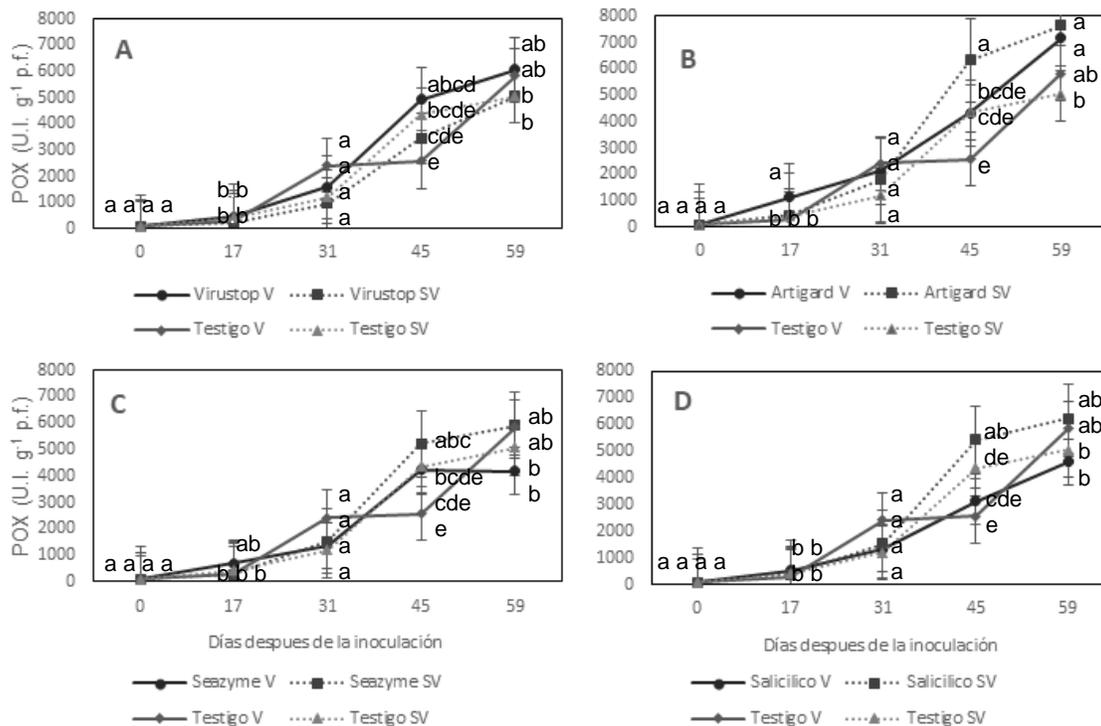
La acumulación intracelular de AS, es la respuesta de señalización cuando se induce la RSA (Resistencia Sistémica Adquirida), por el ataque de agentes patogénicos, lo que aumenta los niveles ROS (Especies reactivas al oxígeno) y la expresión de genes relacionados a la patogenicidad. Esta acumulación no solo interactúa con la defensa de plantas, así mismo, interacciona con diversas moléculas y hormonas, que regulan su desarrollo (Díaz, 2012). El AS participa en el crecimiento, termogénesis, inducción floral y en la absorción nutrimental, además afecta la síntesis de etileno y mejora el nivel de

pigmentos de carotenoides y clorofila, e interviene en la tasa fotosintética (Hayat y Ahmand, 2007).

### **Peroxidasa**

A los 17 ddi (1<sup>ra</sup> aplicación) aunque hubo poca actividad enzimática, hubo diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), siendo que hay mayor actividad cuando se aplica Seazyme® y Artigard® en plantas enfermas (Figura 3B y 3C), este último producto siendo mejor. Al realizar la 2<sup>da</sup> aplicación (31 ddi), aumentó la actividad, pero no hubo diferencias significativas (Cuadro 6). A los 45 ddi (3<sup>ra</sup> aplicación), siguió en aumento la actividad, obteniendo diferencia estadística, siendo que al aplicar Artigard® (mejor), Ac. Salicílico y Seazyme® en planta sana y VirusStop® en enferma fueron mejor que los testigos. El uso de Artigard® y Seazyme® en planta enferma se comportó igual que el testigo sano, mientras que el uso de VirusStop® en planta sana y Ac. Salicílico en enferma fueron mejores que el testigo enfermo. Y a los 59 ddi (4<sup>ta</sup> aplicación) solo el producto Artigard®, tanto en planta sana como enferma fueron mejores que los demás tratamientos (Figura 3B).

Los incrementos en la actividad de las peroxidasas se les han relacionado como una respuesta a la tolerancia del estrés abiótico, como temperaturas no aptas para su desarrollo, la salinidad o agobio hídrico (Vicuna et al., 2011). También tienen relación en la activación de mecanismos de defensa en contra de agentes patogénicos (Bolwell et al., 2002). Se ha observado el incremento de la POX por la infección de TMV, también por estrés hídrico y la combinación de ambos factores en planta de jitomate (Ibrahim et al., 2015).



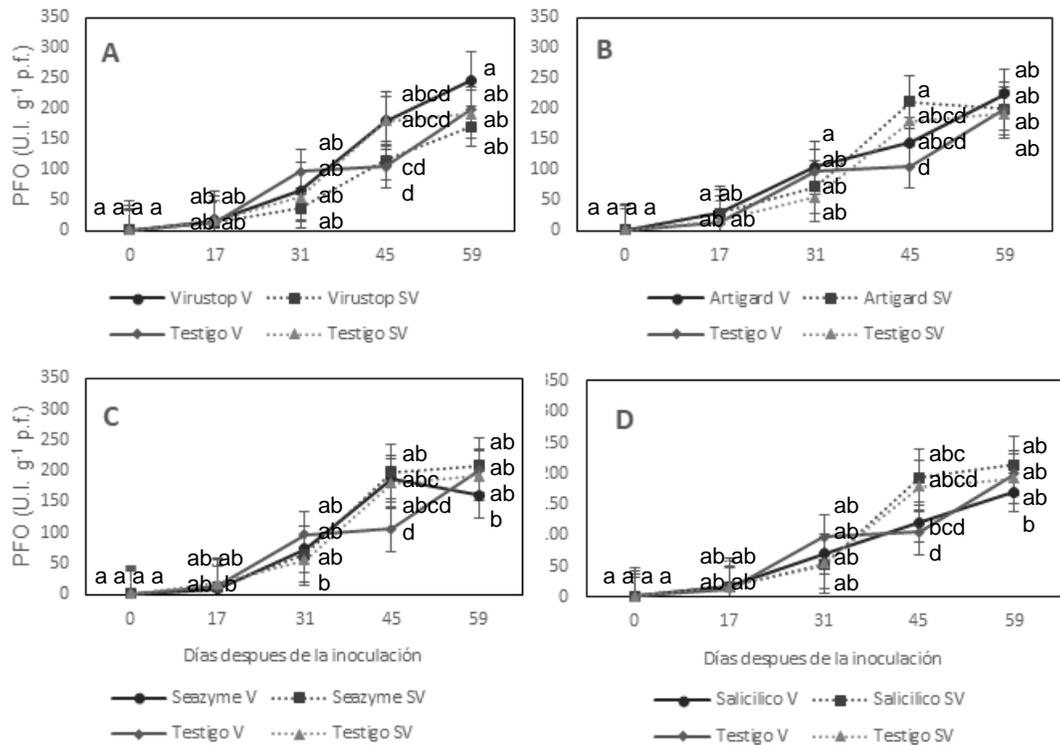
**Figura 3.** Actividad de POX promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular.

## Polifenol oxidasa

Durante todo el experimento, la actividad enzimática PFO tuvo un comportamiento de incremento, donde todos los muestreos después de las aplicaciones de los inductores produjeron una diferencia estadística significativa (Cuadro 7). A los 17 ddi (1<sup>ra</sup> aplicación), el uso de Artigard® en planta sana tuvo mayor actividad de PFO y la menor actividad se observó al aplicar en planta enferma SeaZyme® (Tukey,  $P \leq 0.05$ , Cuadro 11). En la 2<sup>da</sup> aplicación (31 ddi) el mejor tratamiento fue la aplicación de Artigard® en plantas enfermas

y obteniendo la menor actividad en planta sana usando VirusStop®. En los 45 ddi (3<sup>ra</sup> aplicación), la aplicación de Artigard® (mejor), Seazyme® y Ac. Salicilico en planta sana y Artigard® en planta enferma (Figura 4), indujeron mayor actividad que los testigos, mientras que la aplicación de VirusStop® y Artigard® en planta enferma, tuvieron la misma actividad que el testigo sano y el uso de Ac. Salicílico en planta enferma y VirusStop® en planta sana provocaron mayor actividad que el testigo enfermo. Por último, a los 59 ddi (4<sup>ta</sup> aplicación) la mayor actividad enzimática fue por la aplicación de VirusStop® en planta enferma (Figura 4A) y la menor actividad la indujo el uso de Seazyme® y Ac. Salicílico en planta enferma (Figura 4C y 4D) mientras que los demás tratamientos tuvieron la misma actividad.

La PFO se le asocia a diversos procesos fisiológicos como la reacción mehler, fotoreducción de O<sub>2</sub> por fotosistema I, regulación de los niveles de O<sub>2</sub> en plastidios, síntesis de la vía fenilpropanoides, así mismo se le involucra en la defensa contra patógenos, ya que son inducibles por estrés biótico y abiótico (Thipyapong et al., 2007). En el trabajo de Ngadze et al. (2012) se demostró que el aumento de la actividad de PFO en plantas de papa, tuvo una correlación en la respuesta de resistencia al inocular bacterias causantes de pudriciones.



**Figura 4.** Actividad de PFO promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular.

### Análisis de correlaciones

En la cuantificación de correlaciones, el valor de 1 significa una correlación perfecta. Esto es, una codependencia total o relación directa entre dos variables, donde a la acción/presencia de una corresponde igual respuesta de la otra. Si el valor es negativo (-), se pudiera interpretar como una interferencia o acción contraria entre las variables. En nuestro trabajo encontramos (Cuadro 12,  $p \leq 0.05$ ), que la interacción POX/PFO tuvo una correlación perfecta en cada fecha y en todos los tratamientos, siendo mayoría positivas, solo los tratamientos no inoculados en el último muestreo, fueron negativas a excepción del que se aplicó VirusStop® que fue positiva, así mismo se destaca que a la primera

aplicación de inductores de resistencia (17 ddi) en planta sana da una correlación positiva siendo contrario en el testigo sano. A los 17 ddi (1<sup>ra</sup> aplicación), la aplicación de Artigard® en planta sana activó más relaciones (+) entre variables que los demás tratamientos. Seguido de la aplicación de Seazyme® en planta sana, con 4 interacciones (+), destacando las interacciones entre enzimas (POX/PFO, FEN/POX, FEN/POF). A los 31 ddi (2<sup>da</sup> aplicación) la aplicación de ácido salicílico en planta sana, indujo más interacción (+). Pero la aplicación de VirusStop® dio una correlación negativa entre N° de hojas/Severidad. A los 45 ddi (3<sup>ra</sup> aplicación) la aplicación de VirusStop® en planta inoculada, tuvo 4 interacciones + y 2 - relacionadas con la severidad. En planta sana también tuvo dos negativas, pero relacionadas con las enzimas POX y PFO. En este muestro se destaca la correlación (+) AS (endógeno)/Severidad en planta enferma cuando se aplica Seazyme®. Y a los 59 ddi (4<sup>ta</sup> aplicación), hubo más interacciones negativas, lo que puede indicar un deterioro metabólico de las plantas si tomamos de referencia al testigo sano que, hubo más de estas.

Las enzimas que se estudiaron en este trabajo, son sintetizadas a partir de la ruta metabólica del ácido shikímico, estando relacionas entre sí, como lo describe Gordo (2018), pero en nuestro trabajo no se correlacionaron, solo en la 1<sup>ra</sup> aplicación de Seazyme® en planta sana, descrito anteriormente.

**Cuadro 2.** Coeficientes de correlación (r) con significancia estadística entre variables.

Tratamientos	Variables	Coeficiente de correlación (r)			
		17 ddi	31 ddi	45 ddi	59 ddi
VirusStop® V	POX/PFO	1	1	1	1
	H/SEV	-	-0.95059	-0.98473	-
	POX/A	-	-	0.98890	-0.99705
	PFO/A	-	-	0.98890	-0.99705
	AS/H	-	-	0.99060	-
	AS/SEV	-	-	-0.98328	-
VirusStop® SV	POX/PFO	1	1	1	1
	POX/H	-	-	-1	-

	PFO/H	-	-	-1	-
	AS/A	-	-	-	-0.99349
Actigard 50GS V	POX/PFO	1	1	1	1
	POX/H	-	-	-	-0.97333
	PFO/H	-	-	-	-0.97333
Actigard 50GS SV	POX/PFO	1	1	1	-1
	POX/H	0.96107	-	-	-
	PFO/H	0.96107	-	-	-
	POX/T	0.96225	-	-	-
	PFO/T	0.96225	-	-	-
	T/H	0.99205	-	0.95238	-
	AS/H	-	-	-	-0.97209
T/A	-	-	-	-0.95584	
SeaZyme® V	POX/PFO	1	1	1	1
	AS/A	-	0.97471	-	-
	AS/SEV	-	-	0.95576	-
	T/SEV	-	-	-	-0.98020
SeaZyme® SV	POX/PFO	1	1	1	-1
	FEN/POX	0.97169	-	-	-
	FEN/PFO	0.97169	-	-	-
	T/H	1	-	-	-
	FEN/H	-	-	-	0.96911
A.S.EX V	POX/PFO	1	1	1	1
	A/SEV	-	-	-	0.97647
A.S.EX. SV	POX/PFO	1	1	1	-1
	AS/T	-	0.96399	-	-
	AS/H	-	0.99221	-	-
	T/H	-	0.97714	-	-
Testigo V	POX/PFO	1	1	1	1
	AS/T	0.98425	-	-	0.97386
	FEN/H	-	0.98476	-	-
Testigo SV	POX/PFO	-1	1	1	-1
	FEN/T	-	0.99070	-	0.99696
	FEN/H	-	-	-	-0.97535
	AS/POX	-	-	-	-0.97966
	AS/PFO	-	-	-	0.97966
	T/H	-	-	-	-0.95618

V: inoculada con TMV, SV: sin inocular, A.S. EX.: Ácido salicílico exógeno, ddi: días después de la inoculación, H: hoja, A: altura, T: tallo, SEV: severidad, FEN: fenoles, AS: Ácido salicílico (endógeno), POX: Peroxidasa, PFO: Polifenol oxidasa. ( $p \leq 0.05$ ).

## CONCLUSIONES.

Los inductores de resistencia no mostraron un estímulo en la producción de hojas, longitud y grosor de tallo, tampoco hubo diferencia significativa en la severidad inducida por TMV. La aplicación repetida en diferentes fechas de inductores de resistencia tiende a más actividad y/o síntesis enzimática, tanto en planta enferma como sana. Se encontró

una relación significativa perfecta en POX y PFO en todos los tratamientos, además de relaciones entre las enzimas y las variables evaluadas

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkhalek, A., Ismail, I. A., Dessoky, E. S., El-Hallous, E. I., Hafez, E. (2019). A tomato kinesin-like protein is associated with Tobacco mosaic virus infection. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1424-1433.
- Alia-Tejacal I., M. T. Colinas-León, M. T. Martínez-Damián, y M. R. Soto-Hernández (2002). Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq.) durante poscosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8: 263–271.
- Ballhorn D. J., Kautz S., Heil M., Hegeman A. D. (2009). Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature. *Plant Signaling and Behavior*, 4(8): 735-745
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish C. y Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1367-1376.
- Chung, B. N., San Choi, K., Ahn, J. J., Joa, J. H., Do, K. S., & Park, K. S. (2015). Effects of temperature on systemic infection and symptom expression of Turnip mosaic virus in Chinese cabbage (*Brassica campestris*). *The plant pathology journal*, 31(4), 363.
- Díaz, N. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 10(2), 257-267.
- Flurkley W. H. and J. J. Jen (1978). Peroxidase and polyfenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science* 43:1828-1831.

- Gómez D. E., y Reis E. M. (2011). Inductores abióticos de resistencia contra Fitopatógenos. *Revista Química Viva* Numero 1. Argentina.
- Gordo, D. A. M. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 9(1), 81-104.
- Hayat, S., Ali, B., & Ahmad, A. (2007). Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. In *Salicylic acid: A plant hormone* (pp. 1-14). Springer, Dordrecht.
- Ibrahim, M. F. M., Bondok, A. M., Al-Senosi, N. K., & Younis, R. A. (2015). Stimulation some of defense mechanisms in tomato plants under water deficit and Tobacco mosaic virus (TMV). *World J. Agric. Sci*, 11, 289-302.
- Lamikanra O. (1995). Enzymatic browning of Muscadine grapes products, pp. 166-177. In: *Enzymatic Browning and Its Prevention*. Lee, C. L. and Whitaker J. R (eds.) Ed. ACS. Washington D.C., USA.
- Lee, G. H., & Ryu, C. M. (2016). Spraying of leaf-colonizing *Bacillus amyloliquefaciens* protects pepper from Cucumber mosaic virus. *Plant Disease*, 100(10), 2099-2105.
- Leiss K., Choi H. Y., Verpoorte R., Klinkhamer P. G. L. (2010). An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. *Phytochemistry*.
- Lovrekovich, L., Lovrekovich, H., & Stahmann, M. A. (1968). The importance of peroxidase in the wildfire disease. *Phytopathology*, 58, 193-198.
- Mayorga, V. R., & Higuera, B. L. (2007). Aislamiento y caracterización de una polifenoloxidasas relacionada con la tolerancia del clavel (*Dianthus caryophyllus*) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Acta Biológica Colombiana*, 12(2), 81-94.
- Ngadze, E., Icishahayo, D., Coutinho, T. A., & Van der Waals, J. E. (2012). Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid,

and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Disease*, 96(2), 186-192.

Ortega-Martínez, L. D., Sánchez-Olarte, J., Ocampo-Mendoza, J., Sandoval-Castro, E., Salcido-Ramos, B. A., & Manzo-Ramos, F. (2010). Efecto de diferentes sustratos en crecimiento y rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo condiciones de invernadero. *Ra Ximhai*, 6(3), 339-346.

Pérez-Moreno, L., Navarro-León, M. J., Ramírez-Malagón, R., & Mendoza-Celedón, B. (2010). Impacto e Identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad del ajo (*Allium sativum* L), en el estado de Guanajuato, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 97-110.

Poorter, H., Fiorani, F., Stitt, M., Schurr, U., Finck, A., Gibon, Y., Usadel B., Munns R., Atkin O. K., Tardieu F. & Pons, T. L. (2012). The art of growing plants for experimental purposes: a practical guide for the plant biologist. *Functional Plant Biology*, 39(11), 821-838.

Rangel, G. C.; Castro, E.; Beltrán, E.; Reyes De La Cruz, H.; García, E. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, p. 90-95.

Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., y Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of plant physiology*, 161(11), 1189-1202.

Santiago, R. H., Hernández, M. V., y Macorra, E. J. Z. (2020). Evaluación de inductores de resistencia al TMV en tomate. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(2), 377-390.

Taiz, L. y Zeiger E. (2006). Metabolitos secundarios y defensa de las plantas. In: *Fisiología vegetal*. L. Taiz and E. Zeiger (eds). Universitat Jaume I. D. L. pp. 530-580.

Thipyapong, P., Stout, M. J., & Attajarusit, J. (2007). Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. *Molecules*, 12(8), 1569-1595.

- Trejo-Saavedra, D. L., García-Neria, M. A., y Rivera-Bustamante, R. F. (2013). Benzothiadiazole (BTH) induces resistance to Pepper golden mosaic virus (PepGMV) in pepper (*Capsicum annum* L.). *Biological research*, 46(4), 333-340.
- Vicuna, D., Malone, R. P., & Dix, P. (2011). Increased tolerance to abiotic stresses in tobacco plants expressing a barley cell wall peroxidase. *Journal of Plant Sciences*, 6(1), 1-13.
- Walters, D. R., Ratsep, J. y Havis, N. D. (2014). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*.
- Warrier R. R., Paul M., y Vineetha M. V. (2013). Estimation of salicylic acid in Eucalyptus leaves using spectrophotometric methods. *Genetics and plant physiology*, 3(1-2), 90-97.
- Waterman, P. G. and S. Mole (1994). Analysis on phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Ye, X. S., Pan, S. Q., & Kuc, J. (1990). Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*) and to tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 80(12), 1295-1299.

## APENDICES

### Apéndice 1. Análisis de varianzas.

**Cuadro 3.** Análisis de varianza del desarrollo de la planta

FV	GL	SC	CM	F. Cal.	Pr > F
<b>Longitud de tallo</b>					
Tratamiento	9	5294.6763	588.2974	0.75 <sup>ns</sup>	0.6615
Error	790	618300.3618	782.6587		
Total corregido	799	623595.0381			
CV	63.47155				
<b>Grosor de tallo</b>					
Tratamiento	9	0.23162563	0.02573618	0.83 <sup>ns</sup>	0.5864
Error	790	24.42890820	0.03092267		
Total corregido	799	24.66053383			
CV	42.44289				
<b>Numero de hojas verdaderas</b>					
Tratamiento	9	136.29117	15.14346	0.45 <sup>ns</sup>	0.9050
Error	790	26335.02164	33.33547		
Total corregido	799	26471.31280			
CV	66.47965				

FV: Fuente de variación, GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrados medios, F. cal: valor de F calculada, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación, ns: no significativo para  $P \leq 0.05$ .

**Cuadro 4.** Análisis de varianzas de Fenoles totales (FEN) por fechas.

FV	GL	SC	CM	F. Cal.	Pr > F
<b>0 ddi</b>					
Tratamiento	9	0	0	-	-
Error	30	0	0		
Total corregido	39	0			
CV	0				
<b>17 ddi</b>					
Tratamiento	9	0.37256088	0.04139565	0.36 <sup>ns</sup>	0.9442
Error	30	3.42907681	0.11430256		
Total corregido	39	3.80163769			
CV	33.34428				
<b>31 ddi</b>					
Tratamiento	9	4.23251756	0.47027973	2.06 <sup>ns</sup>	0.0663
Error	30	6.83586254	0.22786208		
Total corregido	39	11.06838010			
CV	34.00191				
<b>45 ddi</b>					
Tratamiento	9	1.20998520	0.13444280	0.71 <sup>ns</sup>	0.6920
Error	30	5.65029157	0.18834305		
Total corregido	39	6.86027677			
CV	37.14821				
<b>59 ddi</b>					
Tratamiento	9	1.02937431	0.11437492	2.40*	0.0349
Error	30	1.42998966	0.04766632		
Total corregido	39	2.45936397			
CV	19.19894				

FV: Fuente de variación, GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrados medios, F. cal: valor de F calculada, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación, ddi: días después de la inoculación, -: todos los datos en todos los tratamientos son los mismos. \*, ns: significativo y no significativo para  $P \leq 0.05$

**Cuadro 5.** Análisis de varianzas de Ácido salicílico (AS) por fechas.

FV	GL	SC	CM	F. Cal.	Pr > F
<b>0 ddi</b>					
Tratamiento	9	0	0	-	-
Error	30	0	0		
Total corregido	39	0			
CV	0				
<b>17 ddi</b>					
Tratamiento	9	1.90188917	0.2113212	1.36 <sup>ns</sup>	0.2500
Error	30	4.66451559	0.15548385		
Total corregido	39	6.56640476			
CV	57.16984				
<b>31 ddi</b>					
Tratamiento	9	3.411621155	0.37906906	2.54*	0.0266
Error	30	4.47462960	0.14915432		
Total corregido	39	7.88625114			
CV	51.88428				
<b>45 ddi</b>					
Tratamiento	9	2.96690199	.32965578	1.69 <sup>ns</sup>	0.1349
Error	30	5.84646923	0.19488231		
Total corregido	39	8.81337122			
CV	45.40821				
<b>59 ddi</b>					
Tratamiento	9	2.37843996	0.26427111	2.25*	0.0467
Error	30	3.52932557	0.11764419		
Total corregido	39	5.90776553			
CV	40.05326				

FV: Fuente de variación, GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrados medios, F. cal: valor de F calculada, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación, ddi: días después de la inoculación, -: todos los datos en todos los tratamientos son los mismos. \*, ns: significativo y no significativo para  $P \leq 0.05$

**Cuadro 6.** Análisis de varianzas de Peroxidasa (POX) por fechas.

FV	GL	SC	CM	F. Cal.	Pr > F
<b>0 ddi</b>					
Tratamiento	9	0	0	-	-
Error	30	0	0		
Total corregido	39	0			
CV	0				
<b>17 ddi</b>					
Tratamiento	9	2458006.921	273111.880	5.15*	0.0003
Error	30	1590689.586	53022.986		
Total corregido	39	4048696.507			
CV	47.31053				
<b>31 ddi</b>					
Tratamiento	9	6656322.43	739591.38	1.94 <sup>ns</sup>	0.0841
Error	30	11441858.14	381395.27		
Total corregido	39	18098180.57			
CV	39.95684				
<b>45 ddi</b>					
Tratamiento	9	46408605.11	5156511.68	8.18*	<.0001
Error	30	18906315.47	630210.52		
Total corregido	39	65314920.58			
CV	18.04503				
<b>59 ddi</b>					
Tratamiento	9	43253758.01	4805973.11	6.20*	<.0001
Error	30	23246799.42	774893.31		
Total corregido	39	66500557.43			
CV	15.22861				

FV: Fuente de variación, GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrados medios, F. cal: valor de F calculada, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación, ddi: días después de la inoculación, -: todos los datos en todos los tratamientos son los mismos. \*, ns: significativo y no significativo para  $P \leq 0.05$

**Cuadro 7.** Análisis de varianzas de Polifenol oxidasa (PFO) por fechas.

FV	GL	SC	CM	F. Cal.	Pr > F
<b>0 ddi</b>					
Tratamiento	9	0	0	-	-
Error	30	0	0		
Total corregido	39	0			
CV	0				
<b>17 ddi</b>					
Tratamiento	9	1732.345392	192.482821	2.56*	0.0257
Error	30	2255.506300	75.183543		
Total corregido	39	3987.851692			
CV	50.24069				
<b>31 ddi</b>					
Tratamiento	9	14764.80687	1640.53410	2.30*	0.0420
Error	30	21379.94115	712.66471		
Total corregido	39	36144.74802			
CV	38.57924				
<b>45 ddi</b>					
Tratamiento	9	53621.74588	5957.97176	5.29*	0.0002
Error	30	33760.68205	1125.35607		
Total corregido	39	87382.42792			
CV	20.47340				
<b>59 ddi</b>					
Tratamiento	9	25680.64223	2853.40469	3.43*	0.0052
Error	30	24928.93160	830.96439		
Total corregido	39	50609.57383			
CV	14.49431				

FV: Fuente de variación, GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrados medios, F. cal: valor de F calculada, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación, ddi: días después de la inoculación, -: todos los datos en todos los tratamientos son los mismos. \*, ns: significativo y no significativo para  $P \leq 0.05$

## Apéndice 2. Comparación de medias.

**Cuadro 8.** Comparación de medias por tratamiento del desarrollo de la planta con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

	Tratamiento	Medias					
		Longitud de tallo		Grosor de tallo		N° de hojas	
1	VirusStop® V	42.504	A <sup>x</sup>	0.41026	A	8.3802	A
2	VirusStop® SV	45.985	A	0.40995	A	8.5542	A
3	Actigard 50GS V	41.869	A	0.38047	A	7.9812	A
4	Actigard 50GS SV	46.648	A	0.42438	A	9.0177	A
5	SeaZyme® V	40.147	A	0.40557	A	8.3156	A
6	SeaZyme® SV	47.295	A	0.44120	A	9.1406	A
7	A.S. V	47.237	A	0.39844	A	8.5625	A
8	A.S. SV	47.237	A	0.42974	A	9.3010	A
9	Testigo V	41.162	A	0.41115	A	8.4635	A
10	Testigo SV	45.420	A	0.43203	A	9.1323	A
	DMS	14.035		0.0882		2.8964	

<sup>x</sup>Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ). DMS: diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular, A.S.: Ácido salicílico.

**Cuadro 9.** Comparación de medias por tratamiento del contenido de Fenoles totales (FEN) con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

	Tratamiento	Días después de inoculación									
		0	17	31	45	59					
1	VirusStop® V	1.26747	A <sup>x</sup>	0.903891	A	1.195317	AB	1.30903	A	1.081190	AB
2	VirusStop® SV	1.26747	A	0.875993	A	2.281683	A	1.115081	A	1.16210	AB
3	Actigard 50GS V	1.26747	A	1.117212	A	1.544267	AB	0.961065	A	0.915477	B
4	Actigard 50GS SV	1.26747	A	1.103243	A	1.552666	AB	1.074556	A	1.319507	AB
5	SeaZyme® V	1.26747	A	0.962738	A	1.110331	B	1.477217	A	0.99639	AB
6	SeaZyme® SV	1.26747	A	0.961299	A	1.187812	AB	1.125682	A	1.387729	A
7	A.S. V	1.26747	A	1.0269	A	1.397371	AB	1.269961	A	0.980726	AB
8	A.S. SV	1.26747	A	1.042535	A	1.296399	AB	1.254177	A	1.300652	AB
9	Testigo V	1.26747	A	1.195344	A	1.266318	AB	0.842737	A	0.979232	AB
10	Testigo SV	1.26747	A	0.95011	A	1.206719	AB	1.25302	A	1.248756	AB

<b>DMS</b>	0	0.8155	1.1514	1.0468	0.5266
------------	---	--------	--------	--------	--------

<sup>x</sup> Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ). DMS: diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular, A.S.: Ácido salicílico.

**Cuadro 10.** Comparación de medias por tratamiento del contenido de Ácido salicílico (AS) con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Tratamiento	Días después de inoculación				
	0	17	31	45	59
<b>1 VirusStop® V</b>	0.28949 A <sup>x</sup>	0.745864 A	1.400496 A	0.883403 A	0.61428 AB
<b>2 VirusStop® SV</b>	0.28949 A	0.627668 A	0.745820 AB	0.703635 A	0.664079 AB
<b>3 Actigard 50GS V</b>	0.28949 A	0.670974 A	0.617790 AB	0.664809 A	1.146703 AB
<b>4 Actigard 50GS SV</b>	0.28949 A	1.002318 A	0.537802 AB	1.142811 A	0.775824 AB
<b>5 SeaZyme® V</b>	0.28949 A	0.598806 A	1.071839 AB	1.076044 A	0.675853 AB
<b>6 SeaZyme® SV</b>	0.28949 A	0.398601 A	0.491511 B	0.632692 A	0.489661 B
<b>7 A.S. V</b>	0.28949 A	0.959806 A	0.978235 AB	0.947481 A	0.87615 AB
<b>8 A.S. SV</b>	0.28949 A	0.465251 A	0.496914 AB	0.864269 A	1.256148 A
<b>9 Testigo V</b>	0.28949 A	0.990449 A	0.517848 AB	1.521639 A	0.934823 AB
<b>10 Testigo SV</b>	0.28949 A	0.437502 A	0.585325 AB	1.285126 A	1.129894 AB
<b>DMS</b>	0	0.9511	0.9316	1.0648	0.8273

<sup>x</sup> Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ). DMS: diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular, A.S.: Ácido salicílico.

**Cuadro 11.** Comparación de medias por tratamiento de la actividad de la Peroxidasa (POX) con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Tratamiento	Días después de inoculación				
	0	17	31	45	59
<b>1 VirusStop® V</b>	85.64 A <sup>x</sup>	456.9621 B	1581.01 A	4944.933 ABCD	6083.679 AB
<b>2 VirusStop® SV</b>	85.64 A	242.849 B	974.168 A	3446.428 CDE	5052.768 B
<b>3 Actigard 50GS V</b>	85.64 A	1124.832 A	2137.14 A	4331.054 BCDE	7186.001 A
<b>4 Actigard 50GS SV</b>	85.64 A	462.6299 B	1784.24 A	6326.627 A	7662.639 A
<b>5 SeaZyme® V</b>	85.64 A	700.5063 AB	1373.74 A	4241.658 BCDE	4187.424 B
<b>6 SeaZyme® SV</b>	85.64 A	265.4111 B	1535.02 A	5219.378 ABC	5913.806 AB

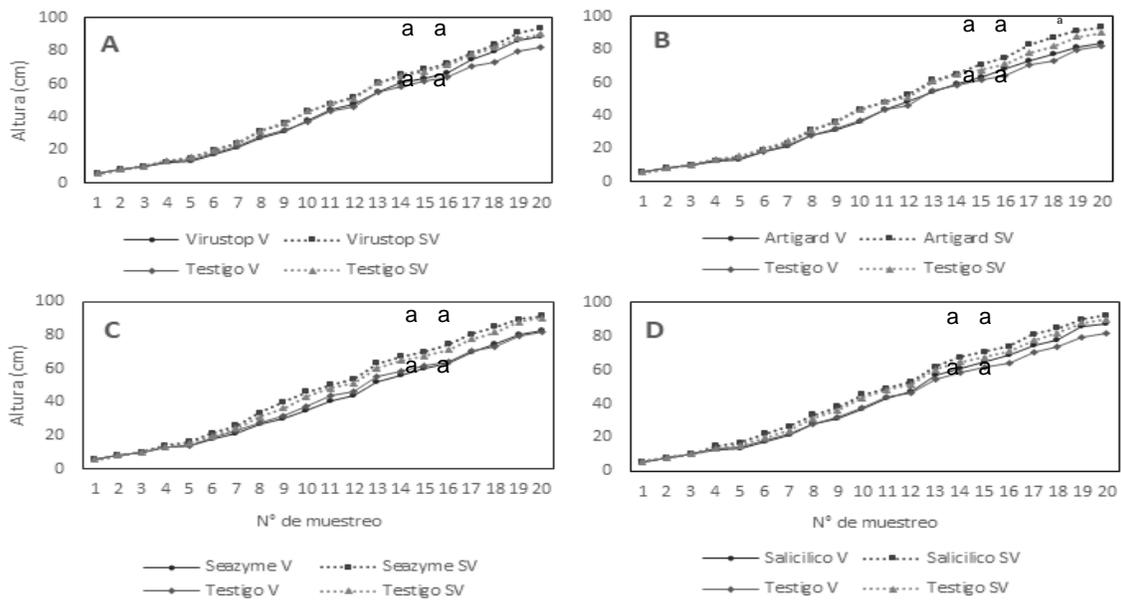
<b>7 A.S. V</b>	85.64 A	516.923 B	1331.57 A	3125.440 DE	4597.997 B
<b>8 A.S. SV</b>	85.64 A	377.3464 B	1522.64 A	5420.274 AB	6221.153 AB
<b>9 Testigo V</b>	85.64 A	302.3006 B	2411.95 A	2579.120 E	5841.068 AB
<b>10 Testigo SV</b>	85.64 A	417.3833 B	1201.20 A	4358.251 BCDE	5057.846 B
<b>DMS</b>	0	555.42	1489.6	1914.8	2123.3

<sup>x</sup>Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ). DMS: diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular, A.S.: Ácido salicílico.

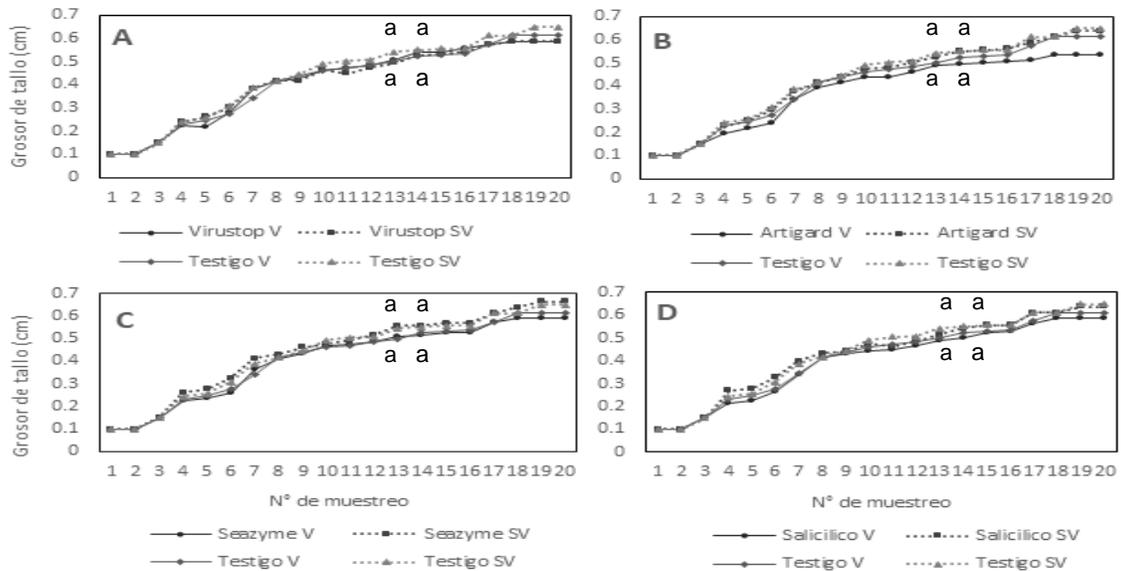
**Cuadro 12.** Comparación de medias por tratamiento de la actividad de la Polifenol oxidasa (PFO) con la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

Tratamiento	Días después de inoculación				
	0	17	31	45	59
<b>1 VirusStop® V</b>	1.36 A <sup>x</sup>	17.863 AB	65.621 AB	180.761 ABCD	247.192 A
<b>2 VirusStop® SV</b>	1.36 A	12.942 AB	36.919 B	115.2 CD	171.661 B
<b>3 Actigard 50GS V</b>	1.36 A	28.814 AB	105.448 A	145.421 ABCD	224.728 AB
<b>4 Actigard 50GS SV</b>	1.36 A	29.397 A	72.715 AB	211.893 A	200.295 AB
<b>5 SeaZyme® V</b>	1.36 A	8.576 B	73.159 AB	187.076 ABC	160.462 B
<b>6 SeaZyme® SV</b>	1.36 A	11.126 AB	64.408 AB	198.437 AB	208.456 AB
<b>7 A.S. V</b>	1.36 A	17.078 AB	69.691 AB	121.13 BCD	170.239 B
<b>8 A.S. SV</b>	1.36 A	16.784 AB	51.901 AB	193.416 ABC	214.141 AB
<b>9 Testigo V</b>	1.36 A	12.789 AB	97.005 AB	105.404 D	200.032 AB
<b>10 Testigo SV</b>	1.36 A	17.213 AB	55.1 AB	179.79 ABCD	191.602 AB
<b>DMS</b>	0	20.915	64.392	80.916	69.532

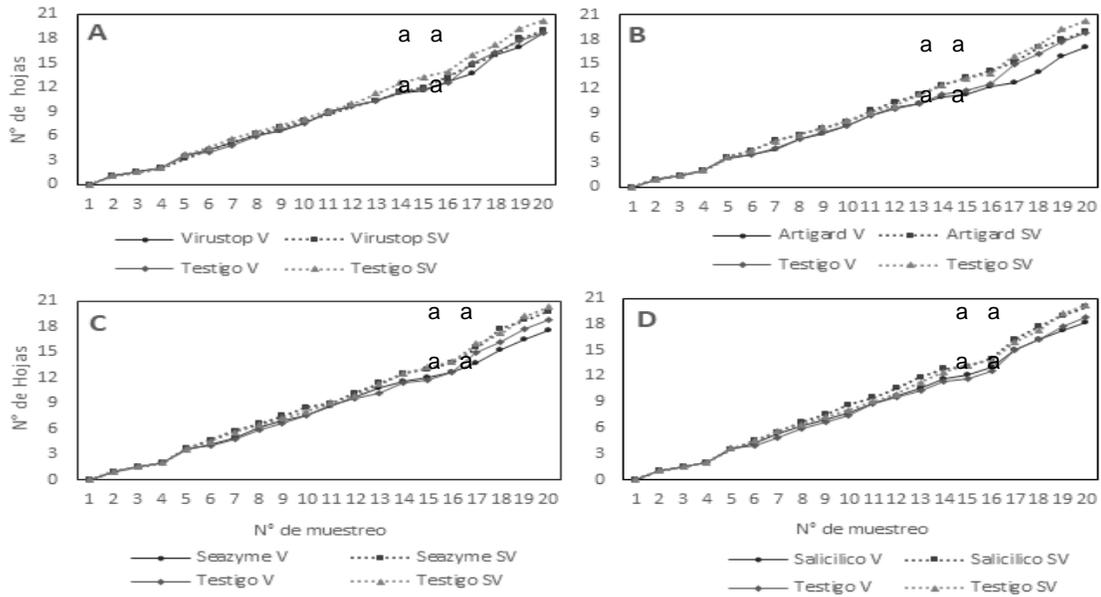
<sup>x</sup>Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ). DMS: diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular, A.S.: Ácido salicílico.



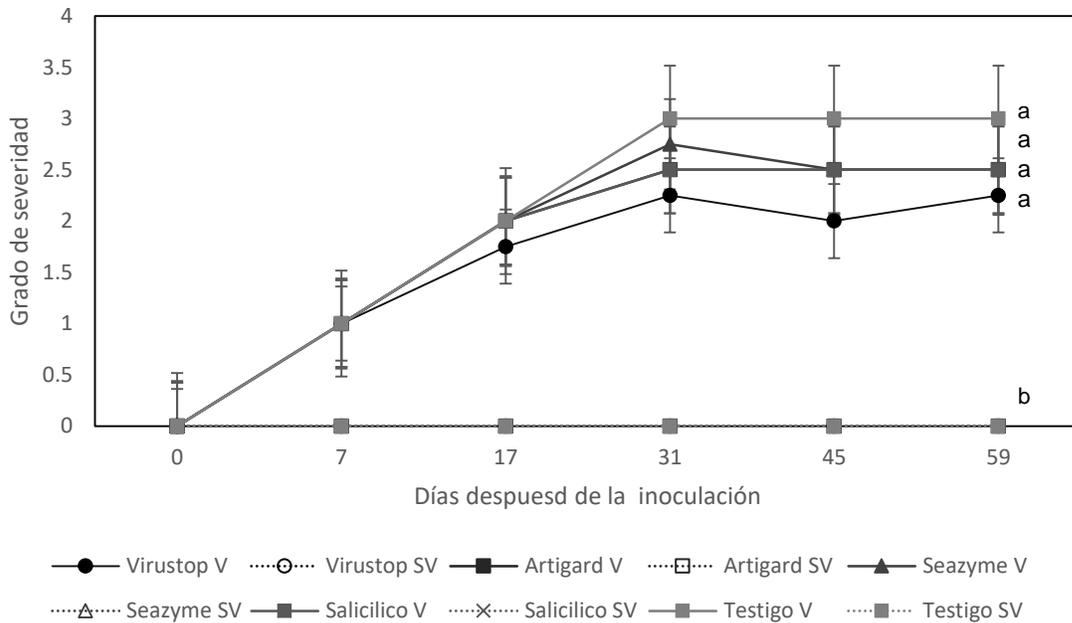
**Figura 5.** Longitud promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular.



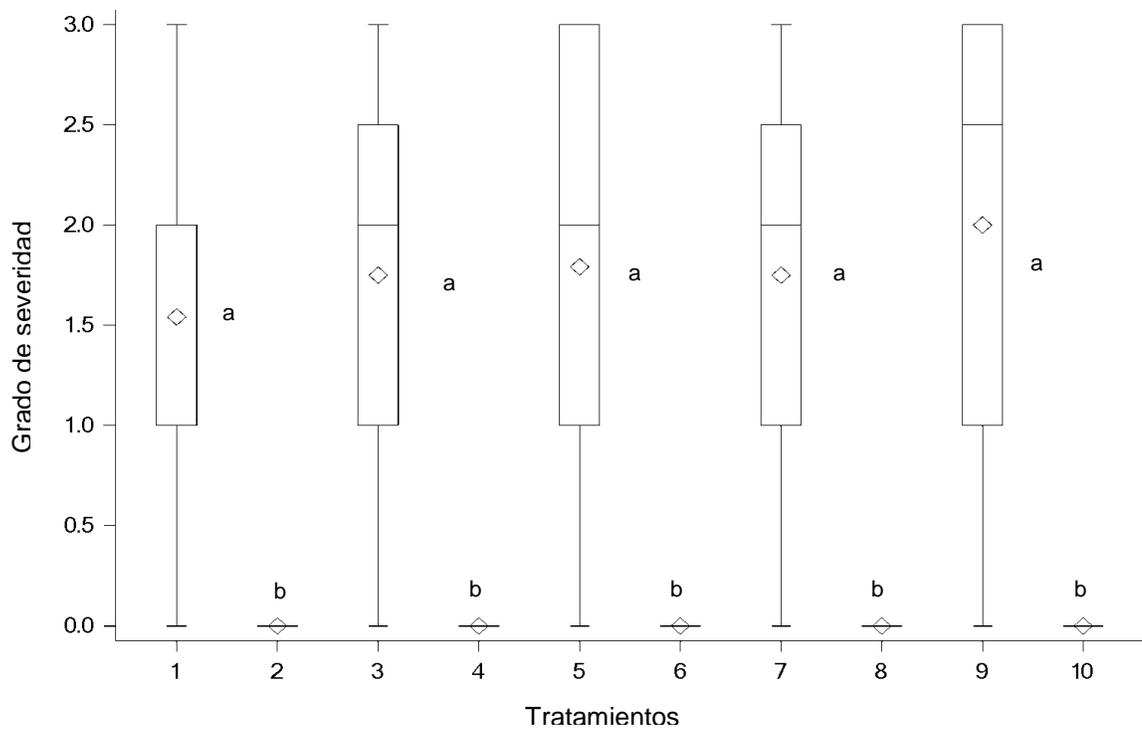
**Figura 6.** Grosor de la base de tallo promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular.



**Figura 7.** Numero de hojas verdaderas promedio de cada tratamiento con y sin inocular, comparado con los testigos. A: tratamiento con VirusStop®. B: tratamiento con Actigard 50 GS®. C: tratamiento con SeaZyme®. D: tratamiento con ácido salicílico. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular.



**Figura 8** Grado de severidad promedio de los tratamientos inoculados con el virus TMV. V: inoculada con TMV, SV: sin inocular.



**Figura 9** Análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.05$ ), 1: VirusStop® inoculada con TMV, 2: VirusStop® sin inocular, Actigard 50 GS® inoculada con TMV, 4: Actigard 50 GS® sin inocular, 5: SeaZyme® inoculada con TMV, 6: SeaZyme® sin inocular, 7: Ácido salicílico inoculada con TMV, 8: Ácido salicílico sin inocular. 9: Testigo inoculada con TMV, 10: Testigo sin inocular.