



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

SOBREEXPRESIÓN DE ENZIMAS DE DEFENSA EN TOMATE POR INFECCIÓN VIRAL

TESIS

**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

GABRIELA DÍAZ GARCÍA

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



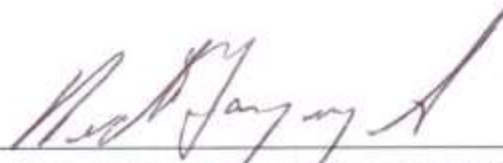
Chapingo, Edo. de México, Diciembre de 2016

SOBREEXPRESIÓN DE ENZIMAS DE DEFENSA EN TOMATE POR
INFECCIÓN VIRAL

Tesis realizada por **GABRIELA DÍAZ GARCÍA** 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 HORTICULTURA

DIRECTOR:



Ph.D. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR:



DR. MARIO ALBERTO VÁZQUEZ PEÑA

ASESOR:



Ph.D. MA. TERESA BERYL COLINAS Y LEÓN

ASESOR:



DR. EFRAÍN CONTRERAS MAGAÑA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE APÉNDICES	viii
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	x
DATOS BIOGRÁFICOS	xi
RESUMEN GENERAL	xii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Virus de plantas	2
2.1.1 Virus en tomate	3
2.2 Defensa de las plantas	4
2.2.1 Metabolitos secundarios	4
2.2.2 Defensas antipatogénicas adicionales	8
2.3 Literatura citada	9
3. SOBREEXPRESIÓN DE ENZIMAS DE DEFENSA EN TOMATE POR INFECCIÓN VIRAL	14
3.1 Resumen	14
3.2 Introducción	15
3.3 Materiales y métodos	16
3.3.1 Diseño experimental y tratamientos	16

3.3.2 Inoculación	17
3.3.3 Muestreo	17
3.3.4 Determinación enzimática	17
3.3.5 Análisis estadístico	20
3.4 Resultados y discusión	20
3.4.1 Fenoles Totales	20
3.4.2 Fenilalanina amonioliasa	22
3.4.3 Peroxidasa	24
3.4.4 Proteína soluble	26
3.4.5 Superóxido dismutasa	29
3.4.6 Análisis de correlación	31
3.5 Conclusiones	32
3.6 Bibliografía	32
APÉNDICES	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Coeficientes de correlación (r) con significancia estadística entre variables.	31
Cuadro 2. Comparación de medias para Fenoles Totales (FEN).	35
Cuadro 3. Comparación de medias para Fenilalanina amonio-liasa (PAL).	36
Cuadro 4. Comparación de medias para Peroxidasa (POX).	37
Cuadro 5. Comparación de medias para Proteínas (PRO).	38
Cuadro 6. Comparación de medias para Superóxido dismutasa (SOD).	39
Cuadro 7. Análisis de varianza de Fenoles (FEN), variedad Condor.	40
Cuadro 8. Análisis de varianza de Fenoles (FEN), variedad Raptor.	41
Cuadro 9. Análisis de varianza de Fenoles (FEN), variedad Quetzal.	42
Cuadro 10. Análisis de varianza de Fenoles (FEN), variedad 5999.	43
Cuadro 11. Análisis de varianza de Fenilalanina amonio-liasa (PAL), variedad Condor.	44
Cuadro 12. Análisis de varianza de Fenilalanina amonio-liasa (PAL), variedad Raptor.	45
Cuadro 13. Análisis de varianza de Fenilalanina amonio-liasa (PAL), variedad Quetzal.	46
Cuadro 14. Análisis de varianza de Fenilalanina amonio-liasa (PAL), variedad 5999.	47
Cuadro 15. Análisis de varianza de Peroxidasa (POX), variedad Condor.	48
Cuadro 16. Análisis de varianza de Peroxidasa (POX), variedad Raptor.	49
Cuadro 17. Análisis de varianza de Peroxidasa (POX), variedad Quetzal.	50
Cuadro 18. Análisis de varianza de Peroxidasa (POX), variedad 5999.	51
Cuadro 19. Análisis de varianza de Proteínas (PRO), variedad Condor.	52
Cuadro 20. Análisis de varianza de Proteínas (PRO), variedad Raptor.	53
Cuadro 21. Análisis de varianza de Proteínas (PRO), variedad Quetzal.	54

Cuadro 22. Análisis de varianza de Proteínas (PRO), variedad 5999.	55
Cuadro 23. Análisis de varianza de Superóxido dismutasa (SOD), variedad Condor.	56
Cuadro 24. Análisis de varianza de Superóxido dismutasa (SOD), variedad Raptor.	57
Cuadro 25. Análisis de varianza de Superóxido dismutasa (SOD), variedad Quetzal.	58
Cuadro 26. Análisis de varianza de Superóxido dismutasa (SOD), variedad 5999.	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Contenido de fenoles totales; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); —■— Testigo, —▲— TYLCV, —●— TMV. 21
- Figura 2. Actividad de PAL; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); —■— Testigo, —▲— TYLCV, —●— TMV. 23
- Figura 3. Actividad de POX; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); —■— Testigo, —▲— TYLCV, —●— TMV. 25
- Figura 4. Contenido de Proteínas; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); —■— Testigo, —▲— TYLCV, —●— TMV. 27
- Figura 5. Actividad de SOD; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); —■— Testigo, —▲— TYLCV, —●— TMV. 30

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Comparación de medias	35
Apéndice 2. Análisis de varianza	40

DEDICATORIA

A mis padres, con cariño, admiración y respeto

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento proporcionado durante esta investigación, a la Universidad Autónoma Chapingo y al Instituto de Horticultura por la facilidades otorgadas.

Agradezco al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por su apoyo, dedicación, paciencia y su valioso consejo para desarrollar esta investigación. De igual manera al Dr. Mario Alberto Vázquez Peña por su paciencia y dedicación al momento de resolver todas las interrogantes estadísticas. Al Dr. Efraín Contreras Magaña y la Dra. Ma. Teresa B. Colinas por su apoyo y sus valiosas contribuciones para la mejora y culminación del presente

Al Ing. Cecilio Bautista -Don Cecilio- por todo su apoyo y paciencia al momento de explicarme y establecer los ensayos en el lab, sin su apoyo esta investigación no habría sido posible.

Al Ing. Eliseo Santos Rodríguez por proveer el material vegetal infectado con virus y a Ahern Seeds por proporcionar las variedades evaluadas en esta investigación.

A Adela por esas noches de microinfarto que hicieron de la jornada de trabajo una más llevadera y divertida. A Diego, Guillermo y Deneb por el apoyo en los ensayos y cultivo del tomate, sin duda alguna fueron de gran ayuda para concluir este trabajo. A Frida, Rosa, Dulce, Toño, Eddi y Monse, que en conjunto con los anteriores, hicieron de mi estancia en Chapingo una experiencia inolvidable.

Con gran admiración y respeto, agradezco a mis papás, por su apoyo incondicional, su confianza y sus constantes palabras de aliento, por ser la mano fuerte que me ayuda a salir adelante.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Gabriela Díaz García
Fecha de nacimiento	Octubre 04 1991
Lugar de nacimiento	Aguascalientes, Ags.
CURP	DIGG911004MASZRB02
Cédula profesional	09144316

Desarrollo académico

Bachillerato	Preparatoria Agrícola, UACH.
Licenciatura	Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, UACH

RESUMEN GENERAL

El ataque por fitopatógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa de las plantas cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. El objetivo de esta investigación fue cuantificar la síntesis y/o actividad de fenoles totales (FEN), fenilalanina amonioliasa (PAL), peroxidasas (POX), proteínas totales (PRO) y superóxido dismutasa (SOD), en variedades de tomate Condor, susceptible a virosis (S), Raptor (S), Quetzal, resistente (R), y 5999 (R), inoculadas con el Geminivirus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV) y el Tobamovirus Mosaico del Tabaco (TMV). El testigo no se inoculó. Se tomaron seis muestreos, se elaboró polvo de acetona y a partir de ahí se realizó la determinación enzimática. El análisis estadístico consistió en un ANAVA factorial y en análisis de correlación. Las plantas infectadas indujeron mayor síntesis/actividad de enzimas y metabolitos que las sanas, siendo TMV el mayor inductor para PAL y SOD y teniendo efecto similar con TYLCV en FEN, POX y PRO. Los genotipos resistentes mostraron mayor síntesis/actividad de los metabolitos en estudio que los genotipos susceptibles, siendo 5999 mejor para FEN, PRO y SOD, y Quetzal para PAL y POX. Se encontró correlación significativa en las variedades Condor y Raptor, ambas susceptibles, para FEN /POX ($r=0.47$ y $r=0.45$) y FEN/PAL ($r=0.27$ y $r=0.45$), mientras que en Quetzal y 5999, ambas resistentes a virosis, la significancia fue para las correlaciones FEN/POX ($r=0.44$ y $r=0.58$), SOD/PRO ($r=0.71$ y $r=0.50$), SOD/PAL ($r=0.61$ y $r=0.52$) y PRO/PAL ($r=0.64$ y $r=0.29$). Se concluye que los virus estimularon mayor síntesis/actividad de los metabolitos en estudio en las plantas enfermas que los sintetizados en plantas sanas. Además, las variedades Quetzal y 5999, resistentes, mostraron mayor actividad enzimática, contenido de compuestos fenólicos y actuaron con mayor rapidez que las variedades Condor y Raptor, susceptibles.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* L., enzimas de defensa, TYLCV, VMT.

GENERAL ABSTRACT

Plant pathogen attack is an unfavorable condition that usually triggers a series of defense mechanisms in plants in order to stop, slow, or counteract the infection. The objective of this research was to quantify the synthesis and/or activity of total phenols (FEN), phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidases (POX), total proteins (PRO), and superoxide dismutase (POX), in four tomato cvs., two virus susceptible, Condor and Raptor, and two virus resistant, Quetzal and 5999, inoculated with the Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus (TYLCV) and the Tobacco Mosaic Tobamovirus (TMV). The control was not inoculated. After six samplings acetone powder was obtained as the baseline for the enzymatic studies. Statistical analysis included a factorial ANOVA and correlation analysis. Infected plants induced more enzyme/metabolite synthesis/activity than the healthy ones. TMV induced the most PAL and SOD activity, while TYLCV did it to FEN, POX, and PRO. Resistant genotypes showed more synthesis/activity of the metabolites under study than the susceptible ones. Cultivar 5999 was the best for FEN, PRO, and SOD, and cv. Quetzal for PAL and POX. Significant correlation was detected in susceptible cvs. Condor and Raptor for FEN /POX ($r=0.47$ and $r=0.45$) and FEN/PAL ($r=0.27$ and $r=0.45$), while for virus-resistant cvs. Quetzal and 5999 it was for FEN/POX ($r=0.44$ and $r=0.58$), SOD/PRO ($r=0.71$ and $r=0.50$), SOD/PAL ($r=0.61$ and $r=0.52$) and PRO/PAL ($r=0.64$ and $r=0.29$). We conclude that viruses stimulate more synthesis/activity of the metabolites under study in diseased plants than in healthy ones. In addition, resistant cvs. Quetzal and 5999 showed more enzymatic activity and phenolic compound content and acted sooner than susceptible cvs. Condor and Raptor.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., defense enzymes, TYLCV, TMV.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más importantes en México y el mundo (SIAP, 2016), en los últimos años se ha visto afectado por la incidencia de enfermedades causadas por virus, los cuales no son prevenidos ni manejados adecuadamente (Ramírez & Sáinz, 2006) y resultan muy difíciles de controlar (Mathews, 1979). Existen gran cantidad de virus que atacan al tomate, entre ellos se encuentra Virus Mosaico del Tabaco (TMV) y Virus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV), los cuales en los últimos años han cobrado importancia económica en el cultivo (Jones *et al.*, 2001).

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, reducir o contrarrestar la infección (Madriz, 2002). Las plantas poseen mecanismos constitutivos o preformados y mecanismos inducidos de defensa. Los mecanismos inducidos de defensa se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Collinge *et al.*, 1993) e involucra cambios claros en el metabolismo relacionados con la biosíntesis de enzimas y metabolitos secundarios (Madriz, 2002).

Existe una gran cantidad de enzimas y metabolitos secundarios que participan en el sistema de defensa de las plantas, entre ellos se encuentran Fenoles (FEN), Proteínas (PRO) y enzimas como Fenilalanina amonio-liasa (PAL), Peroxidasa (POX), y Superóxido dismutasa (SOD).

El objetivo del presente fue cuantificar la síntesis/actividad de FEN, PAL, POX, PRO y SOD en variedades de tomate resistente y susceptible inoculado con TMV y TYLCV.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Virus de plantas

Los virus de plantas son partículas infectivas, considerados parásitos intracelulares obligados, compuestos por ácido ribonucleico (ARN) o por ácido desoxiribonucleico (ADN) y cubierta proteica, los cuales ingresan a la célula vegetal a través de heridas causadas por daños físicos debidos al medio ambiente o por la acción de vectores. Entre los vectores se encuentran varias especies de insectos, ácaros, nemátodos y ciertos hongos habitantes del suelo. No son celulares ni se encuentran constituidos por ellas, pero se propagan induciendo a la célula hospedera a que los multiplique utilizando su energía y su maquinaria biosintética. En el citoplasma, el virus de ARN se desensambla, replica, traduce sus mensajeros a proteínas y se moviliza local y sistémicamente. Para cumplir con estos procesos, el virus utiliza energía y proteínas de la célula hospedera. Durante cada etapa del ciclo viral se generan distintas interacciones entre la planta hospedera y el virus. Si la planta desconoce la partícula viral, se establece una interacción compatible entre la planta hospedera y el virus, siendo estas interacciones favorables para el virus. Por el contrario si la planta reconoce la partícula viral, se establece una interacción incompatible, desfavorable para el virus. En estas condiciones, la planta reconoce el virus, desencadenando respuestas de defensa que pueden limitar la replicación y el movimiento del virus, circunscribiéndolo al sitio inicial de infección (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Los virus no matan a sus hospederos de forma directa, sino que desvían el metabolismo generando sustancias extrañas, alterando diversas funciones vitales e induciendo el desarrollo de síntomas. En las plantas, los síntomas pueden variar desde simples cambios de color hasta necrosis severa o muerte súbita de las plantas, en algunos otros casos se tienen hospedantes asintomáticos (Jones *et al.*, 2001; Agrios, 2004; Stange, 2006).

Las enfermedades causadas por virus son muy difíciles de controlar y pueden resultar en pérdidas significativas del cultivo. La incidencia y severidad varían ya que dependen de la interacción compleja existente entre el patógeno, la planta, el vector, la fuente del virus y el ambiente (Mathews, 1979).

2.1.1 Virus en tomate

Existen gran cantidad de virus que atacan al tomate, entre ellos destacan Virus mosaico de la alfalfa (AMV), Virus mosaico del pepino (CMV), Virus enrollado de la papa (PLRV), virus Y de la papa (PVY), Virus ápice amarillo del tomate (TYTV), Virus mosaico de la berenjena (EMV), Virus de las manchas anulares del tomate (ToRSV), Virus de la necrosis apical del tomate (TTNV), Virus bronceado del tomate (TSWV), Virus mosaico dorado del tomate (TGMV), Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV), Virus mosaico del tomate (ToMV), Virus mosaico del tabaco (TMV), Virus mosaico amarillo del tomate (TYMV). Los vectores de estos virus son variados e incluyen áfidos, cicadélidos, nemátodos, trips, aleuródidos y su transmisión puede ser mecánica, por semilla o por vector (Harrison, 1985; Jones *et al.*, 2001; Castellanos, 2009).

Virus del Rizado Amarillo del Tomate

El Virus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV) es uno de los virus que están tomando mayor importancia económica en el cultivo de tomate. Pertenece a la familia de los geminivirus, a diferencia de la mayoría de los virus de este grupo, que tienen un genoma compuesto por moléculas bipartitas de ADN de cadena sencilla (ssDNA), el genoma del TYLCV se compone de una sola molécula (monopartita) de ADN de cadena sencilla (ssDNA) (Gutierrez, 1999; Hanley-Bowdoing *et al.*, 1999; Lapidot *et al.*, 2007).

El TYLCV es transmitido por vectores, su vector es la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) la cual lo trasmite con alta eficiencia de forma persistente circulativa (no propagativa). El tiempo mínimo de adquisición del virus de plantas infectadas es de 15 a 30 minutos, dentro del insecto vector el tiempo latente es de al menos 21 horas, mientras que el virus puede persistir en el vector durante 10 a 12 días

(Jones *et al.*, 2001). Los síntomas iniciales se caracterizan por clorosis y curvamiento de las hojas hacia abajo, posteriormente las hojas son cloróticas deformadas y curvadas hacia arriba, dando la apariencia de una cuchara. Los frutos son de piel delgada y tamaño pequeño, no son comercializables (Cohen & Nitzany, 1966; Al-Musa, 1982).

Virus Mosaico del Tabaco

El Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) es el virus más ampliamente distribuido en México. Pertenece al grupo de los Tobamovirus, es un virus que tiene ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla de sentido positivo (+ssRNA), y morfológicamente es una varilla rígida, formada por una cubierta cilíndrica de 18 nm de diámetro y 300 nm de longitud, en su interior hay un canal de 4 nm, ésta cubierta está formada por más de 2100 monómeros protéicos y una molécula de ARN de aproximadamente 6500 bases. El TMV se trasmite muy fácilmente de forma mecánica o por contacto, no se ha identificado transmisión por vectores. En general las variedades susceptibles muestran síntomas progresivos en forma de decoloración de las hojas jóvenes, seguidos de un moteado en forma de mosaico de áreas verdes de diferente intensidad. Las plantas infectadas normalmente presentan un crecimiento reducido y anormal, con hojas más pequeñas y deformadas (Broadbent & Fletcher, 1963; Shalla, 1964; Jones *et al.*, 2001; Chitra *et al.*, 2002).

2.2 Defensa de las plantas

Las defensas vegetales, de acuerdo con biólogos evolucionistas, surgieron a través de fenómenos de mutación hereditaria, selección natural y cambios evolutivos. Mutaciones al azar en rutas metabólicas básicas dieron lugar a la aparición de nuevos compuestos, que con el paso del tiempo se determinaron tóxicos para agentes patógenos (Taiz & Zeiger, 2006).

2.2.1. Metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos, conocidos como metabolitos secundarios, productos secundarios o productos

naturales, los cuales no tienen función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, síntesis de proteínas y otros procesos primarios (Taiz & Zeiger, 2006).

Recientemente se ha descubierto que muchos metabolitos secundarios tienen importantes funciones como proteger a las plantas de la ingestión por herbívoros y la infección por patógenos microbianos.

Los metabolitos secundarios se dividen en tres grupos principales y químicamente diferentes: terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno, en los cuales participan diferentes rutas metabólicas que al igual que los metabolitos tienen influencia en los mecanismos de defensa de las plantas.

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (FEN) en las plantas comprenden un diverso grupo de fitoquímicos, los cuales abarcan desde ácidos fenólicos hasta taninos y ligninas. La característica principal de los fenoles son los anillos aromáticos llevando uno o más grupos hidroxilo (Constable, 1999). La síntesis de estos compuestos se realiza en dos rutas metabólicas básicas: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los fenoles en las plantas, mientras que la ruta del ácido malónico es la principal para hongos y bacterias (Taiz & Zeiger, 2006). La mayor parte de los compuestos fenólicos de las plantas derivan de la fenilalanina por la eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cinámico, reacción catalizada por la fenilalanina amonio-*liasa* (PAL), posiblemente la enzima más estudiada del metabolismo secundario por todas las reacciones y compuestos que desencadena.

Los compuestos fenólicos son de gran importancia para la planta ya que llegan a formar parte integral de la estructura de la pared celular, principalmente de ligninas y suberinas para resistencia y soporte mecánico y barreras protectoras contra infección microbiana (Dai *et al.*, 1995; Strack, 1997).

La presencia de fenoles en las plantas como respuesta a una infección se asocia a resistencia contra hongos patógenos (Vidhyasekaran, 1997). La síntesis de fenoles y otros metabolitos secundarios son asociados a la característica de resistencia/susceptibilidad del genotipo (Lozoya *et al.*, 2007), siendo mayor en genotipos resistentes que en susceptibles (Dai *et al.*, 1995).

Fenilalanina amonio liasa

La fenilalanina amonio-liasa (EC. 4.3.1.5; PAL) se encuentra en la ruta biosintética del metabolismo primario o ruta del ácido shikímico y la ruta del metabolismo secundario o ruta de los fenilpropanoides. La enzima PAL cataliza la desaminación no oxidativa de la fenilalanina para producir ácido cinámico, a partir de ácido cinámico se producen varios fenilpropanoides simples como los ácidos cumárico, caféico, ferúlico, así como cumarinas (Bidwell, 1979; Jones, 1984; Dixon *et al.*, 1992; Dixon & Paiva, 1995).

La inducción de fenilpropanoides, por medio de fenilalanina amonio liasa, puede deberse a diversos factores bióticos o abióticos entre los que destacan iluminación, ataque de patógenos, daño mecánico, bajas temperaturas o niveles bajos de algunos nutrimentos (nitrógeno, fósforo o hierro) (Smith & Rubery, 1981; Goodman *et al.*, 1986; Dixon & Paiva, 1995; Ramamurthy *et al.*, 2000). La invasión fúngica, por ejemplo, inicia la transcripción del RNA mensajero que codifica la PAL, aumentando su concentración en la planta, lo que estimula la síntesis de compuestos fenólicos (Vidhyasekaran, 1997).

La regulación de la actividad de la PAL es muy compleja debido a la existencia de múltiples genes que codifican para su síntesis, algunos de los cuales solo se expresan en tejidos o bajo condiciones específicas (Logemann *et al.*, 1995; Taiz & Zeiger, 2006).

Peroxidasa

La peroxidasa (EC. 1.11.1.7; POX) es la enzima que cataliza la oxidación de donadores de hidrógeno a expensas de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) aceptando

como donadores de hidrógeno a un amplio rango de polifenoles (Burnette, 1977; Djanaguiraman *et al.*, 2004; Calderón, 2008), asimismo se asocia a procesos de cicatrización de heridas como la lignificación (Ramamurthy *et al.*, 2000).

Las peroxidasas en conjunto con la fenilalanina amonio-liasa (PAL) y los fenoles (FEN) forman parte de un grupo de compuestos precursores de resistencia sistémica adquirida, la cual involucra la activación de genes de protección y de defensa que estimulan la síntesis y actividad de compuestos, los cuales catalizan la oxidación y conversión de los compuestos fenólicos en quinonas además de promover la lignificación en los sitios de infección que interfieren con el desarrollo del patógeno (Robinson, 1991; Lozoya *et al.*, 2006).

Las peroxidasas se clasifican en dos grandes familias, la primera incluye a las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas y la segunda constituida por peroxidasas animales (Hiraga *et al.*, 2000).

Estudios sugieren que la concentración de peroxidasa y otras enzimas como superóxido dismutasa incrementan su síntesis al presentarse condiciones ambientales desfavorables (Pérez, 1999) o progreso de enfermedades como el tizón tardío o ataque de nemátodos (Lozoya *et al.*, 2007).

Proteínas

Las proteínas son moléculas importantes en la regulación del metabolismo de las células y actúan como moléculas enzimáticas o estructurales. Están compuestas de cadenas de aminoácidos, cada uno unida por enlaces peptídicos.

Dentro de los mecanismos de defensa inducida por el ataque del patógeno existe un amplio número de proteínas que han sido descritas como parte de mecanismos de defensa de las plantas (Blanco-Labra & Aguirre, 2002). Al ocurrir la penetración de un organismo patógeno se dan una serie de reacciones por parte de la planta, las cuales incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Taiz & Zeiger, 2006), cambios en la pared celular, síntesis de compuestos de bajo peso molecular (Dixon, 1986), producción de proteínas

relacionadas con la defensa y muerte celular hipersensitiva. Se tienen genes de reconocimiento los cuales codifican proteínas receptoras con rutas de transducción de señales y genes respuesta que codifican proteínas que actúan como factores de defensa o como enzimas biosintéticas en rutas que dirigen a la producción de compuestos de defensa (Kombrink *et al.*, 1993).

Las proteínas de plantas tienen un papel clave en muchos aspectos de la defensa, en factores constitutivos así como del mecanismo de respuesta de resistencia (Blanco-Labra & Aguirre, 2002).

2.2.2. Defensas antipatogénicas adicionales

Algunas defensas son inducidas por el ataque de organismos patógenos, las defensas que solo son producidas después del daño inicial necesitan menor inversión de recursos de la planta que las defensas que están siempre presentes, aunque deben ser activadas con rapidez para que sean efectivas (Taiz & Zeiger, 2006).

Una vez infectadas por un patógeno las plantas despliegan un amplio espectro de defensas, una de ellas es la respuesta hipersensible, por la que las células que rodean la zona de infección mueren rápidamente, privando al patógeno de nutrientes y evitando su expansión. Esta respuesta hipersensible con frecuencia está precedida por la producción de especies reactivas de oxígeno. Las células próximas a la infección sintetizan una gran cantidad de compuestos tóxicos formados por la reducción del oxígeno molecular, incluidos el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). Las especies reactivas de oxígeno pueden contribuir a la muerte celular como parte de la respuesta hipersensible o actuar para matar directamente al patógeno (Kombrink & Somssich, 1995; Lamb y Dixon, 1997; Nürnberger & Scheel, 2001; Taiz & Zeiger, 2006).

Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (1.15.1.1; SOD) constituye una de las defensas primarias contra el estrés oxidativo. Perteneció a la familia de las metaloenzimas que catalizan la reacción de dismutación del radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) a oxígeno (O_2) y a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Bowler *et al.*, 1994). Estas enzimas son importantes en la protección de las células contra efectos tóxicos de los radicales superóxido. El hierro (Fe), cobre (Cu) y manganeso (Mn) son sus cofactores metálicos y de acuerdo a éstas sus propiedades moleculares y su localización cambian (Robledo *et al.*, 2012).

El anión superóxido tiene un alto poder bactericida, así que es posible que este radical por sí solo sea capaz de eliminar microorganismos. El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con el superóxido, generando radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y de oxígeno ($\cdot\text{O}_2$), ambos altamente reactivos y tóxicos (Díaz, 2006). El incremento en la síntesis de SOD puede relacionarse a una alta concentración de especies reactivas de oxígeno que fueron generadas como defensa ante el ataque de un patógeno precediendo una respuesta hipersensible o bien atacando directamente al organismo (Taiz & Zeiger, 2006).

Superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa se estimulan ante la presencia de condiciones desfavorables para las plantas de tomate como estrés hídrico y altas temperaturas, Mazorra y Núñez (2003) encontraron que la concentración de estas enzimas se incrementó cuando sometieron plantas jóvenes de tomate a estrés por altas temperaturas durante dos horas, mientras que Pérez (1999) encontró que la concentración de peroxidasa y superóxido dismutasa se incrementó en plantas de tomate cuando fueron sometidas a estrés por inundación durante 72 horas al inicio del periodo de floración.

2.3. Literatura citada

Agrios, G.N. (2004). *Plant pathology*. (5ta. Ed). United States of America; Elsevier Academic Press. 819 p.

- Al-Musa, A. (1982). Incidence, economic importance, and control of tomato yellow leaf curl in Jordan. *Plant Dis.*, 66, 561–563.
- Bidwell, R. G. S. (1979). *Fisiología vegetal* (2a ed.). México: AGT Editor. 784 p.
- Blanco-Labra, A., & Aguirre M., C. (2002). Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria*, 12 (3), 3–28.
- Bowler C., Van-Camp, W., Van-Montagu, M., & Inze, D. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Review of plant sciences* 13, 199–218.
- Broadbent, L., & Fletcher, J.T. (1963). The epidemiology of tomato mosaic. *Annals of Applied Biology*, 52, 233–241. Doi: 10.1111/j.1744-7348.1963.tb03747.x
- Burnette, F. (1977). Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *J. Food Sci.*, 42, 1–6.
- Calderón M., N. D. (2008). *Algunas reacciones de defensa en diferenciales de Solanum spp. para razas de Phytophthora infestans (Mont.)* Tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 65 p.
- Castellanos, J. Z. (2009). *Manual de Tomate en Invernadero*. Celaya Gto: Ocma. 469 p.
- Chitra, T.R., Prakash, H.S., Albrechtsen, S.E., Shetty, H.S., & Mathur, S.B. (2002). Indexing of leaf and seed samples of tomato and bell pepper for tobamoviruses. *Indian Phytopath.*, 55(1), 84–86.
- Cohen, S., & Nitzany, F. E. (1966). Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology*, 78, 508–512.
- Collinge, D. B., Gregersen, P., & Thordal-Christensen, H. (1994). The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In: Basra, A. S. (Ed.) *Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches* (pp. 391-433). New York: Marcel Dekker.
- Constable, C. P. (1999). *A survey of herbivore-inducible defensive proteins and photochemicals, induced plant defenses against pathogens and herbivores*. Minnesota: The American Phytopathological Society. 137-182.
- Dai, G. H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., & Boubais, D. (1995). Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara vitícola*). *Eur. J. Plan. Pathol.*, 101, 541–547.
- Díaz R., P. (2006). Papel de las actividades superóxido dismutasa y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Estrategias para la estimulación del estallido respiratorio en fagocitos de lenguados cultivados. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga, Málaga. 108 p.
- Dixon, R. A. (1986). The phytoalexin response. Elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biological Reviews* 61, 239-291.
- Dixon, R. A., & Paiva, N.L. (1995). Stress-induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085–1097.

- Dixon, R. A., Choudhary A.D., Dalkin, D., Edwards, R., Fahrendorf, T., Gowri, G., ..., & Paiva, N.L. (1992). Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. *In*: Stafford, H.A. & Ibrahim R.K. (Eds.) *Phenolic Metabolism in Plants*. New York: Plenum Press. 91-138.
- Djanaguiraman, M., Devi, D. D., Sheeba, J. A., Bangarusamy, U., & Babu, R. Ch. (2004). Effect of oxidative stress on abscission of tomato fruits and its regulation by nitrophenols. *Tropical Agriculture Research*, 16, 25–36.
- Goodman, N. R., Kirán, Z., & Wood, K. R. (1986). *The biochemistry and physiology of the plant disease*. Columbia: University of Missouri Press. 433 p.
- Gutierrez, C. (1999). Geminivirus DNA replication. *Celda. Mol. Life Sci.*, 56, 313–329
- Hammond-Kosack, K., & Jones, J.D.G. (2000). Responses to plant pathogens. In B.B. Buchanan, W. Gruissem, & R.L. Jones (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiology (pp. 1102-1156) USA.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., & Robertson, D. (1999). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 18, 71–106.
- Harrison, B. D. (1985). Advances in geminivirus research. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23, 55–82.
- Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., Honma, M., Ohashi, Y. (2000). Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase gene. *FEBS letters*, 471, 245–250.
- Jones, D. H. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry*, 23, 1349–1359.
- Jones, J. B., Stall, R. E., & Zitter, T. A. (2001). *Plagas y enfermedades del tomate*. México: Ediciones Mundi-Prensa. 74 p.
- Kombrink, E., & Somssich, I.E. (1995). Defense responses of plants to pathogens. *Adv. Bot. Res.*, 21, 1–34.
- Kombrink, E., Beerhues, L., García-García, F., Hahlbrock, K., Müller M., Schröder M., ..., & Schmelzer, E. (1993). Expression patterns of defense-related genes in infected and uninfected plants. In Fritig B. & Legrand, M. (Eds.) *Mechanisms of Plant Defense Responses* (pp. 236-249) The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Lamb, C. J. (1994). Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell* 76, 419–422.
- Lamb, C., & Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 251–275.

- Lapidot, M., Weil, G., Cohen, L., Segev, L., & Gaba, V. (2007). Biolistic inoculation of plants with Tomato yellow leaf curl virus DNA. *Journal of Virological Methods*, 144, 143–148.
- Lozoya-Saldaña, H., Almanza-Serrano, Ma. G., & Colinas-León, Ma. T. (2006). Infección mixta *Phytophthora infestans*-Virus X de la papa (PVX) y mecanismos de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agrociencia*, 40, 753–764.
- Lozoya-Saldaña, H., Rivera-Hinojosa, R., & Colinas-León, M. T. (2007). Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amonio-lyasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary). *Agrociencia*, 41, 479–489.
- Madriz O., K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo integrado de plagas*, 63, 22-32.
- Mathews, R. E. F. (1979). Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 12, 132–296.
- Mazorra, L. M., & Núñez, M. (2003). Influencia de análogos de brasinoesteroides en la respuesta de plantas de tomate a diferentes estrés ambientales. *Cultivos tropicales*, 24(1), 35–40.
- Nürnberg, T., & Scheel, D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.*, 6, 372–379.
- Pérez, I. (1999). Comportamiento de variedades de plántulas de tomate en condiciones de inundación del suelo. *Cultivos Tropicales*, 20(2), 41–44.
- Ramamurthy, M.S., Ussuf, K.K., Nair, P.M., & Thomas, P. (2000). Lignin biosynthesis during wound healing of potato tubers in response to gamma irradiation. *Postharvest Biol. Technol.*, 18, 267–272.
- Ramírez, V. J., & Sainz, R. R. (2006). *Manejo integrado de las enfermedades del tomate*. México: Once Ríos. 102 p.
- Robinson, D. S. (1991). Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: P. F. Fox (Ed.), *Food Enzymology* (pp: 399–426, Vol. 1). London: Elsevier.
- Robledo-Esqueda, M. N., Lozoya-Saldaña, H., & Colinas L., M. T., (2012). Inducción de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.) contra *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary por fungicidas. *Interciencia*, 37(9), 689–695.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2016). Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Shalla, T.A. (1964). Assembly and Aggregation of Tobacco Mosaic Virus in Tomato Leaflets. *JBC*, 21(2), 253–264.

- Smith, B.G., & Rubery, P.H. (1981). The effects on infection by *Phytophthora infestans* on the control of phenylpropanoid metabolism in wounded potato tissue. *Planta*, 163, 665–668.
- Stange, C. (2006). Interacción planta-virus durante el proceso infectivo. *Cien. Inv. Agr.*, 33(1), 3–21.
- Strack, D. (1997). Phenolic metabolism. In J. Banner, & J. E. Varner (Eds.), *Plant biochemistry* (pp. 387–416). USA: Academic Press.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Metabolitos secundarios y defensa de las plantas. In Taiz, L. , & Zeiger, E. (Eds.) *Fisiología vegetal* (3ed., pp. 530-580). D.L.: Universitat Jaume I.
- Vidhyasekaran, P. (1997). *Fungal pathogenesis in plants and crops, molecular biology and host defense mechanisms*. USA: Marcel Dekker. 553 p.

SOBREEXPRESIÓN DE ENZIMAS DE DEFENSA EN TOMATE POR INFECCIÓN VIRAL

Gabriela Díaz-García¹, Héctor Lozoya-Saldaña¹, Mario Alberto Vázquez-Peña², María Teresa Colinas-León¹, Efraín Contreras-Magaña¹

¹Departamento de Fitotecnia, ²Departamento de Irrigación, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco Km 38.5 Chapingo Edo. de México. CP 56230.

RESUMEN

El ataque por fitopatógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa de las plantas cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. La presente investigación se realizó con la finalidad de cuantificar la síntesis y/o actividad de fenoles totales (FEN), fenilalanina amonioliase (PAL), peroxidasas (POX), proteínas totales (PRO) y superóxido dismutasa (SOD), en variedades de tomate Condor, susceptible a virosis (S), Raptor (S), Quetzal, resistente (R), y 5999 (R), inoculadas con Virus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV) y Virus del Mosaico del Tabaco (TMV). El testigo absoluto no se inoculó. Se realizaron seis muestreos, se elaboró polvo de acetona y a partir de ahí se realizó la determinación enzimática. El análisis estadístico consistió en un ANAVA factorial y en análisis de correlación. Las plantas infectadas indujeron mayor síntesis/actividad de enzimas y metabolitos que las sanas, siendo TMV el mayor inductor para PAL y SOD y teniendo efecto similar con TYLCV en FEN, POX y PRO. Los genotipos resistentes mostraron mayor síntesis/actividad de los metabolitos en estudio que los genotipos susceptibles, siendo 5999 mejor para FEN, PRO y SOD, y Quetzal para PAL y POX. Se encontró correlación significativa en las variedades Condor y Raptor, ambas susceptibles, para FEN /POX ($r=0.47$ y $r=0.45$) y FEN/PAL ($r=0.27$ y $r=0.45$), mientras que en Quetzal y 5999, ambas resistentes a virosis, la significancia fue para las correlaciones FEN/POX ($r=0.44$ y $r=0.58$), SOD/PRO ($r=0.71$ y $r=0.50$), SOD/PAL ($r=0.61$ y $r=0.52$) y PRO/PAL ($r=0.64$ y $r=0.29$). Se concluye que los virus estimularon mayor síntesis/actividad de los metabolitos en estudio en las plantas enfermas que los sintetizados en plantas sanas. Además, las variedades Quetzal y 5999, resistentes, mostraron mayor actividad enzimática, contenido de compuestos fenólicos y actuaron con mayor rapidez que las variedades Condor y Raptor, susceptibles.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* L., enzimas de defensa, TYLCV, VMT.

SUMMARY

Plant pathogen attack is an unfavorable condition that usually triggers a series of defense mechanisms in plants in order to stop, slow, or counteract the infection. The present research was carried out with the aim of quantify the synthesis and/or activity of total phenols (FEN), phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidases (POX), total proteins (PRO), and superoxide dismutase (POX), in four tomato cvs., two virus susceptible, Condor and Raptor, and two virus resistant, Quetzal and 5999, inoculated with the Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus (TYLCV) and the Tobacco Mosaic Tobamovirus (TMV). The control was not inoculated. After six samplings acetone powder was obtained as the baseline for the enzymatic studies. Statistical analysis included a factorial ANOVA and correlation analysis. Infected plants induced more enzyme/metabolite synthesis/activity than the healthy ones. TMV induced the most PAL and SOD activity, while TYLCV did it to FEN, POX, and PRO. Resistant genotypes showed more synthesis/activity of the metabolites under study than the susceptible ones. Cultivar 5999 was the best for FEN, PRO, and SOD, and cv. Quetzal for PAL and POX. Significant correlation was detected in susceptible cvs. Condor and Raptor for FEN /POX ($r=0.47$ and $r=0.45$) and FEN/PAL ($r=0.27$ and $r=0.45$), while for virus-resistant cvs. Quetzal and 5999 it was for FEN/POX ($r=0.44$ and $r=0.58$), SOD/PRO ($r=0.71$ and $r=0.50$), SOD/PAL ($r=0.61$ and $r=0.52$) and PRO/PAL ($r=0.64$ and $r=0.29$). We conclude that viruses stimulate more synthesis/activity of the metabolites under study in diseased plants than in healthy ones. In addition, resistant cvs. Quetzal and 5999 showed more enzymatic activity and phenolic compound content and acted sooner than susceptible cvs. Condor and Raptor.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., defense enzymes, TYLCV, TMV.

INTRODUCCIÓN

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección (Madriz, 2002). Las plantas poseen mecanismos preformados y mecanismos inducidos de defensa. Los

mecanismos inducidos de defensa se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno e involucra cambios claros en el metabolismo relacionados con la biosíntesis de enzimas y metabolitos secundarios (Madriz, 2002). Los compuestos fenólicos (FEN) forman parte integral de la estructura de la pared celular, principalmente de ligninas y suberinas para resistencia, soporte mecánico y barreras protectoras contra infección microbiana, además de proporcionar resistencia inducida por medio de fitoalexinas (Dai *et al.*, 1995). La Fenilalanina amonio-liasa (EC. 4.3.1.5; PAL) es precursora de la ruta de los fenilpropanoides. La PAL es una enzima clave para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, como las fitoalexinas y lignina y puede ser determinante para la activación de una gran cantidad de mecanismos de defensa (Lozoya *et al.*, 2007). La Peroxidasa (EC. 1.11.1.7; POX) es la enzima que cataliza la oxidación de donadores de hidrógeno empleando como sustrato peróxido de hidrógeno (Burnette, 1977). Existe un amplio número de proteínas incluyendo a las enzimas que se han descrito como parte de mecanismos de defensa de las plantas (Blanco-Labra & Aguirre, 2002). La superóxido dismutasa (1.15.1.1; SOD) constituye una de las defensas primarias contra el estrés oxidativo (Taiz & Zeiger, 2006).

El objetivo del presente fue cuantificar la síntesis/actividad de Fenoles, Proteína soluble, Fenilalanina amonioliasa, Peroxidasa, y Superóxido dismutasa en variedades de tomate resistentes y susceptibles inoculadas con TMV y TYLCV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y tratamientos

Se estableció un diseño de tratamientos factorial 3X4 en un diseño experimental completamente al azar ($r=3$). El factor virus tuvo como niveles; testigo/planta sana, planta inoculada con Virus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV) y Planta inoculada con Virus del

Mosaico del Tabaco (TMV), mientras que el factor variedad: Condor, Raptor, Quetzal y 5999, siendo éstas últimas resistentes a Virus del Rizado Amarillo del Tomate (TYLCV) y Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) y las dos primeras susceptibles.

Inoculación

Las plantas se establecieron bajo invernadero y la inoculación se realizó tres semanas después del trasplante. Los inóculos fueron obtenidos de plantas enfermas de tomate previamente colectadas. La solución vírica fue preparada con hojas infectadas de cada virus y solución buffer Dieka (0.25M, pH 7), la dilución fue 1:10. Se realizó una prueba Elisa (Agdia Incorporated; Elkhart, Indiana) para confirmar la presencia de virus en las plantas.

Muestreo

Se tomaron muestras cada dos semanas iniciando diez días después de la inoculación hasta completar seis muestreos (10, 25, 40, 55, 70 y 85 días después de la inoculación). Cada muestreo consistió en la toma de 40 g de folíolos maduros del dosel medio de la planta. Cada muestra se congeló para el posterior análisis.

Determinación enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática se elaboró polvo de acetona de acuerdo a la metodología desarrollada por Alia-Tejacal *et al.* (2002). A partir de 40 g de folíolo se adicionaron 100 ml de acetona fría, se licuó por 30 segundos y se filtró al vacío. Se repitió el procedimiento anterior en seis ocasiones. El polvo se dejó secar a temperatura ambiente, se registró el peso y fue congelado para el análisis enzimático, el extracto de acetona se refrigeró para la determinación de fenoles totales.

Fenoles totales

La determinación se realizó mediante la metodología Folin-Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994). Se agregaron 150 µl de cada extracto en tubos de fondo plano. Se agregaron 850 µl de agua destilada y se agitó. Se añadieron 7 ml de agua destilada y 500 µl de reactivo Folin-Ciocalteu (2N), se dejaron reposar durante ocho minutos, se adicionó 1.5 ml de Carbonato de sodio (20 %), se mezcló y se dejó reposar por dos horas en completa oscuridad. Concluidas las dos horas las muestras se leyeron a 760 nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts).

Fenilalanina amonioliasa

La determinación de fenilalanina amonioliasa se realizó mediante la metodología descrita por Martínez-Téllez y Lafuente (1997). A partir de 0.1 g de polvo de acetona se agregaron 5 ml de Buffer Tampón Borato-Sodio (0.1 M, pH 8.8, 1 % Polivinilpirrolidona) + Mercaptoetanol (0.12 %), se homogeneizó en frío (T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA), se filtró y la solución fue vertida en tubos de centrifuga. La mezcla se centrifugó (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 20 070 g, 4 °C durante 20 minutos. Se agregó sulfato de amonio (0.46 g por ml de solución) y se agitó vigorosamente. Los tubos fueron colocados en baño de hielo y agitados (Max Q 4450, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) durante 20 min a 15 °C, posteriormente centrifugados (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 20 070 g, 4 °C durante 20 minutos. Para el ensayo de la actividad PAL se utilizaron dos series de tubos, en la serie 1 se agregó 4 ml de agua bidestilada (pH 7.7) y 2 ml de extracto, en la serie 2 se añadió 3.4 ml de agua bidestilada (pH 7.7) y 2 ml de extracto, ambas se llevaron a incubación a 39 °C en baño maría. Se dejaron reposar por 10 min, a la serie 2 se agregó 600 µl de L-fenilalanina, se agitaron y fueron tomadas ambas lecturas a 290

nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts). Se dejó reposar 2 hrs incubando a 39 °C y se tomó la lectura nuevamente.

Peroxidasa

La actividad de peroxidasa se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Flukey y Jen (1978). A partir de 0.05 g de polvo de acetona en tubos de fondo plano, se agregaron 5 ml de TRIS-HCl + PVP (0.1 M, pH 7.1, 1 % Polivinilpirrolidona). La mezcla fue homogenizada en frío (T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA) durante 30 s. La mezcla fue centrifugada (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 22 617 g, 4 °C durante 30 minutos. El ensayo de actividad enzimática consistió en: añadir 2.5 ml de TRIS-HCl (0.1 M, pH 7.1), 0.1 ml de Peróxido de hidrógeno (0.25 %), 0.25 ml de Guaiacol (0.1 M) y 0.15 ml de muestra. Tomar las lecturas a los 30, 60, 90 y 120 s a 470 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts).

Proteína Soluble

Se empleó la metodología propuesta por Bradford (1976). A partir de 0.05 g de polvo de acetona en tubos de fondo plano, se agregaron 5 ml de TRIS-HCl + PVP (0.1 M, pH 7.1, 1 % Polivinilpirrolidona). La mezcla fue homogenizada en frío T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA) durante 30 s. La mezcla fue centrifugada (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 22 617 g, 4 °C durante 30 minutos. A tubos de fondo plano se agregaron 5 ml de reactivo Bradford + 0.1 ml de extracto, se dejaron reposar por 12 minutos en ausencia de luz y se leyeron a 595 nm.

Superóxido dismutasa

La determinación de Superóxido dismutasa se realizó mediante la metodología descrita por Beyer y Fridovich (1987). A partir 0.05 g de polvo de acetona en tubos de fondo plano, se

añadieron 5 ml de Buffer Fosfatos (0.01M, pH 7.8). La mezcla fue homogenizada en frío T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA) durante 30 s. La mezcla fue centrifugada (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 22 617 g, 4 °C durante 30 minutos. En ausencia de luz se preparó una mezcla con: 81 ml de Buffer Fosfatos + EDTA (0.01M, pH 7.8), 4.5 ml de L-metionina, 3 ml de Nitrotetrazolium blue y 2.25 ml de Triton X-100. A tubos de rosca se añadieron 3 ml de la mezcla anterior y 500 µl de muestra, tres tubos más fueron tomados como blanco y se les añadió 3 ml de mezcla y 500 µl de Buffer Fosfatos (0.1M, pH 7.8), se agitaron y a todos se les agregó 30 µl de riboflavina. Bien agitados se sometieron a luz fluorescente durante siete minutos. El cambio de absorbancia se leyó a 560 nm.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, 9.0), el cual consistió en ANAVA y comparaciones de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) por variedad para cada fecha de muestreo, mientras que para conocer la relación entre enzimas se realizó un análisis de correlación general y otro por variedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenoles Totales

Se registró un incremento en el contenido de fenoles totales en función del tiempo. En la variedad Condor (S) los tratamientos con virus (TYLCV y TMV) indujeron mayor síntesis de fenoles (Tukey, $P\leq 0.05$) a los 10 y 55 ddi, posteriormente la inducción de compuestos fenólicos fue igual o ligeramente mayor en las plantas que no fueron inoculadas (Figura 1a, Cuadro 2)). En la variedad Raptor (S) no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P\leq 0.05$) entre las plantas inoculadas y las no inoculadas a los 10, 25, 40 y 85 ddi, el tratamiento testigo mostró menor síntesis de compuestos fenólicos con relación a plantas con virus a los 55 ddi, mientras

que a los 70 ddi indujo la misma cantidad que plantas inoculadas con TMV, por lo tanto no existió diferencia notoria entre tratamientos con o sin virus (Figura 1B, Cuadro 2). Los tratamientos con virus en la variedad Quetzal (Figura 1C, Cuadro 2) indujeron mayor síntesis de fenoles con relación al testigo a los 25, 40 y 55 ddi, mientras que a los 10, 70 y 85 ddi no existió diferencia estadística significativa entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

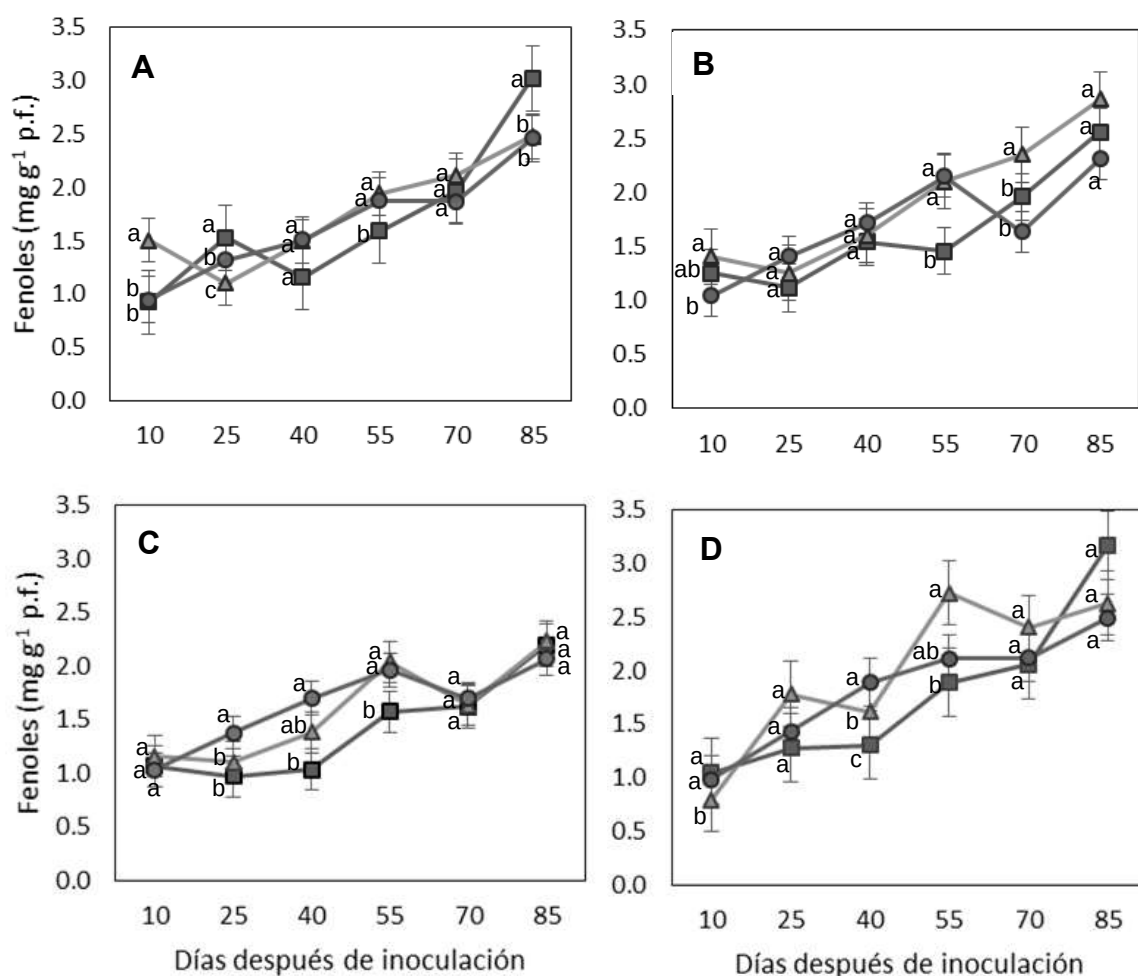


Figura 1. Contenido de fenoles totales; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); —■— Testigo, —▲— TYLCV, —●— TMV.

En la variedad 5999 (Figura 1D, Cuadro 2) los tratamientos con virus indujeron mayor síntesis de fenoles que el testigo a los 25, 40, 55 y 70 ddi. A los 10 ddi el testigo y las plantas inoculadas con TMV mostraron mayor contenido de compuestos fenólicos, mientras que a los 85 ddi no existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.

Respecto al comportamiento entre variedades, la variedad 5999 indujo mayor síntesis de compuestos fenólicos que el resto, las dos variedades susceptibles (Condor y Raptor) tuvieron un comportamiento similar, mientras que Quetzal, que al igual que 5999 es resistente, mostró una baja síntesis de compuestos fenólicos con relación al resto (Figura 1). El genotipo tiene influencia sobre los mecanismos de defensa de las plantas, la síntesis de fenoles son asociados a la característica de resistencia/susceptibilidad del genotipo (Lozoya *et al.*, 2007), siendo mayor en genotipos resistentes que en susceptibles (Dai *et al.*, 1995).

Fenilalanina amonioliasa

La actividad de fenilalanina amonio-liasas fue variable en función del tiempo. La variedad Condor (S) inoculada con virus presentó mayor actividad de PAL a los 10 ddi, siendo TYLCV el que indujo más actividad respecto a TMV, posteriormente el testigo y las plantas inoculadas indujeron actividad enzimática muy similar; a los 25 y 85 ddi las plantas inoculadas con TYLCV y el testigo no mostraron diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$) respecto al tratamiento con TMV, el cual presentó mayor actividad. Mientras que a los 40 y 55 ddi el tratamiento con TYLCV fue diferente estadísticamente de las plantas inoculadas con TMV y el testigo. A los 70 ddi la actividad de PAL no tuvo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Figura 2A, Cuadro 3). Se registró baja diferencia entre plantas inoculadas y las no inoculadas, lo que sugiere que el efecto de los virus no induce mayor síntesis de compuestos fenólicos. El comportamiento de la variedad Raptor (S) fue variable, TMV fue el virus que indujo mayor actividad enzimática a partir de los 25 ddi. El testigo incrementó la actividad de PAL entre los 10 y 25 ddi, posteriormente ésta disminuyó considerablemente con relación a las plantas inoculadas con TMV, mientras que tuvo actividad ligeramente menor con respecto a TYLCV (Figura 2B, Cuadro 3). En la variedad resistente Quetzal las plantas inoculadas con TYLCV

presentaron la mayor actividad a los 10 ddi, sin embargo ésta fue disminuyendo con el paso de los días, llegando a los 85 ddi donde no tuvo diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$) con el testigo. El tratamiento con TMV fue el que a partir de los 40 ddi indujo la mayor actividad enzimática incrementándose en función del tiempo, obteniéndose la mayor actividad a los 85 ddi. El tratamiento testigo indujo incremento ligero de la actividad enzimática, manteniéndose estable (Figura 2C, Cuadro 3).

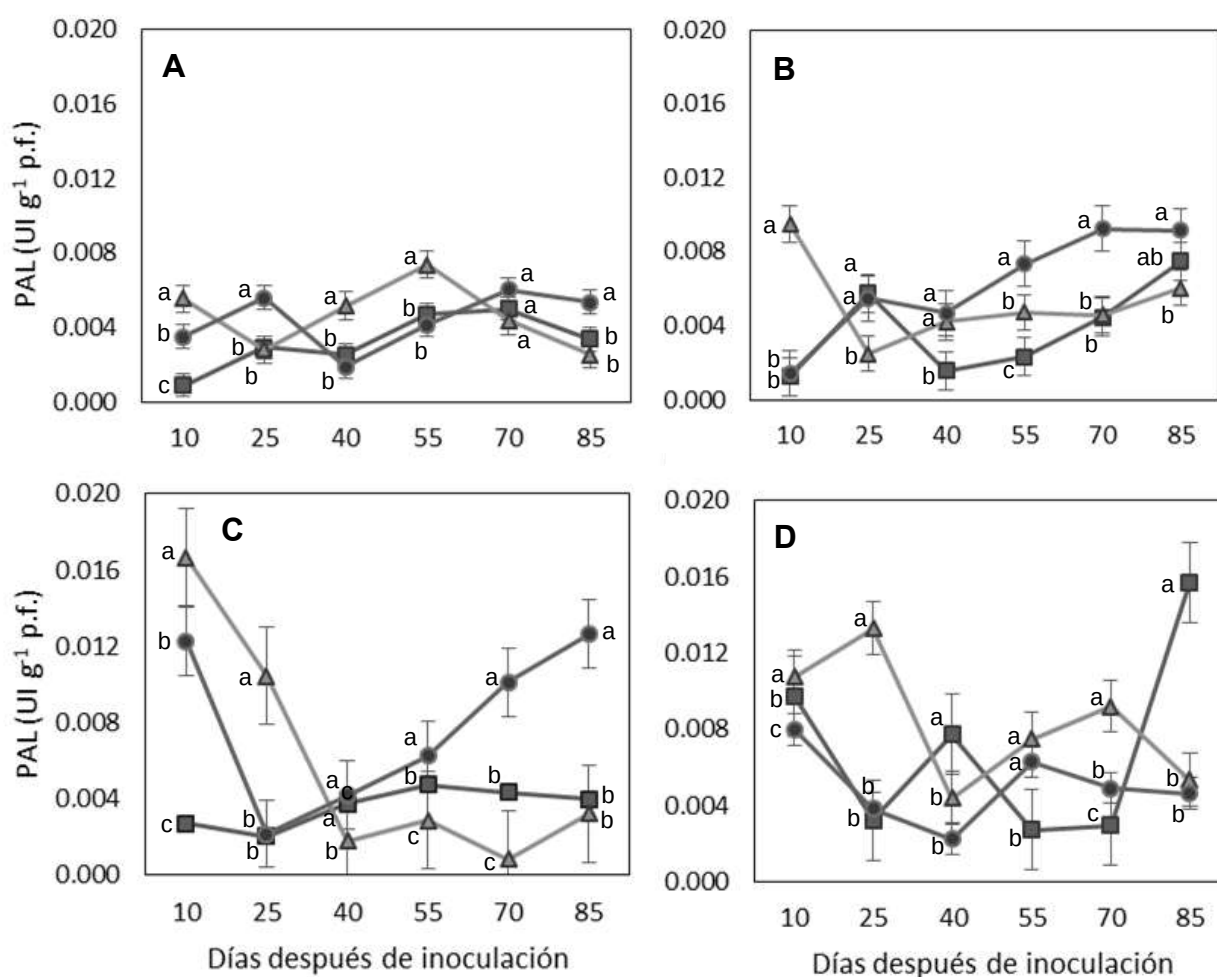


Figura 2. Actividad de PAL; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); ■— Testigo, ▲— TYLCV, ●— TMV.

En la variedad 5999 (R), las plantas inoculadas con TYLCV mostraron mayor inducción en la actividad de PAL a los 10, 25, 55 y 70 ddi, mientras que las plantas no inoculadas mostraron

mayor actividad a los 85 ddi. La inducción por TMV fue baja y se mantuvo ligeramente estable con respecto al testigo y a TYLCV, mostrando mayor síntesis que el testigo a los 55 ddi (Figura 2D, Cuadro 3).

Respecto al comportamiento entre variedades se tuvo lo esperado (Lozoya *et al.*, 2010), variedades resistentes (Quetzal y 5999; Figura 2C y 2D) mostraron una reacción a la infección inmediata induciendo mayor actividad de PAL con relación a variedades susceptibles (Figura 2A y 2B).

Peroxidasa

La actividad específica de Peroxidasa fue variable, en el genotipo Condor, los tratamientos tuvieron un comportamiento similar durante los primeros 40 días (Tukey, $P \leq 0.05$), a partir de ahí las plantas inoculadas con TYLCV mostraron un incremento considerable con respecto a las plantas inoculadas con TMV y al testigo. A los 85 ddi todos los tratamientos disminuyeron la actividad de POX, lo cual se atribuye a senescencia, mientras que el punto máximo de actividad se registró a los 70 ddi. El testigo y el tratamiento con TMV tuvieron un comportamiento similar a excepción de ligeras diferencias a los 55 y 85 ddi, donde el tratamiento con TMV mostró mayor actividad específica de POX (Figura 3A, Cuadro 4). En este genotipo se determina que el efecto de virus induce mayor actividad específica de peroxidasa como mecanismo de defensa. La actividad específica de POX en la variedad Raptor (S) se fue incrementando en función del tiempo, la mayor actividad se registró a los 70 ddi para todos los tratamientos. Existieron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos, el testigo indujo mayor síntesis que los tratamientos con virus a los 10, 55 y 85 ddi (fase inicial, intermedia y final del cultivo), mientras que plantas inoculadas con TYLCV tuvieron actividad enzimática inferior al testigo a excepción de un periodo (70 ddi). El tratamiento con TMV fue el que en promedio indujo menor actividad de POX (a los 10, 55, 70

y 85 ddi), sin embargo mostró actividad enzimática estable con el paso del tiempo, lo que no ocurrió con los otros tratamientos ya que fueron muy variables (Figura 3B, Cuadro 4).

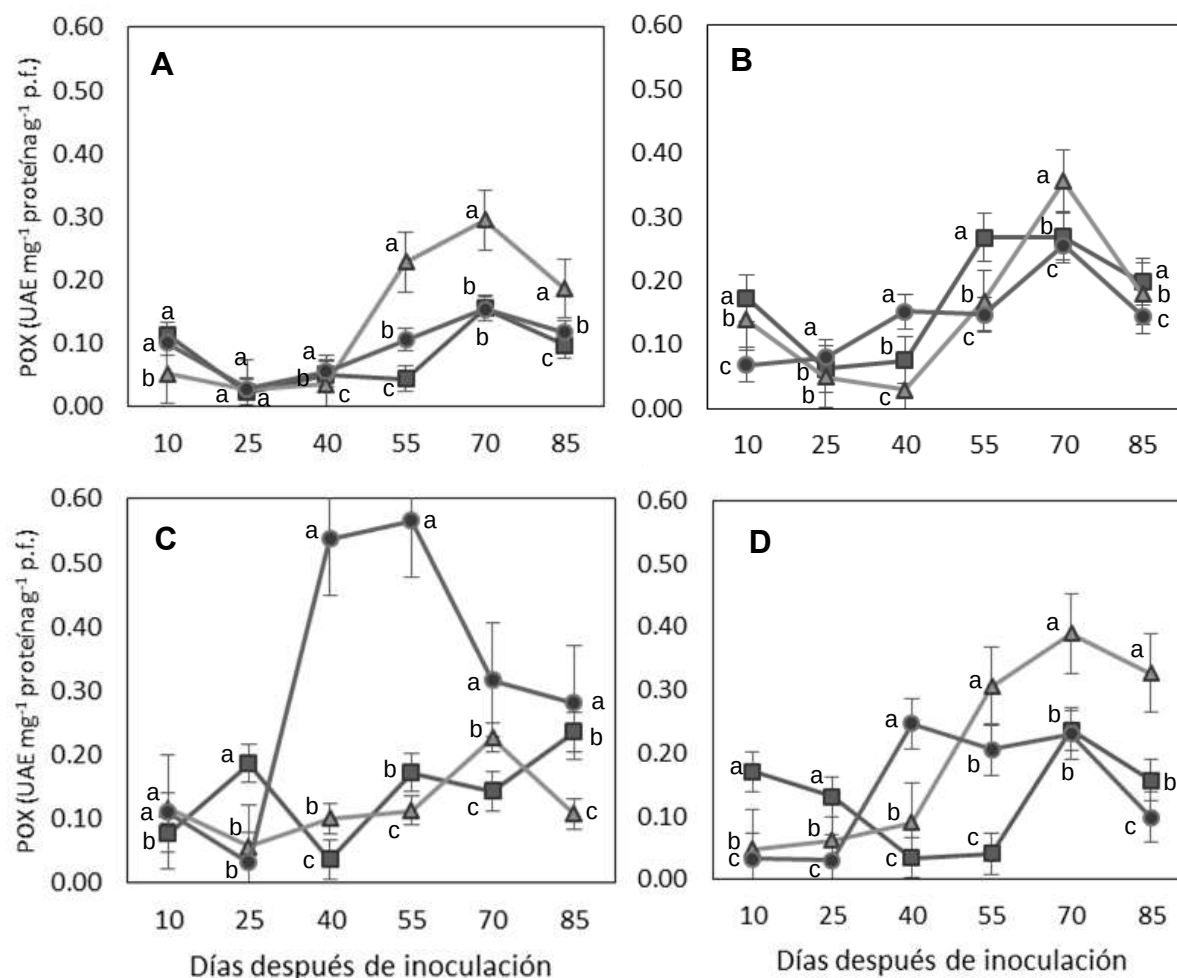


Figura 3. Actividad de POX; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); ■— Testigo, ▲— TYLCV, ●— TMV.

Se registró actividad variable de POX en la variedad Quetzal (R), las plantas inoculadas con TMV mostraron una alta actividad específica con relación a las plantas inoculadas con TYLCV y a las no inoculadas. A los 10 ddi el comportamiento de los tres tratamientos fue similar siendo estadísticamente mayor las plantas inoculadas (TMV y TYLCV), para los 25 ddi las plantas correspondientes al testigo tuvieron actividad enzimática mayor que las plantas con virus, sin embargo a partir de los 40 ddi fue el TMV el que indujo la mayor actividad enzimática registrada para la variedad quetzal y en general de las cuatro variedades evaluadas. La disminución registrada a los 85 ddi se atribuye al efecto de senescencia en la planta (Verdecia *et al.*, 2012).

El comportamiento de las plantas inoculadas con TYLCV y el testigo fueron estadísticamente diferentes entre sí, sin embargo los valores fueron cercanos entre ellos y distantes de las plantas inoculadas con TMV (Figura 3C, Cuadro 4).

La variedad 5999 (R) presentó mayor actividad específica de POX en plantas inoculadas con virus a partir de los 40 ddi, siendo las plantas con TYLCV las que alcanzaron el pico de actividad a los 70 ddi. Las plantas inoculadas con TMV mostraron actividad más estable con relación al resto, mientras que el testigo tuvo actividad variable, siendo estadísticamente superior a los tratamientos con virus los primeros 25 ddi, disminuyendo su actividad a los 40 y 55 ddi para después incrementarla nuevamente a los 75 ddi. En este genotipo se determina que el efecto de virus induce mayor actividad enzimática de peroxidasa como mecanismo de defensa.

La condición resistencia/susceptibilidad del genotipo fue evidente en la variedad Quetzal (Figura 3C) la cual tuvo mayor actividad específica de POX que las variedades susceptibles (Figuras 3A y 3B), sin embargo, la variedad 5999 (Figura 3D) tuvo un comportamiento similar que las variedades susceptibles, lo cual puede deberse a otros factores como la severidad de la infección. El genotipo tiene influencia sobre los mecanismos de defensa de las plantas, la síntesis de fenoles, enzimas como fenilalanina amonio-*liasa* y peroxidasa y proteínas son asociados a la característica de resistencia/susceptibilidad del genotipo (Lozoya *et al.*, 2007), siendo mayor en genotipos resistentes que en susceptibles (Fortunato *et al.*, 2015).

Proteína soluble

Se registró un comportamiento variable en el contenido de proteínas. En la variedad Condor (S) (Figura 4A, Cuadro 5) los tratamientos con virus (TYLCV y TMV) indujeron mayor síntesis de proteínas con respecto a las plantas no inoculadas hasta los 40 ddi. A partir de los 55 ddi el testigo registró mayor contenido, alcanzando el mismo comportamiento a los 85 ddi (sin

diferencias estadística significativas (Tukey, $P \leq 0.05$)). Se determinó que los virus tienen efecto sobre la inducción de proteínas en las primeras etapas de la infección.

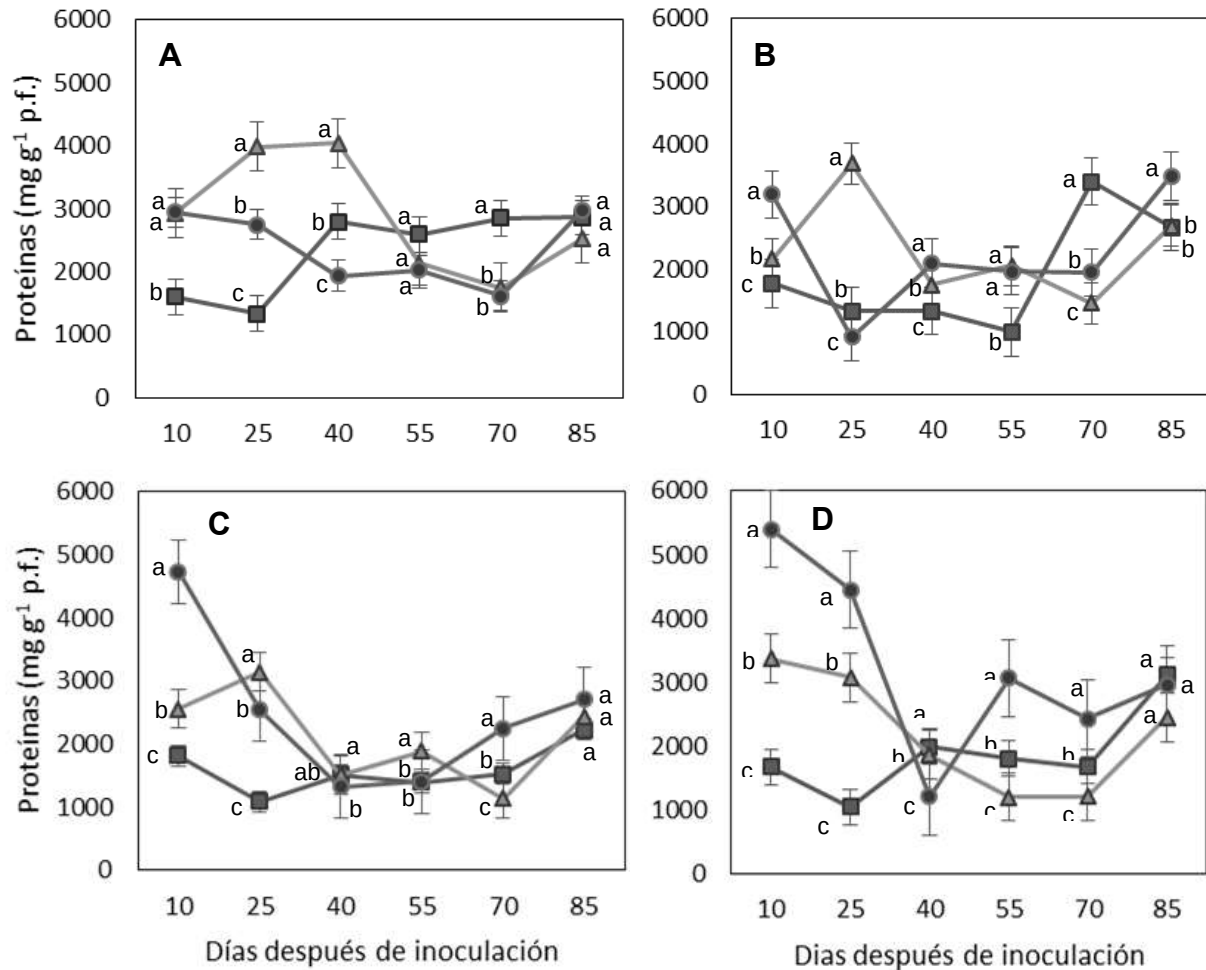


Figura 4. Contenido de Proteínas; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); —■— Testigo, —▲— TYLCV, —●— TMV.

La variedad Raptor (S), tuvo un comportamiento distinto, las plantas no inoculadas registraron bajo contenido de proteínas hasta los 70 ddi donde se incrementó notoriamente. En los tratamientos con virus el contenido de proteínas fue similar a los 40, 55 y 70 ddi, las plantas inoculadas con TYLCV alcanzaron el mayor valor a los 25 ddi y el menor a los 70, mientras que las plantas inoculadas con TMV alcanzaron su menor valor a los 25 ddi y el mayor a los 85 ddi. Se determinó que los virus tienen influencia directa sobre el contenido de proteínas

en las plantas induciendo mayor síntesis con respecto a las plantas sanas (Figura 4B, Cuadro 5). La variedad Quetzal registró comportamiento variable en contenido de proteínas, las plantas inoculadas con TMV registraron el mayor contenido de proteínas al inicio de la infección con respecto a los otros tratamientos, sin embargo con el paso del tiempo éste fue disminuyendo considerablemente e incrementando nuevamente al finalizar el periodo de evaluación (85 ddi). Las plantas inoculadas con TYLCV fueron superiores al testigo hasta los 55 ddi, a partir de ahí se tuvo un comportamiento similar al testigo. Éste último tuvo un comportamiento más estable con relación a los tratamientos con virus, mostrando un ligero incremento a partir de los 55 ddi. Los tratamientos con virus indujeron mayor síntesis de proteínas con relación al testigo en los primeros días después de inoculación (Figura 4C, Cuadro 5). En la variedad 5999 las plantas inoculadas con virus mostraron una mayor síntesis de proteína soluble los primeros días después de inoculación con referencia a las plantas sanas, siendo TMV el virus que indujo mayor síntesis en la etapa inicial, sin embargo, el contenido de proteínas se redujo abruptamente a los 40 ddi, cayendo por debajo de los otros tratamientos, se incrementó nuevamente a partir de los 55 ddi. El tratamiento con TYLCV mostró un comportamiento de campana invertida, alta síntesis al inicio, baja al medio y alta al final, aunque por debajo de los otros tratamientos (TMV y testigo). Las plantas no inoculadas (testigo) se mantuvieron estables (Figura 4D, Cuadro 5).

La condición resistencia/susceptibilidad del genotipo fue evidente en las variedades resistentes (Quetzal, Figura 4C; 5999, Figura 4D) ya que, con respecto de las susceptibles, registraron mayor contenido de proteína soluble al inicio de la infección (10 ddi) y corroboran lo descrito en otros estudios (Lozoya *et al.*, 2010) en los que se indica que los genotipos resistentes responden antes y con mayor intensidad que los genotipos susceptibles.

Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa tuvo un comportamiento general similar, en la variedad Condor (Figura 5A, Cuadro 6) la actividad de SOD fue alta en las plantas inoculadas con virus, siendo TMV el virus que indujo mayor actividad enzimática, sin embargo, esta elevada actividad no fue constante ya que a partir de los 25 ddi la actividad disminuyó drásticamente en un 80%. Las plantas inoculadas con TYLCV tuvieron menor actividad que las plantas inoculadas por TMV pero mayor que el testigo, al igual que TMV mostraron disminución a los 25 ddi y partir de los 40 ddi fue el tratamiento que indujo mayor actividad enzimática hasta los 70 ddi en donde ya no existieron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). El testigo, al igual que los tratamientos con virus, tuvo la máxima actividad de SOD a los 10 ddi, disminuyendo con el paso de los días y a partir de los 55 ddi incrementando ligeramente. Se determinó que los virus inducen mayor actividad de SOD. En la variedad Raptor las plantas inoculadas con TMV presentaron mayor actividad enzimática a los 10, 55, 70 y 85 ddi, en los que a partir de los 55 ddi no tuvo diferencias estadísticas significativas con las plantas inoculadas con TYLCV. El testigo tuvo alta actividad enzimática los primeros 40 ddi, posteriormente disminuyó hasta los 85 ddi en los cuales no tuvo diferencias estadísticas significativas con los tratamientos con virus. El tratamiento con el virus TYLCV tuvo alta actividad enzimática a partir de los 25 ddi teniendo un comportamiento estable durante todo el periodo. Los virus propician mayor actividad enzimática con relación a plantas sanas, sin embargo este comportamiento es más visible a partir de los 25 ddi (Figura 5B, Cuadro 6). En la variedad Quetzal las diferencias estadísticas significativas se encontraron a los 10 ddi, siendo las plantas inoculadas con TMV las que registraron mayor actividad de SOD, seguidas por las inoculadas con TYLCV, a los 25, 40 y 55 ddi el comportamiento entre tratamientos fue

similar estadísticamente, y a los 70 t 85 ddi las plantas con virus tuvieron mayor actividad enzimática que las plantas no inoculadas (Figura 5C, Cuadro 6).

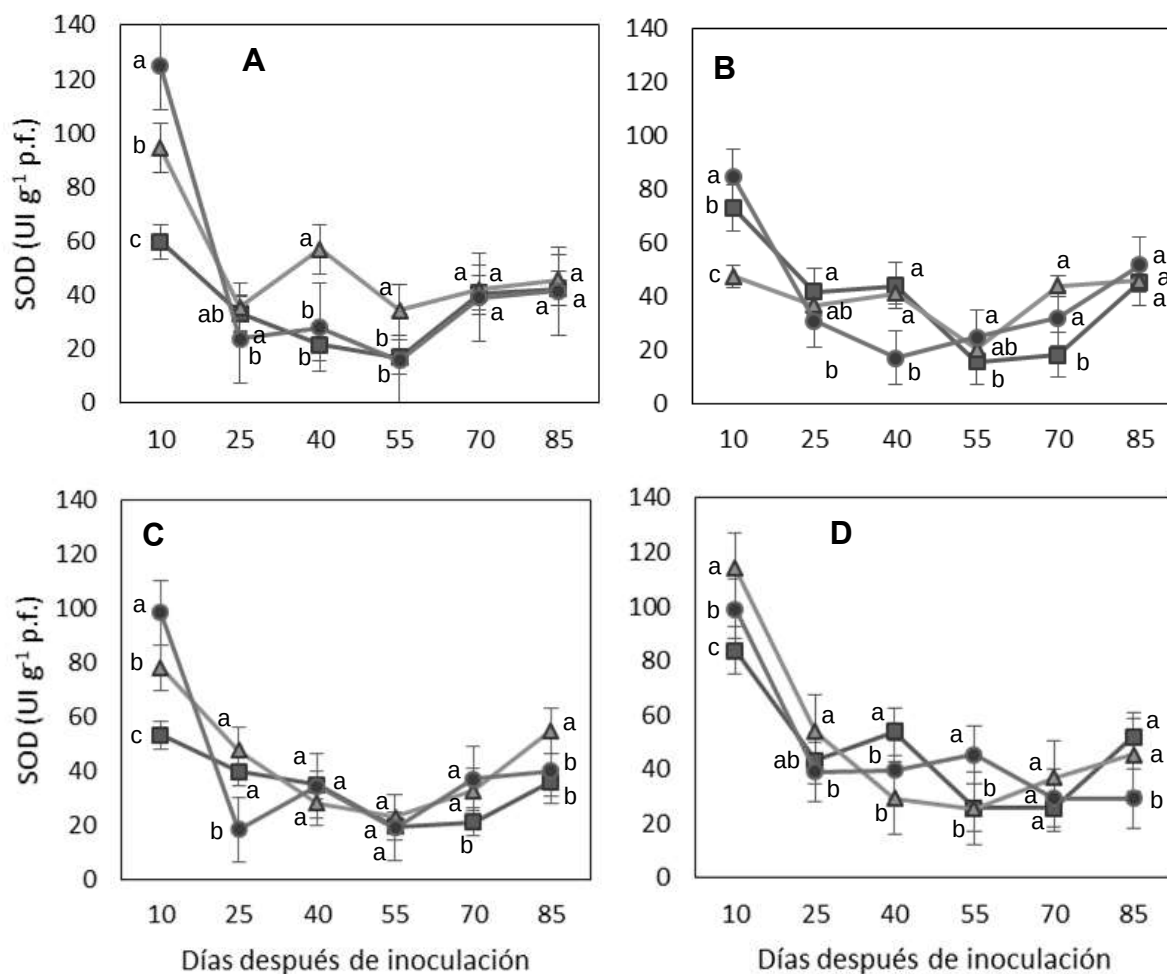


Figura 5. Actividad de SOD; A, Condor (S); B, Raptor (S); C, Quetzal (R) y D, 5999 (R); ■— Testigo, ▲— TYLCV, ●— TMV.

La actividad de SOD en la variedad 5999 fue alta a los 10 ddi para los tres tratamientos, siendo TYLCV el virus que indujo mayor actividad, seguido del virus TMV. A los 25, 55 y 85 ddi plantas inoculadas con TYLCV y plantas no inoculadas no mostraron diferencias estadísticas significativas, mientras que a los 70 ddi no hubo diferencia entre tratamientos. Se determinó que los virus inducen mayor actividad enzimática de SOD con relación al testigo al

inicio de la infección, posteriormente la diferencia entre la actividad por inducción por virus y actividad en plantas sanas es variable (Figura 5D, Cuadro 6).

El comportamiento de las variedades resistentes ante el ataque del virus fue el esperado (Figura 5C y 5D); alta actividad enzimática al inicio de la infección, la variedad susceptible Raptor (Figura 5B) mostró una respuesta más baja a la infección (Lozoya *et al.*, 2010), la variedad Condor no mostró el comportamiento esperado ya que presentó actividad enzimática muy elevada al inicio de la infección (Figura 5A).

Análisis de correlación

Las correlaciones significativas encontradas se registran en el Cuadro 1. La correlación FEN/POX se registró para el análisis general y en las cuatro variedades evaluadas, siendo mayor en la variedad resistente 5999.

Cuadro 1. Coeficientes de correlación (r) con significancia estadística entre variables.

	Variedad	Resistencia	r
FEN/POX	General		0.41
	Condor	S	0.47
	Raptor	S	0.45
	Quetzal	R	0.44
	5999	R	0.58
FEN/PAL	Condor	S	0.27
	Raptor	S	0.45
FEN/SOD	General		-0.33
	Quetzal	R	-0.37
	5999	R	-0.59
SOD/PRO	General		0.43
	Quetzal	R	0.71
	5999	R	0.50
SOD/PAL	General		0.32
	Quetzal	R	0.61
	5999	R	0.52
PRO/PAL	General		0.30
	Quetzal	R	0.64
	5999	R	0.29

S, susceptible; R, resistente.

La correlación FEN/PAL solo fue significativa en variedades susceptibles, siendo superior en la variedad Raptor, mientras que las correlaciones significativas entre FEN/SOD, SOD/PRO, SOD/PAL y PRO/PAL solo se encontraron en el análisis general y en las variedades resistentes, siendo superior la variedad 5999 para la primera y Quetzal para las restantes. De acuerdo a lo anterior se observa que las variedades susceptibles tuvieron únicamente dos correlaciones significativas correspondientes mientras que las variedades resistentes tuvieron cinco correlaciones significativas entre variables (Cuadro 1).

CONCLUSIONES

Los virus indujeron mayor síntesis/actividad de compuestos y enzimas en las plantas infectadas que los sintetizados en plantas sanas. Las variedades resistentes (Quetzal y 5999) mostraron mayor actividad enzimática, contenido de compuestos fenólicos y proteína soluble, y actuaron con mayor rapidez que las variedades susceptibles (Condor y Raptor). Se encontró relación entre enzimas, proteínas solubles y compuestos fenólicos, siendo mayor en variedades resistentes que en susceptibles.

BIBLIOGRAFÍA

Alia-Tejagal 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.

Beyer W. F. and I. Fridovich (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161:556–566.

Blanco-Labra A. y C. Aguirre M. (2002). Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta Universitaria* 12: 3–28.

- Bradford M. N. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Burnette F. (1977).** Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *Journal Food Sciences* 42: 1–6.
- Dai G. H., C. Andary, L. Mondolot-Cosson and D. Boubais (1995).** Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *European Journal of Plant Pathology* 101: 541–547.
- Flurkley W. H. and J. J. Jen (1978).** Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science* 43:1828–1831.
- Fortunato A. A., D. DeBona, A. M. Almeida and F. Ávila (2015).** Changes in the Antioxidant System in Soybean Leaves Infected by *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology* 105:1050–1058.
- Lozoya-Saldaña H., A. Juárez-Cruz, M. T. Colinas-León and J. Bamberg (2010).** Activación enzimática de especies de *Solanum* contra *Phytophthora infestans* (Mont., de Bary). *Interciencia* 35: 586–591.
- Lozoya-Saldaña H., H. Rivera-Hinojosa and M. T. Colinas-León (2007).** Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amonio-lyasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) Contra el Tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary). *Agrociencia* 41:479–489.
- Madriz O. K. (2002).** Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo integrado de plagas* 63:22-32.

- Martínez-Téllez, M. A. and M. T. Lafuente (1997).** Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled fortune mandarin fruit. *Journal Plant Physiology* 150:674–678.
- Taiz, L. and E. Zeiger (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.
- Verdecia, D. M., H. Herrera, J. L. Ramírez, I. Leonard, Y. Álvarez, Y. Bazán, Y. Arceo, R. Bodas, S. Andrés, J. Álvarez, F. Giráldez and S. López (2012).** Valor nutritivo de *Leucaena leucocephala*, con énfasis en el contenido de metabolitos secundarios. *Revista Electrónica de Veterinaria* 13: 1–10.
- Waterman, P. G. and S. Mole (1994).** Analysis on phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.

APÉNDICES

Apéndice 1. Comparación de medias

Cuadro 2. Comparación de medias para Fenoles Totales (FEN).

Variedad	Virus	Días después de inoculación					
		10	25	40	55	70	85
Conдор (S) ^y	Testigo	0.9240 b ^z	1.5300 a	1.1547 a	1.5938 b	1.9671 a	3.0227 a
	TYLCV	1.5016 a	1.0996 c	1.4930 a	1.9464 a	2.1168 a	2.4770 b
	TMV	0.9471 b	1.3183 b	1.5099 a	1.8742 a	1.8718 a	2.4568 b
	DMSH	0.1363	0.2085	0.3639	0.2535	0.381	0.3725
Raptor (S)	Testigo	1.2561 ab	1.1154 a	1.5428 a	1.4563 b	1.9605 b	2.5565 a
	TYLCV	1.4054 a	1.2562 a	1.6019 a	2.1027 a	2.3499 a	2.8638 a
	TMV	1.0444 b	1.4064 a	1.7183 a	2.1510 a	1.6363 b	2.3117 a
	DMSH	0.3099	0.3328	0.6044	0.4637	0.3600	1.2042
Quetzal (R)	Testigo	1.0695 a	0.9715 b	1.0382 b	1.5752 b	1.6242 a	2.1997 a
	TYLCV	1.1617 a	1.1022 b	1.3830 ab	2.0402 a	1.6369 a	2.2371 a
	TMV	1.0321 a	1.3808 a	1.7008 a	1.9672 a	1.6968 a	2.0695 a
	DMSH	0.2176	0.1710	0.4883	0.2290	0.2784	0.5870
5999 (R)	Testigo	1.0481 a	1.2797 a	1.3079 c	1.8890 b	2.0621 a	3.1752 a
	TYLCV	0.7965 b	1.7843 a	1.6183 b	2.7263 a	2.4066 a	2.6310 a
	TMV	0.9819 a	1.4355 a	1.8893 a	2.1114 ab	2.1219 a	2.4973 a
	DMSH	0.0836	0.6944	0.1424	0.8161	0.5421	0.9543

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

^y S= susceptible, R= resistente.

Cuadro 3. Comparación de medias para Fenilalanina amonio-lias (PAL).

Variedad	Virus	Días después de inoculación					
		10	25	40	55	70	85
Condor (S) ^y	Testigo	0.0009 c ^z	0.0029 b	0.0025 b	0.0047 b	0.0050 a	0.0034 b
	TYLCV	0.0055 a	0.0028 b	0.0052 a	0.0073 a	0.0044 a	0.0025 b
	TMV	0.0035 b	0.0056 a	0.0019 b	0.0041 b	0.0060 a	0.0053 a
	DMSH	0.0002	0.0014	0.0014	0.0009	0.0017	0.0015
Raptor (S)	Testigo	0.0012 b	0.0058 a	0.0016 b	0.0023 c	0.0045 b	0.0075 ab
	TYLCV	0.0095 a	0.0025 b	0.0042 a	0.0047 b	0.0046 b	0.0060 b
	TMV	0.0014 b	0.0055 a	0.0047 a	0.0073 a	0.0092 a	0.0091 a
	DMSH	0.0003	0.0010	0.0010	0.0023	0.0015	0.0031
Quetzal (R)	Testigo	0.0027 c	0.0021 b	0.0038 a	0.0048 b	0.0044 b	0.0040 b
	TYLCV	0.0167 a	0.0104 a	0.0018 b	0.0029 c	0.0008 c	0.0032 b
	TMV	0.0123 b	0.0022 b	0.0042 a	0.0063 a	0.0101 a	0.0127 a
	DMSH	0.0002	0.0006	0.0013	0.0013	0.0018	0.0020
5999 (R)	Testigo	0.0098 b	0.0032 b	0.0077 a	0.0027 b	0.0029 c	0.0157 a
	TYLCV	0.0108 a	0.0133 a	0.0044 b	0.0075 a	0.0092 a	0.0053 b
	TMV	0.0080 c	0.0038 b	0.0022 b	0.0063 a	0.0049 b	0.0046 b
	DMSH	0.0003	0.0010	0.0016	0.0017	0.0019	0.0018

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

^y S= susceptible, R= resistente.

Cuadro 4. Comparación de medias para Peroxidasa (POX).

Variedad	Virus	Días después de inoculación					
		10	25	40	55	70	85
Condor (S)^y	Testigo	0.1139 a ^z	0.0222 a	0.0506 b	0.0437 c	0.1551 b	0.0973 c
	TYLCV	0.0521 b	0.0263 a	0.0351 c	0.2286 a	0.2950 a	0.1861 a
	TMV	0.1006 a	0.0279 a	0.0555 a	0.1057 b	0.1541 b	0.1174 b
	DMSH	0.0183	0.0087	0.0040	0.0042	0.0095	0.0093
Raptor (S)	Testigo	0.1730 a	0.0618 b	0.0751 b	0.2680 a	0.2688 b	0.1985 a
	TYLCV	0.1383 b	0.0493 b	0.0287 c	0.1686 b	0.3562 a	0.1793 b
	TMV	0.0686 c	0.0802 a	0.1516 a	0.1475 c	0.2552 c	0.1449 c
	DMSH	0.0126	0.0143	0.0032	0.0037	0.0065	0.0089
Quetzal (R)	Testigo	0.0774 b	0.1862 a	0.0364 c	0.1721 b	0.1433 c	0.2356 b
	TYLCV	0.1166 a	0.0567 b	0.1008 b	0.1129 c	0.2267 b	0.1076 c
	TMV	0.1103 a	0.0323 b	0.5375 a	0.5663 a	0.3172 a	0.2815 a
	DMSH	0.0228	0.0343	0.0017	0.0026	0.0084	0.0087
5999 (R)	Testigo	0.1710 a	0.1313 a	0.0347 c	0.0408 c	0.2363 b	0.1573 b
	TYLCV	0.0483 b	0.0619 b	0.0900 b	0.3054 a	0.3892 a	0.3267 a
	TMV	0.0334 c	0.0305 c	0.2464 a	0.2057 b	0.2310 b	0.0987 c
	DMSH	0.0135	0.0080	0.0042	0.0050	0.0125	0.0075

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

^y S= susceptible, R= resistente.

Cuadro 5. Comparación de medias para Proteínas (PRO).

Variedad	Virus	Días después de inoculación					
		10	25	40	55	70	85
Condor (S)^y	Testigo	1599.1 b ^z	1333.0 c	2792.7 b	2588.4 a	2851.6 a	2858.5 a
	TYLCV	2932.2 a	3983.9 a	4042.9 a	2127.8 a	1739.9 b	2517.1 a
	TMV	2941.1 a	2746.1 b	1935.9 c	2029.1 a	1616.5 b	2969.5 a
	DMSH	142.7	262.7	92.9	982.4	347.8	544.5
Raptor (S)	Testigo	1774.7 c	1336.8 b	1331.4 c	1001.0 b	3398.6 a	2669.3 b
	TYLCV	2170.2 b	3691.9 a	1752.2 b	2057.9 a	1464.3 c	2698.1 b
	TMV	3195.8 a	922.9 c	2097.7 a	1968.8 a	1949.6 b	3489.0 a
	DMSH	156.5	175.5	110.8	232.5	376.4	464.6
Quetzal (R)	Testigo	1810.8 c	1084.6 c	1513.7 ab	1388.9 b	1527.4 b	2232.0 a
	TYLCV	2553.0 b	3145.0 a	1513.7 a	1890.7 a	1131.2 c	2439.0 a
	TMV	4736.8 a	2541.8 b	1321.8 b	1406.8 b	2248.4 a	2709.0 a
	DMSH	202.9	130.7	124.8	304.9	391.8	522.0
5999 (R)	Testigo	1680.6 c	1047.6 c	1995.2 a	1805.7 b	1682.3 b	3109.3 a
	TYLCV	3374.0 b	3077.8 b	1861.9 b	1205.2 c	1214.8 c	2450.0 a
	TMV	5400.0 a	4445.9 a	1216.2 c	3066.8 a	2432.1 a	2961.3 a
	DMSH	67.5	247.6	167.4	224.3	270.8	691.6

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

^y S= susceptible, R= resistente.

Cuadro 6. Comparación de medias para Superóxido dismutasa (SOD).

Variedad	Virus	Días después de inoculación					
		10	25	40	55	70	85
Condor (S)^y	Testigo	59.76 c ^z	33.23 ab	21.66 b	16.94 b	40.68 a	42.29 a
	TYLCV	94.40 b	35.34 a	56.92 a	34.35 a	41.92 a	45.53 a
	TMV	124.89 a	23.67 b	27.87 b	15.61 b	38.99 a	41.50 a
	DMSH	5.00	10.03	8.79	4.42	10.55	14.13
Raptor (S)	Testigo	73.18 b	41.69 a	44.05 a	15.59 b	18.25 b	45.37 a
	TYLCV	47.61 c	36.84 ab	41.33 a	20.47 ab	43.94 a	45.99 a
	TMV	85.07 a	30.95 b	17.12 b	24.82 a	31.92 a	51.89 a
	DMSH	4.91	10.54	10.38	6.51	12.65	10.74
Quetzal (R)	Testigo	53.38 c	39.89 a	35.09 a	19.61 a	21.28 b	36.01 b
	TYLCV	78.34 b	47.91 a	28.26 a	23.27 a	32.77 a	54.96 a
	TMV	98.61 a	18.50 b	34.63 a	19.13 a	37.26 a	40.09 b
	DMSH	2.63	12.54	11.67	8.49	9.29	12.00
5999 (R)	Testigo	83.70 c	43.25 ab	53.89 a	25.73 b	25.82 a	51.89 a
	TYLCV	114.01 a	53.85 a	29.24 b	25.49 b	36.89 a	45.29 a
	TMV	99.14 b	39.02 b	39.63 b	45.28 a	29.34 a	29.14 b
	DMSH	4.43	12.34	10.98	9.63	11.52	14.90

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$). DMSH= diferencia mínima significativa para la prueba de Tukey.

^y S= susceptible, R= resistente.

Apéndice 2. Análisis de varianza

Cuadro 7. Análisis de varianza de Fenoles (FEN), variedad Condor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.64177658	0.32088829	108.48*	<.0001
Error	6	0.01774874	0.00295812		
Corrected Total	8	0.65952532			
CV	4.83789				
25 ddi					
Virus	2	0.27793449	0.13896724	20.06*	0.0022
Error	6	0.04155585	0.00692598		
Corrected Total	8	0.31949034			
CV	6.324954				
40 ddi					
Virus	2	0.24089954	0.12044977	5.71*	0.0409
Error	6	0.12658572	0.02109762		
Corrected Total	8	0.36748526			
CV	10.48057				
55 ddi					
Virus	2	0.20810769	0.10405384	10.16*	0.0118
Error	6	0.06142569	0.01023762		
Corrected Total	8	0.26953338			
CV	5.606222				
70 ddi					
Virus	2	0.09146456	0.04573228	1.98 ^{ns}	0.219
Error	6	0.13877428	0.02312905		
Corrected Total	8	0.23023884			
CV	7.660637				
85 ddi					
Virus	2	0.61850942	0.30925471	13.98*	0.0055
Error	6	0.13268226	0.02211371		
Corrected Total	8	0.75119168			
CV	5.606969				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 8. Análisis de varianza de Fenoles (FEN), variedad Raptor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.19750475	0.09875237	6.46*	0.0319
Error	6	0.09178978	0.01529830		
Corrected Total	8	0.28929453			
CV	10.01256				
25 ddi					
Virus	2	0.12706568	0.06353284	3.6 ^{ns}	0.0939
Error	6	0.10585902	0.01764317		
Corrected Total	8	0.23292470			
CV	10.54717				
40 ddi					
Virus	2	0.04785766	0.02392883	0.41 ^{ns}	0.6803
Error	6	0.34925961	0.05820993		
Corrected Total	8	0.39711727			
CV	14.88396				
55 ddi					
Virus	2	0.90287302	0.45143651	13.17*	0.0064
Error	6	0.20561266	0.03426878		
Corrected Total	8	1.10848568			
CV	9.726061				
70 ddi					
Virus	2	0.76603650	0.38301825	18.55*	0.0027
Error	6	0.12389635	0.02064939		
Corrected Total	8	0.88993285			
CV	7.249428				
85 ddi					
Virus	2	0.45917891	0.22958945	0.99 ^{ns}	0.4239
Error	6	1.38639701	0.23106617		
Corrected Total	8	1.84557592			
CV	18.65089				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 9. Análisis de varianza de Fenoles (FEN), variedad Quetzal.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.02666238	0.01333119	1.77 ^{ns}	0.2493
Error	6	0.04527488	0.00754581		
Corrected Total	8	0.07193726			
CV	7.985779				
25 ddi					
Virus	2	0.26228267	0.13114133	28.13*	0.0009
Error	6	0.02797207	0.00466201		
Corrected Total	8	0.29025474			
CV	5.929564				
40 ddi					
Virus	2	0.65892264	0.32946132	8.67*	0.017
Error	6	0.22793502	0.03798917		
Corrected Total	8	0.88685766			
CV	14.18545				
55 ddi					
Virus	2	0.37533228	0.18766614	22.46*	0.0016
Error	6	0.05014180	0.00835697		
Corrected Total	8	0.42547408			
CV	4.912544				
70 ddi					
Virus	2	0.00901692	0.00450846	0.37 ^{ns}	0.7086
Error	6	0.07409245	0.01234874		
Corrected Total	8	0.08310936			
CV	6.724065				
85 ddi					
Virus	2	0.04648028	0.02324014	0.42 ^{ns}	0.673
Error	6	0.32939696	0.05489949		
Corrected Total	8	0.37587724			
CV	10.80362				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 10. Análisis de varianza de Fenoles (FEN), variedad 5999.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.10205816	0.05102908	45.78*	0.0002
Error	6	0.00668772	0.00111462		
Corrected Total	8	0.10874588			
CV		3.543652			
25 ddi					
Virus	2	0.40056911	0.20028455	2.61 ^{ns}	0.1532
Error	6	0.46103333	0.07683889		
Corrected Total	8	0.86160244			
CV		18.48208			
40 ddi					
Virus	2	0.50781775	0.25390887	78.62*	<.0001
Error	6	0.01937691	0.00322949		
Corrected Total	8	0.52719466			
CV		3.540402			
55 ddi					
Virus	2	1.12853825	0.56426912	5.32*	0.0469
Error	6	0.63679305	0.10613217		
Corrected Total	8	1.76533130			
CV		14.52931			
70 ddi					
Virus	2	0.20332538	0.10166269	2.17 ^{ns}	0.1953
Error	6	0.28096673	0.04682779		
Corrected Total	8	0.48429211			
CV		9.85017			
85 ddi					
Virus	2	0.77368659	0.38684329	2.67 ^{ns}	0.1485
Error	6	0.87073965	0.14512328		
Corrected Total	8	1.64442624			
CV		13.76349			

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 11. Análisis de varianza de Fenilalanina amonio-liasa (PAL), variedad Condor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.00003231	0.00001616	3581.6*	<.0001
Error	6	0.00000003	1.00000E-11		
Corrected Total	8	0.00003234			
CV	2.035983				
25 ddi					
Virus	2	0.00001486	0.00000743	23.62*	0.0014
Error	6	0.00000189	0.00000031		
Corrected Total	8	0.00001674			
CV	14.88576				
40 ddi					
Virus	2	0.00001792	0.00000896	27.5*	0.001
Error	6	0.00000195	0.00000033		
Corrected Total	8	0.00001987			
CV	17.88592				
55 ddi					
Virus	2	0.00001762	0.00000881	72.24*	<.0001
Error	6	0.00000073	0.00000012		
Corrected Total	8	0.00001835			
CV	6.472838				
70 ddi					
Virus	2	4.31E-06	2.15E-06	4.76 ^{ns}	0.0577
Error	6	2.71E-06	4.52E-07		
Corrected Total	8	7.02E-06			
CV	13.11012				
85 ddi					
Virus	2	0.00001258	0.00000629	18.59*	0.0027
Error	6	0.00000203	0.00000034		
Corrected Total	8	0.00001461			
CV	15.56639				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 12. Análisis de varianza de Fenilalanina amonio-liasas (PAL), variedad Raptor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.00013403	0.00006701	6079.78*	<.0001
Error	6	0.00000007	0.00000001		
Corrected Total	8	0.00013409			
CV	2.590134				
25 ddi					
Virus	2	0.00001975	0.00000987	67.93*	<.0001
Error	6	0.00000087	0.00000015		
Corrected Total	8	0.00002062			
CV	8.346305				
40 ddi					
Virus	2	0.00001687	0.00000843	50.47*	0.0002
Error	6	0.0000001	0.00000017		
Corrected Total	8	0.00001787			
CV	11.7054				
55 ddi					
Virus	2	0.00003812	0.00001906	23.6*	0.0014
Error	6	0.00000485	0.00000081		
Corrected Total	8	0.00004297			
CV	18.76322				
70 ddi					
Virus	2	0.00004426	0.00002213	58.39*	0.0001
Error	6	0.00000227	0.00000038		
Corrected Total	8	0.00004654			
CV	10.10732				
85 ddi					
Virus	2	0.00001446	0.00000723	4.83 ^{ns}	0.0563
Error	6	0.00000898	0.0000015		
Corrected Total	8	0.00002344			
CV	16.16908				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 13. Análisis de varianza de Fenilalanina amonio-liasa (PAL), variedad Quetzal.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.00030499	0.00015249	22029.7*	<.0001
Error	6	0.00000004	0.00000001		
Corrected Total	8	0.00030503			
CV		0.789123			
25 ddi					
Virus	2	0.00013836	0.00006918	1064.84*	<.0001
Error	6	0.00000039	0.00000006		
Corrected Total	8	0.00013875			
CV		5.210017			
40 ddi					
Virus	2	0.00000980	0.00000490	16.95*	0.0034
Error	6	0.00000173	0.00000029		
Corrected Total	8	0.00001153			
CV		16.49912			
55 ddi					
Virus	2	0.00001765	0.00000883	31.35*	0.0007
Error	6	0.00000169	0.00000028		
Corrected Total	8	0.00001934			
CV		11.43735			
70 ddi					
Virus	2	0.0001313	0.00006565	124.76*	<.0001
Error	6	0.00000316	0.00000053		
Corrected Total	8	0.00013446			
CV		14.2018			
85 ddi					
Virus	2	0.00016405	0.00008202	124.69*	<.0001
Error	6	0.00000395	0.00000066		
Corrected Total	8	0.00016799			
CV		12.23548			

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 14. Análisis de varianza de Fenilalanina amonio-liasa (PAL), variedad 5999.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.00001188	0.00000594	365.96*	<.0001
Error	6	0.0000001	0.00000002		
Corrected Total	8	0.00001198			
CV	1.34163				
25 ddi					
Virus	2	0.00019128	0.00009564	606.64*	<.0001
Error	6	0.00000095	0.00000016		
Corrected Total	8	0.00019223			
CV	5.853444				
40 ddi					
Virus	2	0.00004547	0.00002274	52.57*	0.0002
Error	6	0.00000026	0.00000043		
Corrected Total	8	0.00004807			
CV	13.76741				
55 ddi					
Virus	2	0.00002994	0.00001497	31.73*	0.0006
Error	6	0.00000283	0.00000047		
Corrected Total	8	0.00003277			
CV	13.05007				
70 ddi					
Virus	2	0.00006157	0.00003079	56.03*	<.0001
Error	6	0.00000033	0.00000055		
Corrected Total	8	0.00006487			
CV	13.06097				
85 ddi					
Virus	2	0.00023111	0.00011555	223.28*	<.0001
Error	6	0.00000311	0.00000052		
Corrected Total	8	0.00023421			
CV	8.402				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 15. Análisis de varianza de Peroxidasa (POX), variedad Condor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.00634805	0.00317403	59.6*	0.0001
Error	6	0.00031953	0.00005325		
Corrected Total	8	0.00666758			
CV	8.21226				
25 ddi					
Virus	2	0.0000522	0.0000261	2.17*	0.1955
Error	6	0.00007219	0.00001203		
Corrected Total	8	0.00012439			
CV	13.61472				
40 ddi					
Virus	2	0.00068214	0.00034107	133.59*	<.0001
Error	6	0.00001532	0.00000255		
Corrected Total	8	0.00069746			
CV	3.394601				
55 ddi					
Virus	2	0.05312299	0.0265615	9238.82*	<.0001
Error	6	0.00001725	0.00000287		
Corrected Total	8	0.05314024			
CV	1.34584				
70 ddi					
Virus	2	0.03941549	0.01970775	1372.46*	<.0001
Error	6	0.00008616	0.00001436		
Corrected Total	8	0.03950165			
CV	1.881222				
85 ddi					
Virus	2	0.01300834	0.00650417	471.54*	<.0001
Error	6	0.00008276	0.00001379		
Corrected Total	8	0.0130911			
CV	2.779341				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 16. Análisis de varianza de Peroxidasa (POX), variedad Raptor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.01696761	0.00848381	332.77*	<.0001
Error	6	0.00015297	0.00002549		
Corrected Total	8	0.01712058			
CV	3.987619				
25 ddi					
Virus	2	0.00145085	0.00072543	22.21*	0.0017
Error	6	0.00019595	0.00003266		
Corrected Total	8	0.0016468			
CV	8.960847				
40 ddi					
Virus	2	0.02309733	0.01154867	7065.47*	<.0001
Error	6	0.00000981	0.00000163		
Corrected Total	8	0.02310714			
CV	1.501802				
55 ddi					
Virus	2	0.0248635	0.01243175	5653.08*	<.0001
Error	6	0.00001319	0.0000022		
Corrected Total	8	0.02487669			
CV	0.761663				
70 ddi					
Virus	2	0.01801549	0.00900775	1337.46*	<.0001
Error	6	0.00004041	0.00000673		
Corrected Total	8	0.0180559			
CV	0.884588				
85 ddi					
Virus	2	0.0044234	0.0022117	175.74*	<.0001
Error	6	0.00007551	0.00001259		
Corrected Total	8	0.00449891			
CV	2.036532				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 17. Análisis de varianza de Peroxidasa (POX), variedad Quetzal.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.00266611	0.00133305	16.12*	0.0039
Error	6	0.00049607	0.00008268		
Corrected Total	8	0.00316217			
CV	8.965018				
25 ddi					
Virus	2	0.0410365	0.02051825	109.65*	<.0001
Error	6	0.00112278	0.00018713		
Corrected Total	8	0.04215928			
CV	14.91539				
40 ddi					
Virus	2	0.44598902	0.22299451	464207*	<.0001
Error	6	0.00000288	0.00000048		
Corrected Total	8	0.4459919			
CV	0.308157				
55 ddi					
Virus	2	0.36447746	0.18223873	170015*	<.0001
Error	6	0.00000643	0.00000107		
Corrected Total	8	0.36448389			
CV	0.364828				
70 ddi					
Virus	2	0.04537459	0.02268729	2003.05*	<.0001
Error	6	0.00006796	0.00001133		
Corrected Total	8	0.04544255			
CV	1.45931				
85 ddi					
Virus	2	0.04878546	0.02439273	2037.51*	<.0001
Error	6	0.00007183	0.00001197		
Corrected Total	8	0.04885729			
CV	1.661507				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 18. Análisis de varianza de Peroxidasa (POX), variedad 5999.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	0.03423734	0.01711867	591.79*	<.0001
Error	6	0.00017356	0.00002893		
Corrected Total	8	0.0344109			
CV	6.385751				
25 ddi					
Virus	2	0.01596081	0.00798041	789.33*	<.0001
Error	6	0.00006066	0.00001011		
Corrected Total	8	0.01602147			
CV	4.264216				
40 ddi					
Virus	2	0.0723562	0.0361781	12896.5*	<.0001
Error	6	0.00001683	0.00000281		
Corrected Total	8	0.07237303			
CV	1.354066				
55 ddi					
Virus	2	0.10709775	0.05354888	13241*	<.0001
Error	6	0.00002427	0.00000404		
Corrected Total	8	0.10712202			
CV	1.093107				
70 ddi					
Virus	2	0.04844693	0.02422347	975.74*	<.0001
Error	6	0.00014895	0.00002483		
Corrected Total	8	0.04859589			
CV	1.745243				
85 ddi					
Virus	2	0.08411536	0.04205768	4736.53*	<.0001
Error	6	0.00005328	0.00000888		
Corrected Total	8	0.08416864			
CV	1.534153				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 19. Análisis de varianza de Proteínas (PRO), variedad Condor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	3577856.11	1788928.05	551.74*	<.0001
Error	6	19454.014	3242.336		
Corrected Total	8	3597310.12			
CV	2.28608				
25 ddi					
Virus	2	10556745.8	5278372.88	480.07*	<.0001
Error	6	65970.14	10995.02		
Corrected Total	8	10622715.9			
CV	3.901454				
40 ddi					
Virus	2	6736389.24	3368194.62	2448.59*	<.0001
Error	6	8253.395	1375.566		
Corrected Total	8	6744642.64			
CV	1.268505				
55 ddi					
Virus	2	534711.036	267355.518	1.74 ^{ns}	0.2538
Error	6	922721.556	153786.926		
Corrected Total	8	1457432.59			
CV	17.44127				
70 ddi					
Virus	2	2776726.35	1388363.17	72.04*	<.0001
Error	6	115637.609	19272.935		
Corrected Total	8	2892363.96			
CV	6.708823				
85 ddi					
Virus	2	333484.08	166742.04	3.53 ^{ns}	0.097
Error	6	283490.239	47248.3732		
Corrected Total	8	616974.319			
CV	7.814185				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 20. Análisis de varianza de Proteínas (PRO), variedad Raptor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	3227940.83	1613970.42	413.73*	<.0001
Error	6	23406.264	3901.044		
Corrected Total	8	3251347.1			
CV	2.624048				
25 ddi					
Virus	2	13385681.3	6692840.63	1363.54*	<.0001
Error	6	29450.61	4908.44		
Corrected Total	8	13415131.9			
CV	3.531491				
40 ddi					
Virus	2	883657.152	441828.576	225.86*	<.0001
Error	6	11737.3974	1956.2329		
Corrected Total	8	895394.549			
CV	2.560948				
55 ddi					
Virus	2	2061658.6	1030829.3	119.64*	<.0001
Error	6	51696.388	8616.065		
Corrected Total	8	2113354.99			
CV	5.538713				
70 ddi					
Virus	2	6076320.89	3038160.44	134.57*	<.0001
Error	6	135459.241	22576.54		
Corrected Total	8	6211780.13			
CV	6.616734				
85 ddi					
Virus	2	1298468.54	649234.271	18.88*	0.0026
Error	6	206323.338	34387.223		
Corrected Total	8	1504791.88			
CV	6.281482				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 21. Análisis de varianza de Proteínas (PRO), variedad Quetzal.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	13881345.2	6940672.61	1058.27*	<.0001
Error	6	39351.07	6558.51		
Corrected Total	8	13920696.3			
CV	2.669655				
25 ddi					
Virus	2	6732329.7	3366164.85	1236.22*	<.0001
Error	6	16337.654	2722.942		
Corrected Total	8	6748667.36			
CV	2.311872				
40 ddi					
Virus	2	55431.1874	27715.5937	11.17*	0.0095
Error	6	14883.0676	2480.51127		
Corrected Total	8	70314.255			
CV	3.520946				
55 ddi					
Virus	2	486209.295	243104.647	16.41*	0.0037
Error	6	88893.0125	14815.5021		
Corrected Total	8	575102.307			
CV	7.791952				
70 ddi					
Virus	2	1925079.29	962539.645	39.34*	0.0004
Error	6	146790.718	24465.12		
Corrected Total	8	2071870.01			
CV	9.56259				
85 ddi					
Virus	2	343353.567	171676.783	3.95*	0.0803
Error	6	260488.984	43414.8306		
Corrected Total	8	603842.55			
CV	8.469985				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 22. Análisis de varianza de Proteínas (PRO), variedad 5999.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	20806456.2	10403228.1	14324.1*	<.0001
Error	6	4357.65	726.27		
Corrected Total	8	20810813.9			
CV	0.773331				
25 ddi					
Virus	2	17541835.6	8770917.77	897.92*	<.0001
Error	6	58608.02	9768		
Corrected Total	8	17600443.6			
CV	3.459224				
40 ddi					
Virus	2	1041428.1	520714.051	116.68*	<.0001
Error	6	26776.709	4462.785		
Corrected Total	8	1068204.81			
CV	3.950383				
55 ddi					
Virus	2	5416580.46	2708290.23	337.84*	<.0001
Error	6	48099.613	8016.602		
Corrected Total	8	5464680.08			
CV	4.419519				
70 ddi					
Virus	2	2262603.56	1131301.78	96.79*	<.0001
Error	6	70131.202	11688.534		
Corrected Total	8	2332734.76			
CV	6.08604				
85 ddi					
Virus	2	718138.371	359069.186	4.71 ^{ns}	0.0589
Error	6	457352.525	76225.421		
Corrected Total	8	1175490.9			
CV	9.720828				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 23. Análisis de varianza de Superóxido dismutasa (SOD), variedad Condor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	6372.06034	3186.03017	799.11*	<.0001
Error	6	23.921856	3.986976		
Corrected Total	8	6395.98219			
CV	2.146683				
25 ddi					
Virus	2	232.009928	116.004964	7.23*	0.0252
Error	6	96.2154405	16.0359067		
Corrected Total	8	328.225368			
CV	13.02365				
40 ddi					
Virus	2	2125.81256	1062.90628	86.3*	<.0001
Error	6	73.902396	12.317066		
Corrected Total	8	2199.71496			
CV	9.890725				
55 ddi					
Virus	2	656.190876	328.095438	105.4*	<.0001
Error	6	18.677787	3.1129645		
Corrected Total	8	674.868663			
CV	7.91195				
70 ddi					
Virus	2	12.9419716	6.4709858	0.37 ^{ns}	0.7086
Error	6	106.368893	17.7281489		
Corrected Total	8	119.310865			
CV	10.38839				
85 ddi					
Virus	2	27.3738183	13.6869092	0.43 ^{ns}	0.669
Error	6	190.92373	31.8206216		
Corrected Total	8	218.297548			
CV	13.08572				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 24. Análisis de varianza de Superóxido dismutasa (SOD), variedad Raptor.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	2198.28786	1099.14393	286.22*	<.0001
Error	6	23.041619	3.84027		
Corrected Total	8	2221.32948			
CV		2.855938			
25 ddi					
Virus	2	173.351036	86.675518	4.9 ^{ns}	0.0548
Error	6	106.132446	17.688741		
Corrected Total	8	279.483482			
CV		11.52526			
40 ddi					
Virus	2	1318.57969	659.289844	38.41*	0.0004
Error	6	102.995941	17.16599		
Corrected Total	8	1421.57563			
CV		12.12846			
55 ddi					
Virus	2	128.021503	64.0107516	9.49*	<.0001
Error	6	40.4852851	6.7475475		
Corrected Total	8	168.506788			
CV		12.8018			
70 ddi					
Virus	2	991.159083	495.579542	19.45*	0.0024
Error	6	152.899765	25.483294		
Corrected Total	8	1144.05885			
CV		16.09156			
85 ddi					
Virus	2	77.6243419	38.812171	2.11 ^{ns}	0.2023
Error	6	110.337045	18.3895075		
Corrected Total	8	187.961387			
CV		8.980442			

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 25. Análisis de varianza de Superóxido dismutasa (SOD), variedad Quetzal.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	3079.04835	1539.52417	1393.11*	<.0001
Error	6	6.630593	1.105099		
Corrected Total	8	3085.67894			
CV	1.36923				
25 ddi					
Virus	2	1386.79348	693.396737	27.69*	0.0009
Error	6	150.248245	25.041374		
Corrected Total	8	1537.04172			
CV	14.1219				
40 ddi					
Virus	2	87.6185233	43.8092617	2.02 ^{ns}	0.2137
Error	6	130.264624	21.7107707		
Corrected Total	8	217.883147			
CV	14.26674				
55 ddi					
Virus	2	30.8165964	15.4082982	1.34 ^{ns}	0.3301
Error	6	68.9457667	11.4909611		
Corrected Total	8	99.7623631			
CV	16.40227				
70 ddi					
Virus	2	407.281733	203.640866	14.79*	0.0048
Error	6	82.585351	13.7642252		
Corrected Total	8	489.867084			
CV	12.18878				
85 ddi					
Virus	2	596.872338	298.436169	13*	0.0066
Error	6	137.730461	22.9550768		
Corrected Total	8	734.602799			
CV	10.96664				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$

Cuadro 26. Análisis de varianza de Superóxido dismutasa (SOD), variedad 5999.

SOURCE	DF	SS	MS	FV	Pr>F
10 ddi					
Virus	2	1378.73287	689.366434	220.86*	<.0001
Error	6	18.727501	3.12125		
Corrected Total	8	1397.46037			
CV	1.785483				
25 ddi					
Virus	2	349.982998	174.991499	7.21*	0.0253
Error	6	145.574463	24.2624105		
Corrected Total	8	495.55746			
CV	10.85635				
40 ddi					
Virus	2	918.490674	459.245337	23.92*	0.0014
Error	6	115.189758	19.198293		
Corrected Total	8	1033.68043			
CV	10.7083				
55 ddi					
Virus	2	773.819845	386.909923	26.19*	0.0011
Error	6	88.6232537	14.7705423		
Corrected Total	8	862.443099			
CV	11.94876				
70 ddi					
Virus	2	191.585117	95.7925585	4.53 ^{ns}	0.0633
Error	6	126.915848	21.1526413		
Corrected Total	8	318.500965			
CV	14.98011				
85 ddi					
Virus	2	821.873013	410.936506	11.61*	0.0087
Error	6	212.381685	35.396948		
Corrected Total	8	1034.2547			
CV	14.1307				

Source: fuente, DF: grados de libertad, SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio, FV: valor de F, Pr<F: probabilidad que se rechace hipótesis nula. CV: coeficiente de variación.

*, ns: significativo y no significativo para $P \leq 0.05$