



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

FUNGICIDAS-PATÓGENO EN REACCIONES DE DEFENSA DEL JITOMATE

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

Guillermo Andrés Enciso Maldonado

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

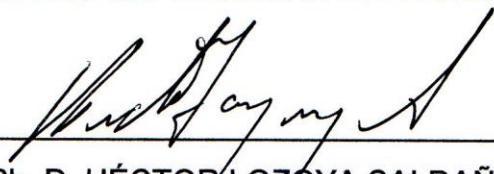


Chapingo, Estado de México, diciembre de 2017

**FUNGICIDAS-PATÓGENO
EN REACCIONES DE DEFENSA DEL JITOMATE**

Tesis realizada por **GUILLERMO ANDRÉS ENCISO MALDONADO** 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. MARÍA TERESA BERYL COLINAS Y LEÓN

ASESOR: 
DR. EFRAÍN CONTRERAS MAGAÑA

CONTENIDO

CONTENIDO	iii
CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	x
RESUMEN GENERAL	xi
FUNGICIDAS-PATÓGENO EN REACCIONES DE DEFENSA DEL JITOMATE	xi
GENERAL ABSTRACT	xii
FUNGICIDES-PATHOGEN IN DEFENSE REACTIONS IN JITOMATE	xii
1.INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2.REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Tizón tardío de la papa y el tomate	3
2.1.1 Etiología	3
2.1.2 Sintomatología.....	3
2.1.3 Manejo de la enfermedad	4
2.2 Defensa de las plantas	4
2.2.1 Metabolitos secundarios	5
2.2.2 Compuestos fenólicos	5
2.2.3 Defensas antipatogénicas adicionales	6
2.2.4 Fenilalanina amonio liasa	7
2.2.5 Peroxidasa	7
2.3. Acción de los fungicidas	10

2.3.1. Modo de acción de los fungicidas	10
2.3.2. Fungicidas como inductores de resistencia en plantas	11
2.4. Literatura citada	12
3. FUNGICIDAS-PATÓGENO EN REACCIONES DE DEFENSA DEL	
JITOMATE	18
RESUMEN	18
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN	20
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Diseño experimental y tratamientos	22
Muestreo	22
Determinación enzimática	22
Fenoles totales	23
Fenilalanina amonioliasa	23
Peroxidasa	24
Superóxido dismutasa	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Fenoles Totales	25
Fenilalanina amonio-liasa	26
Peroxidasa	27
Superóxido dismutasa	28
Análisis de correlación	29
DISCUSIÓN GENERAL	30
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	32

CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos evaluados.	22
Cuadro 2. Coeficientes de correlación (r) con significancia estadística entre variables.	30
Cuadro 3. Comparación de medias para fenoles totales (FEN).....	29
Cuadro 4. Comparación de medias para fenilalanina amonio-liasa (PAL).	30
Cuadro 5. Comparación de medias para peroxidasa (POX).	31
Cuadro 6. Comparación de medias para superóxido dismutasa (SOD).....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contenido de fenoles totales. A, evaluaciones a los 2 días después de la aplicación; B, evaluaciones a los 7 días después de la aplicación.....	26
Figura 2. Actividad de PAL; A, evaluaciones a los 2 días después de la aplicación; B, evaluaciones a los 7 días después de la aplicación.	27
Figura 3. Actividad de la POX; A, evaluaciones a los 2 días después de la aplicación; B, evaluaciones a los 7 días después de la aplicación.	28
Figura 4. Actividad de SOD; A, evaluaciones a los 2 días después de la aplicación; B, evaluaciones a los 7 días después de la aplicación.	29

APÉNDICES

Apéndice 1. Comparación de medias	29
--	----

DEDICATORIA

A Alicia Susana Aquino Jara, con admiración y cariño

AGRADECIMIENTOS

A Dios, el Único Hacedor de Todo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca de estudios y a los profesores y funcionarios de la Universidad Autónoma Chapingo por su buena predisposición para llevar a cabo esta investigación.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por aceptarme en su equipo, por su guía y consejos para desarrollar esta investigación. Así también, al Dr. Mario Alberto Vázquez Peña por su interés y contribuciones en los análisis estadísticos. Al Dr. Efraín Contreras Magaña y la Dra. Ma. Teresa B. Colinas y León por su apoyo y contribuciones para la ejecución del trabajo.

De forma especial, agradezco al I. Q. Cecilio Bautista, por su ayuda desinteresada e incondicional para montar los ensayos en laboratorio.

A los compañeros y amigos que me asistieron en las distintas etapas de la experimentación: Darío, Eduilkar, Samantha, Gabriela, Mercedes, Omar, Gevri, Israel, Jonhatan, Monzerrat, Pablo, Iván, Margarito y Natalia. Gracias por su tiempo y su valiosa amistad.

A la persona más especial e importante en esta etapa de mi vida, Jennifer Sánchez, gracias por acompañarme y apoyarme de manera incondicional durante todo este proceso.

A mis padres Guillermo, Christina y Alejandro y a mis hermanos Gabriela, Marcelo, Mauricio y Fernanda, quienes me apoyaron desde la distancia. A Emilio, Ignacio, Rodrigo y Marcelo, amigos que me acompañaron en todo momento.

DATOS BIOGRÁFICOS

1. Datos personales

Nombre	Guillermo Andrés Enciso Maldonado
Fecha de nacimiento	julio 30 1990
Lugar de nacimiento	Asunción, Central, Paraguay.
CURP	EIMG900730HNENLL04
Cédula profesional	4268 (Paraguay)

2. Desarrollo académico

Bachillerato	Colegio Santa Clara, Asunción, PY.
Licenciatura	Ingeniero Agrónomo, UNA, PY.

RESUMEN GENERAL

FUNGICIDAS-PATÓGENO EN REACCIONES DE DEFENSA DEL JITOMATE

La infección por fitopatógenos generalmente activa una serie de mecanismos de defensa de las plantas cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar el desarrollo de la enfermedad. Algunos agroquímicos también estimulan dichos mecanismos. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la síntesis de fenoles totales (FEN), y la actividad de fenilalanina amonioliase (PAL), peroxidasas (POX) y superóxido dismutasa (SOD) en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con fosetyl-Al (1.25 g/L), fluoxastrobin (2.5 ml/L) y sin fungicida, en ausencia y presencia de *Phytophthora infestans*, oomiceto causante del tizón tardío, en condiciones de invernadero, bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3 con 3 repeticiones. Veinte días después del trasplante, se iniciaron aplicaciones semanales de los tratamientos. Se tomaron muestras a los 2 y 7 días después de cada una de once aplicaciones. 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. La aplicación de fosetyl-Al y fluoxastrobin indujeron mayor síntesis/actividad de compuestos y enzimas tanto en las plantas infectadas como en las sanas, aunque esta inducción de mecanismos de defensa fue variable según tratamiento y momento de evaluación. La mayor síntesis de fenoles ocurrió en plantas enfermas y con fungicidas, seguidas de plantas sanas con fungicidas, luego por plantas enfermas sin fungicidas y por último en plantas sanas. La actividad de la PAL fue mayor en plantas enfermas y con fungicidas, seguido de plantas enfermas sin fungicida y luego por plantas sanas tratadas con fungicidas; mientras que la mayor actividad de la POX ocurrió en plantas sanas tratadas con fungicidas. Por otro lado, el fosetyl-Al indujo la actividad de la SOD en plantas sanas y en menor medida el fluoxastrobin en plantas enfermas. Se encontró el mismo número de correlaciones positivas entre enzimas y compuestos fenólicos para plantas sanas e infectadas. Se concluye que la síntesis y actividad de los metabolitos cuantificados se alteró selectivamente en función de los tratamientos y del momento de aplicación.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* L., enzimas de defensa, *Phytophthora infestans*.

GENERAL ABSTRACT

FUNGICIDES-PATHOGEN IN DEFENSE REACTIONS IN JITOMATE

Plant pathogen infection usually triggers a series of defense mechanisms in plants in order to stop, slow, or counteract the development of the disease. Some agrochemicals also stimulate these mechanisms. The objective of the present research was to quantify the synthesis of total phenols (FEN) and the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidases (POX) and superoxide dismutase (SOD), in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) treated with fosetyl-Al (1.25 g / L), fluoxastrobin (2.5 ml / L) and without fungicide, in the absence and presence of *Phytophthora infestans*, oomycete that causes late blight, under greenhouse conditions, with a completely randomized design with a 2x3 factorial arrangement with 3 repetitions. Twenty days after the transplant, weekly applications of the treatments were initiated. Samples were taken at 2 and 7 days after each of 11 applications. Acetone powder was prepared and the enzymatic determination was made from there. The statistical analysis consisted of a factorial ANAVA and correlation analysis. The application of fosetyl-Al and fluoxastrobin induced greater synthesis/activity of compounds and enzymes in both infected and healthy plants, although this induction of defense mechanisms was variable according to treatment and time of evaluation. The highest synthesis of phenols occurred in diseased plants and with fungicides, followed by healthy plants with fungicides, then by diseased plants without fungicides and finally in healthy plants. PAL activity was higher in diseased plants, with fungicides, followed by diseased plants without fungicide, and then by healthy plants treated with fungicides; while the greater activity of the POX occurred in healthy plants treated with fungicides. On the other hand, fosetyl-Al induced the activity of SOD in healthy plants and to a lesser extent fluoxastrobin in diseased plants. The same number of positive correlations between enzymes and phenolic compounds was found for healthy and infected plants. It is concluded that the synthesis and activity of the quantified metabolites were selectively altered depending on the treatments and the time of application.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., defense enzymes, *Phytophthora infestans*.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más importantes en México y el mundo (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2017). Esta hortaliza es susceptible a muchas enfermedades, como las causadas por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout y *Ralstonia solanacearum* Smith, patógenos que ocasionan pérdidas entre el 40 y 70 % (Chavarro y Ángel, 2005). El tizón tardío es causado por *Phytophthora infestans*, común en áreas con temperaturas entre 15 y 22 °C y humedad relativa mayor al 80%, se transmite por semillas y sobrevive en forma de micelio en otras plantas solanáceas cultivadas o arvenses, o en residuos de cosecha, que permanecen en el suelo (Jaramillo, Rodríguez, Guzmán Zapata & Rengifo, 2007). El manejo de esta enfermedad resulta complejo debido a que el patógeno presenta una alta variabilidad genética (Lozoya-Saldaña *et al.*, 2017), por lo que la aplicación reiterada de agroquímicos para su control podría ocasionar cepas insensibles a los mismos. Una alternativa de manejo de enfermedades de plantas se basa en la “resistencia inducida”, mediante la cual las plantas son protegidas de las enfermedades causadas por hongos, ya sea a través de una infección inicial por un patógeno (Kuúc, 1982) o por la aplicación de productos químicos sintéticos que activan respuestas de resistencia de la planta (White, 1979; Gottsein y Kuúc, 1989; Kessmann *et al.*, 1994). Esta inducción de resistencia se activa a partir de 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, Gregersen & Thordal-Christensen, 1993) e involucra cambios claros en el metabolismo relacionados con la biosíntesis de enzimas y metabolitos secundarios (Madriz, 2002).

Existe un gran número de enzimas y metabolitos secundarios que participan en el sistema de defensa de las plantas, entre ellos se encuentran Fenoles (FEN) y

enzimas como Fenilalanina amonio-liasa (PAL), Peroxidasa (POX) y Superóxido dismutasa (SOD).

Por otro lado, los mecanismos de acción de algunos fungicidas sobre el patógeno inducen también reacciones no específicas de defensa de la planta, independientemente de la infección (Calatayud y Barreno, 2001; Serrano-Cervantes, Lozoya-Saldaña, Colinas y León & Leyva-Mir, 2016). Así, entre ellos resaltan el benomilo, el cual tiene un efecto protector ante el estrés oxidativo, elevando la actividad de la SOD, y evita la peroxidación de los lípidos de las membranas de las clorofilas (Calatayud y Barreno, 2001); el fosetyl-Al, que estimula la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD y la PAL en presencia de enfermedad, induciendo la defensa de las plantas (Robledo-Esqueda, Lozoya-Saldaña & Colinas-León, 2012) y en ausencia de enfermedad se ha demostrado que aumenta la actividad de POX y SOD (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016). Por otro lado, el fluoxastrobin (estrobilurina) también induce la actividad de la SOD en plantas sanas (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016). Otro fungicidas como la combinación de azoxystrobin y epoxiconazol retrasan la senescencia de *Triticum aestivum* debido a una mejora del potencial antioxidante que protege a las plantas de las especies de oxígeno activo dañino (Wu & Von Tiedemann, 2002), el Acrobat ® MZ (mancozeb + dimetomorf), incrementa la actividad de la catalasa y peroxidasa en presencia de enfermedad en plantas de jitomate (Horotan y Oancea, 2013).

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar el contenido de fenoles totales (FEN) y la actividad de fenilalanina amonio-liasa (PAL), peroxidasas (POX) y superóxido dismutasa (SOD) en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con Fosetyl-Al (1.25 g/L), Fluoxastrobin (2.5 ml/L) y sin fungicida, en ausencia y presencia de *Phytophthora infestans*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Tizón tardío de la papa y el tomate

2.1.1 Etiología

El tizón tardío de la papa y el jitomate es causado por el hongo oomiceto *Phytophthora infestans*. Este patógeno produce esporangios hialinos, con forma de limón. Los esporangios están bien desarrollados, presentan ramificación simpodial, que emergen a través de los estomas en un número variable de 3 a 5. Los esporangios son formados durante el periodo de alta humedad relativa (91 – 100 %) y de temperaturas óptimas entre 18 – 22 °C. En condiciones húmedas pueden germinar directamente (óptimo 25 °C) o producir zoosporas biflageladas bajo frío (óptimo 12 °C). Cada zoospora puede nadar en un film de agua sobre el tejido de la planta, encistar, germinar y penetrar iniciando un nuevo ciclo. Por lo tanto, a bajas temperaturas, la cantidad de inóculo es mucho mayor de lo que la germinación directa del esporangio, debido a la formación de zoosporas. Temperaturas por encima de los 30 °C son consideradas desfavorables para la ocurrencia del tizón tardío. La diseminación del patógeno se realiza principalmente por el viento, lluvias e insectos. El patógeno presenta gran variabilidad genética, de ahí la corta vida útil de las variedades con resistencia vertical (Kurozowa & Paván, 2016).

2.1.2 Sintomatología

La enfermedad inicia los síntomas en los tejidos situados en la mitad superior. Los primeros síntomas surgen en las hojas como manchas irregulares, de tejido encharcado de color verde-oscuro, que pueden aumentar de tamaño rápidamente y abarcar una gran superficie de la hoja. Posteriormente, esas superficies pasan a pardo-oscuro con una estrecha faja de tejido turgente entre el tejido necrosado y el tejido sano. Cuando se presenta la coalescencia de manchas, éstas pueden destruir la mayoría de las hojas en poco tiempo, dando aspectos similares a los del daño por helada. Los síntomas en ramas, peciolo y

raquis son pardo-oscuros al inicio y pardo-claros en una fase más avanzada, pudiendo haber completo anillamiento de los mismos, lo que acarrea la muerte de la parte superior. En los frutos, en cualquier estadio, las lesiones son de tipo pudrición dura, de color pardo-oscuro, profundas y de superficie irregular. En ambiente húmedo, el micelio blanco-ceniciento se desarrolla sobre la superficie afectada, en donde se pueden observar los esporangios y esporangióforos. La esporulación es más intensa en la periferia de las lesiones (Kurozowa & Paván, 2016).

Ante condiciones netamente favorables para la enfermedad, el control del tizón tardío resulta muy difícil por la frecuencia con que deben ser aplicados los fungicidas preventivos. Se señalan hasta tres tratamientos semanales, pues los estados de elevada humedad que favorecen a la enfermedad, lavan con frecuencia la capa de fungicida protectora de los productos incorporados. Por ello, se recomienda dar un tratamiento fungicida siempre, después que se produzcan las condiciones ideales para el patógeno (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2001). Los fungicidas de contacto mayormente utilizados para el control de esta enfermedad son mancozeb, clorotalonil y los cúpricos. Por su parte, metalaxil y cimoxanil son fungicidas sistémicos recomendados Kurozowa & Paván (2016).

2.1.3 Manejo de la enfermedad

Estos mismos autores indican que, como medidas de control, es recomendable evitar la plantación en lugares húmedos, bordes de los ríos y represas, lugares mal ventilados y sujetos a neblina por la acumulación de aire frío y húmedo; adoptar un espaciamiento amplio para favorecer la ventilación y disminuir la humedad ambiental; no utilizar las semillas de frutos enfermos y hacer rotación de cultivo por dos o tres años.

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.

2.2.2 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, Andary, Mondolot-Cosson & Boubais, 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 se asocian a la característica de resistencia/susceptibilidad del genotipo (Lozoya-Saldaña, Rivera-Hinojosa & Colinas-León, 2007), siendo mayor en genotipos resistentes que en susceptibles (Dai *et al.*, 1995).

2.2.3 Defensas antipatogénicas adicionales

Algunas defensas se inducen por la infección de organismos patógenos, las defensas que solo se inducen después del daño inicial necesitan menor inversión de recursos de la planta que las defensas que están siempre presentes, aunque deben activarse 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 un gran número 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 & Dixon, 1997; Nürnberger & Scheel, 2001; Taiz & Zeiger, 2006).

2.2.4 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 (Taiz & Zeiger, 2006).

2.2.5 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 (H_2O_2) aceptando como donadores de hidrógeno a un amplio rango de polifenoles (Burnette, 1977; Djanaguiraman, Devi, Sheeba, Bangarusamy & Babu, 2004; Calderón, 2008), asimismo se asocia a procesos de cicatrización de heridas como la lignificación (Ramamurthy, Ussuf, Nair & Thomas, 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-Saldaña, Almanza-Serrano, Colinas-León, 2006).

Esta enzima es codificada por una larga familia de multigenes en plantas, mostrando un alto grado de polimorfismo. En plantas de *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado más de 100 etiquetas de secuencias expresadas o ESTs (*Expressed Sequence Tags*) codificando diferentes isoenzimas de POX (Østergaard *et al.*, 2000).

Las peroxidasas se clasifican en dos superfamilias, la primera incluye a las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas y la segunda constituida por peroxidasas animales (Hiraga *et al.*, 2000). Dentro de la primera superfamilia, las peroxidasas vegetales se clasifican en la Clase III. Saathoff *et al.*, (2013) señalan que las peroxidadasas de esta Clase tienen un papel importante en la defensa de las plantas y que pueden servir como marcadores enzimáticos en respuesta al estrés.

La totalidad de genes que codifican las peroxidasas de Clase II y III presentan secuencias en el extremo N-terminal que codifican un péptido señal. Estos péptidos señal dirigen a las peroxidasas hasta el espacio extracelular siguiendo una ruta que comienza en el retículo endoplasmático donde se forman los puentes disulfuro en un plegamiento cotraduccional (Freedman, 1982). y se unen dos cationes calcio que estabilizan la estructura de la apoperoxidasa resultante. Posteriormente, tiene lugar un procesamiento adicional de los carbohidratos en el aparato de Golgi, después del cuál las peroxidasas en la mayor parte de los casos son secretadas. Se encuentran también peroxidasas localizadas en tejidos meristemáticos, en las células epidérmicas, y vasculares. En todos estos tejidos las peroxidasas están localizadas tanto en las paredes celulares como en las vacuolas (Pérez-Galende, 2016).

Estudios sugieren que la actividad de peroxidasa y otras enzimas como superóxido dismutasa incrementan su síntesis al presentarse condiciones ambientales desfavorables (Pérez, 1999), o ante progreso de enfermedades como el tizón tardío (Lozoya *et al.*, 2007), así como también tras la aplicación de fungicidas (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016; Horotan y Oancea, 2013).

2.2.6 Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (1.15.1.1; SOD) constituye una de las defensas primarias contra el estrés oxidativo. Pertenece 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, Van-Camp, Van Montagu & Inze, 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 éste sus propiedades moleculares y su localización cambian (Robledo-Esqueda *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).

Las enzimas 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 & Núñez (2003) encontraron que la actividad 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 actividad de peroxidasa y superóxido dismutasa se

incrementó en plantas de tomate cuando se sometieron a estrés por inundación durante 72 horas al inicio del periodo de floración.

2.3. Acción de los fungicidas

Los fungicidas son agentes, de origen natural o sintético, que actúan para proteger a las plantas contra la invasión de hongos y/o para erradicar la infección micótica establecida, con el fin de proteger a los cultivos y mantener su potencial de rendimiento, medido como la cantidad o calidad del producto (Oliver & Hewitt, 2014). Los fungicidas pueden ser clasificados de acuerdo su relación a la movilidad y/o posicionamiento en la planta como en tópicos o inmóviles, mesostémicos, de profundidad, loco-sistémicos o translaminares, sistémicos; de acuerdo a su relación al momento de aplicación y las subfases del proceso de infección interferidas como preventivos, curativos, erradicantes; en relación a la absorción de los fungicidas por las esporas: de contacto, protectores; en relación al mecanismo, o modo de acción o mecanismo bioquímico de acción; en relación al grupo químico (estrobilurinas, triazoles, carboxamidas, etc.) (Reis, Reis & Carmona, 2010).

2.3.1. Modo de acción de los fungicidas

Los fungicidas presentan diferentes modos de acción, los cuales actúan inhibiendo procesos metabólicos específicos de los hongos, según la familia química del fungicida (Krämer, Schirmer, Jeschke & Witschel, 2012). Los procesos conocidos que son inhibidos por fungicidas son: síntesis de ácidos nucleicos (metalaxyl), mitosis y división celular (benomilo, carbendazim, tiofanato metílico, carboxin, Benzovindiflupyr, boscalid), respiración (azoxystrobina, fluoxastrobina, kresomin metil, trifloxistrobina), síntesis de aminoácidos y proteínas (cyprodinil mepanipyrim, pyrimethanil), transducción de señal (quinoxifen, fludioxonil, iprodione), síntesis de lípidos (pyrazophos, propamocarb), biosíntesis de esteroides de membranas (fenarimol, triazoles), biosíntesis de la pared celular (dimethomorph, flumorph, pyrimorph), biosíntesis de melanina en la pared celular (fenoxanil, fthalide), y la activación de defensas

en la planta huésped (acibenzolar-S-methyl, probenazole, cymoxanil, fosetyl-Al, sales de fosfito) (Oliver & Hewitt, 2014). Además, existen otros fungicidas cuyo modo de acción son desconocidos como el diclomezine, methasulfocarb y dodine, así como también existe otro grupo de fungicidas que presentan sitios de acción múltiples como el mancozeb, maneb, propineb, Thiram, zineb, clorotalonil, entre otros. (Reis *et al.*, 2010; Krämer *et al.*, 2012; Oliver & Hewitt, 2014).

2.3.2. Fungicidas como inductores de resistencia en plantas

El mecanismo de resistencia natural es tema actual de estudio en el mundo académico (Dey & Harnborne, 1997; Oliver & Hewitt, 2014); La inoculación de plantas con un agente patógeno avirulento da como respuesta la acumulación de ácido salicílico, resultando en una resistencia por parte del hospedero a la enfermedad. Además, los tejidos distantes del sitio de inoculación también mostraron resistencia, un fenómeno conocido como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Malamy, Carr, Klessig & Raskin, 1990). El ácido salicílico es transportado dentro de la planta y da lugar a la inducción de genes de defensa. Parte del ácido salicílico se almacena como el glucósido. Una infección posterior causa la liberación de ácido salicílico del glucósido y su acumulación en el sitio de la infección. Los genes de defensa se inducen, el crecimiento fúngico es inhibido y la expresión de la enfermedad no ocurre o se ralentiza. Estos estudios sugirieron que los agentes que puedan inducir SAR presentan un nuevo amplio espectro para el control de enfermedades de plantas por períodos prolongados. Algunos productos químicos conocidos por inducir la defensa de plantas son el probenazole, el cual se utiliza para controlar *Pyricularia oryzae* en arroz y cebada, por medio de la inducción de reacciones de defensa, estimulando la acumulación de sustancias fungitóxicas como ácido α -linoleico, y la actividad de fenilalanina amono-liasa, peroxidasa y catecol-metiltransferasa, además de presentar un efecto fungicida directo inhibiendo el desarrollo temprano de hongos etapas, reduciendo de la germinación de las esporas, la formación de apresorios y la penetración del hongo (Oliver & Hewitt, 2014). El acibenzolar-S-methyl, también

es otro producto sintético que además de presentar efecto fungicida directo, induce la SAR (Kessmann *et al.*, 1996).

Entre los fungicidas químicos más actuales, se conoce el caso del benomilo, el cual tiene un efecto protector ante el estrés oxidativo, elevando la actividad de la SOD, y evita la peroxidación de los lípidos de las membranas de las clorofilas (Calatayud y Barreno, 2001); el fosetyl-Al, que estimula la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD y la PAL en presencia de enfermedad, induciendo la defensa de las plantas (Robledo-Esqueda, Lozoya-Saldaña & Colinas-León, 2012) y en ausencia de enfermedad se ha demostrado que aumenta la actividad de POX y SOD (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016). Por otro lado, el fluoxastrobin (estrobilurina) también induce la actividad de la SOD en plantas sanas (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016). Otro fungicidas como la combinación de azoxystrobin y epoxiconazol retrasan la senescencia de *Triticum aestivum* debido a una mejora del potencial antioxidante que protege a las plantas de las especies de oxígeno activo dañino (Wu & Von Tiedemann, 2002), el Acrobat® MZ (mancozeb + dimetomorf), incrementa la actividad de la catalasa y peroxidasa en presencia de enfermedad en plantas de jitomate (Horotan y Oancea, 2013).

2.4. Literatura citada

- 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.
- Burnette, F. (1977). Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *J. Food Sci.*, 42, 1-6.
- Calatayud, A. and E. Barreno (2001). Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomy. *Environmental Pollution* 115: 283-289.
- 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.

- Chavarro, E., Ángel, J.E. 2005. Reacción en cadena de la polimerasa 16S ADN y amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN para la detección y diferenciación molecular de *Ralstonia solanacearum* en plantas de Musa sp. Memorias II Seminario Internacional Sobre Producción, comercialización e industrialización de plátano. Manizales. Colombia, 14-31.
- Collinge, D. B., Gregersen, P., & Thordal-Christensen, H. (1993). 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 viticola*). Eur. J. Plant Pathol., 101, 541-547.
- Dey, P. M. & J. B. Harborne (1997). Plant Biochemistry. Academic Press. 571 p.
- Díaz R., P. (2006). Papel de las actividades superóxido dismutasa y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damselae* 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., and 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.
- Freedman, R.B. (1989). Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. Cell, 57, 1069-1072.
- J. Glaab and W. M. Kaiser, "Increased nitrate reductase activity in leaf tissue after application of the fungicide Kresoximmethyl". Planta, 207(3), 442-448.
- Goodman, N. R., Kirán, Z., & Wood, K. R. (1986). The biochemistry and physiology of the plant disease. Columbia: University of Missouri Press.

433 p.

- Gottsein H. D. and J. Kuúc (1989) Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. *Phytopathology* 79:176-179.
- Grossmann, K., Kwiatkowski, J., and G. Caspar (1999). Regulation of phytohormone levels, leaf senescence and transpiration by the strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology*, 154, 805–808.
- 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.
- Horotan, A. & Oancea, S. (2013). Effects of Fungicide and Acetylsalicylic Acid Treatments on the Physiological and Enzymatic Activity in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 17(1), 13-26.
- Jaramillo, J.; Rodríguez, V.P.; Guzmán, M.; Zapata, M. & Rengifo, T. (2007). Manual Técnico de Buenas Prácticas Agrícolas - BPA en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. CORPOICA - MANA - Gobernación de Antioquia - Centro de Investigación La Selva. FAO. Colombia.
- Jones, D. H. (1984). Phenilalanine amonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry*, 23, 1349-1359.
- Kessman H., T. Staub, C. Hofmann, T. Maetzke, G. Herzog, E. Ward, S. Uknes and J. Ryals (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 439-460.
- Kessmann, H.; Oostendorp, M.; Ruess, W.; Staub, T.; Kunz, W. & J. Ryals (1996) Systemic activated resistance – a new technology for plant disease control. *Pesticide Outlook* 7(3), 10-13.
- Kombrink, E., & Somssich, I.E. (1995). Defense responses of plants to pathogens. *Adv. Bot. Res.*, 21, 1-34.
- Krämer, W.; Schirmer, U.; Jeschke, P. & Witschel, M. (eds) (2012). *Modern Crop Protection Compounds*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Kurozawa, C., Pavan, M. A. (2016). Doenças do tomateiro. In: *Manual de Fitopatología*. Kimati, H; Amorim, L; Bergamin Filho, A; Camargo, LEA; Rezende JAM. eds. San Pablo, BR. Editora Agronômica Ceres. v. 2, 820 p.
- Kuúc J. (1982) Induced immunity to plant disease. *BioScience*, 32, 854-860.

- 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.
- Lozoya-Saldaña, H., Robledo-Esqueda, M. N., Rivas-Valencia, P., Sandoval-Islas, S., Colinas y León, M. T. B., & Nava-Díaz, C. (2017). Sensitivity to fungicides of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chapingo, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(3), 175-186.
- Madriz O. K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo integrado de plagas*, 63, 22-32.
- Malamy, J.; Carr, J.P.; Klessig, D. & Raskin, I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250(4983), 1002–1004
- 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.
- Nürnbergger, T., & Scheel, D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.*, 6, 372-379.
- Østergaard, L., Teilum, K., Mirza, O., Mattsson, O.; Petersen, M.; Welinder, K. G., Mundy, J., Gajhede, M., Henriksen, A. (2000). *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Molecular Biology*, 44, 231-243.
- Oliver, R. P. & H. G. Hewitt (2014). *Fungicides in Crop Protection*. Gutenberg Press Ltd, Tarxien, Malta.

- Pérez, I. (1999). Comportamiento de variedades de plántulas de tomate en condiciones de inundación del suelo. *Cultivos Tropicales*, 20(2), 41-44.
- Pérez-Galende, P. (2016). Nuevas peroxidasas de origen vegetal: aislamiento, caracterización y aplicaciones. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Salamanca. 261 p.
- 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.
- Reis, E. M; Reis, A.C. & Carmona M. (2010). Manual de fungicidas. Controle químico de doenças de plantas. (en portuges) ISBN 97885-7515-464-9 Ed: Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo , Brasil, 226 pp.
- Robinson, D. S. (1991). Peroxidases and their significance in fruits and vegetables. In: P. F. Fox (Ed.), *Food Enzimology* (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.
- Saathof, A. J., Donze, T., Palmer, N. A., Bradshaw, J., Heng-Moss, T., Twigg, P., Tobias, C. M., Lagrimini, M., Sarath, G. (2013). Towards uncovering the roles of switchgrass peroxidases in plant processes. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-12.
- Serrano-Cervantes, R., Lozoya-Saldaña, H., Colinas y León, M. A. & S. Gerardo Leyva-Mir (2016). Algunas alteraciones enzimáticas en papa causadas por fungicidas. *Rev. Fitotec. Mex*, 39 (1): 25 – 31.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- 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.
- 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.

White R. F. (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99:410-412

Wu, Y. X, & A. Von Tiedemann (2002). "Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone," *Environmental Pollution*, 116 (1), 37–47.

3. FUNGICIDAS-PATÓGENO EN REACCIONES DE DEFENSA DEL JITOMATE

Guillermo Andrés Enciso-Maldonado¹, Héctor Lozoya-Saldaña¹, Mario Alberto Vázquez-Peña², María Teresa Colinas-León¹, Efraín Contreras-Magaña¹

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

RESUMEN

La infección por fitopatógenos generalmente activa una serie de mecanismos de defensa de las plantas cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar el desarrollo de la enfermedad. Algunos agroquímicos también estimulan dichos mecanismos. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la síntesis de fenoles totales (FEN), y la actividad de fenilalanina amonioliase (PAL), peroxidasas (POX) y superóxido dismutasa (SOD) en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con fosetyl-Al (1.25 g/L), fluoxastrobin (2.5 ml/L) y sin fungicida, en ausencia y presencia de *Phytophthora infestans*, oomiceto causante del tizón tardío, en condiciones de invernadero, bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3 con 3 repeticiones. Veinte días después del trasplante, se iniciaron aplicaciones semanales de los tratamientos. Se tomaron muestras a los 2 y 7 días después de cada una de once aplicaciones. 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. La aplicación de fosetyl-Al y fluoxastrobin indujeron mayor síntesis/actividad de compuestos y enzimas tanto en las plantas infectadas como en las sanas, aunque esta inducción de mecanismos de defensa fue variable según tratamiento y momento de evaluación. La mayor síntesis de fenoles ocurrió en plantas enfermas y con fungicidas, seguidas de plantas sanas con fungicidas, luego por plantas enfermas sin fungicidas y por último en plantas sanas. La actividad de la PAL fue mayor en plantas enfermas y con fungicidas, seguido de plantas enfermas sin fungicida y luego por plantas sanas tratadas con fungicidas; mientras que la mayor actividad de la POX ocurrió en plantas sanas tratadas con fungicidas. Por otro lado, el fosetyl-Al indujo la actividad de la SOD en plantas sanas y en menor medida el

fluoxastrobin en plantas enfermas. Se encontró el mismo número de correlaciones positivas entre enzimas y compuestos fenólicos para plantas sanas e infectadas. Se concluye que la síntesis y actividad de los metabolitos cuantificados se alteró selectivamente en función de los tratamientos y del momento de aplicación.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum* L., enzimas de defensa, *Phytophthora infestans*.

SUMMARY

Plant pathogen infection usually triggers a series of defense mechanisms in plants in order to stop, slow, or counteract the development of the disease. Some agrochemicals also stimulate these mechanisms. The objective of the present research was to quantify the synthesis of total phenols (FEN) and the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidases (POX) and superoxide dismutase (SOD), in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) treated with fosetyl-Al (1.25 g / L), fluoxastrobin (2.5 ml / L) and without fungicide, in the absence and presence of *Phytophthora infestans*, oomycete that causes late blight, under greenhouse conditions, with a completely randomized design with a 2x3 factorial arrangement with 3 repetitions. Twenty days after the transplant, weekly applications of the treatments were initiated. Samples were taken at 2 and 7 days after each of 11 applications. Acetone powder was prepared and the enzymatic determination was made from there. The statistical analysis consisted of a factorial ANAVA and correlation analysis. The application of fosetyl-Al and fluoxastrobin induced greater synthesis/activity of compounds and enzymes in both infected and healthy plants, although this induction of defense mechanisms was variable according to treatment and time of evaluation. The highest synthesis of phenols occurred in diseased plants and with fungicides, followed by healthy plants with fungicides, then by diseased plants without fungicides and finally in healthy plants. PAL activity was higher in diseased plants, with fungicides, followed by diseased plants without fungicide, and then by healthy plants treated with fungicides; while the greater activity of the POX occurred in healthy plants treated with fungicides. On the other hand, fosetyl-Al induced the activity of SOD in healthy plants and to a lesser extent fluoxastrobin in diseased plants. The same number of positive correlations between enzymes and phenolic compounds was found for healthy and infected plants. It is concluded that the synthesis and activity of the quantified

metabolites were selectively altered depending on the treatments and the time of application.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., defense enzymes, *Phytophthora infestans*.

INTRODUCCIÓN

El infección de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección; estos mecanismos pueden ser preformados o inducidos (Madriz, 2002). En el sitio de la infección, a menudo se inicia una respuesta hipersensible en plantas resistentes, que se manifiesta como lesiones necróticas que resultan de la muerte de la célula huésped. Además, las partes distantes no infectadas de la planta pueden desarrollar resistencia sistémica adquirida, lo que da como resultado una defensa mejorada de larga duración contra los mismos u o incluso otros patógenos (Fodor *et al.*, 1997; Wendehenne, Durner, Chem & Kessig, 1998). Ambas respuestas (HR y SAR), están asociadas con una mayor expresión de un gran número de genes involucrados en la defensa de las plantas (Klessig & Malamy, 1994). Una de las reacciones de defensa comunes en plantas es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), principalmente anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). La acumulación de estas sustancias en las células vegetales puede ser tóxica para la planta y el patógeno. Estas EROs activan moléculas para la inducción de genes de defensa y la polimerización de proteínas que compone la pared celular, además de estimular la producción de enzimas de defensa (Barbosa-Nascimento & Freitas-Barrigossi, 2014). El sistema enzimático desempeña un papel importante en la defensa de la planta contra fitopatógenos, en donde estas sirven como defensa antioxidante, limitando la propagación de los procesos oxidativos permitiendo que las células mantengan su viabilidad contra la penetración de hongos (Peluffo *et al.*, 2010; Djebali *et al.*, 2011). Entre las enzimas de defensa se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), la cual constituye la primera línea de defensa contra los efectos tóxicos de los niveles elevados de EROs (Gill & Tuteja, 2010). La SOD remueve el $O_2^{\bullet-}$, catalizando su dismutación, donde una molécula de $O_2^{\bullet-}$ es reducida a H_2O_2 y otra oxidada a O_2 , por lo tanto disminuye el riesgo de formación de $OH^{\bullet}$ en el interior de la célula (Mittler, 2002; Gill & Tuteja, 2010; Taiz &

Zeiger, 2006). La peroxidasa cataliza la oxidorreducción entre H_2O_2 y varios reductores, participa en varios procesos fisiológicos de las plantas tales como en la lignificación, suberización, formación de componentes de la pared celular, catabolismo de auxinas, senescencia y protección contra la infección de patógenos, ataque de insectos y elicitores abióticos (Almagro *et al.*, 2009). También, la fenilalanina amonio-liasa (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 un gran número de mecanismos de defensa (Lozoya-Saldaña, Rivera-Hinojosa & Colinas-León, 2007). Por otro lado, las células de las plantas y sus organelos, como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas emplean un sistema de defensa antioxidante, a partir de otras moléculas no enzimáticas como carotenoides, ácido ascórbico, prolina, vitamina E, flavonoides y prolina (Davar, Darvishzadeh & Majd, 2013). Entre estas moléculas, se encuentran los compuestos fenólicos (FEN), que se forman a partir de la ruta de los fenilpropanoides y constituyen 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, Andary, Mondolot-Cosson & Boubais, 1995).

Actualmente el estudio de los nuevos fungicidas también se enfoca sobre su efecto en el hospedante, con el fin de conocer hasta qué punto los productos estimulan las reacciones de defensa de la planta. Los mecanismos de acción de algunos fungicidas sobre el patógeno inducen también reacciones no específicas de defensa de la planta, independientemente de la infección (Calatayud & Barreno, 2001; Robledo-Esqueda, Lozoya-Saldaña & Colinas-León, 2012; Serrano-Cervantes, Lozoya Saldaña, Colinas-León & Leyva-Mir, 2016). El fosetyl-Al estimula la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD y la PAL en presencia de enfermedad, induciendo la defensa de las plantas (Robledo-Esqueda *et al.*, 2012) y en ausencia de enfermedad se ha demostrado que aumenta la actividad de POX y SOD (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016). Por otro lado, el fluoxastrobin (estrobilurina) también induce la actividad de la SOD en plantas sanas (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016).

El objetivo del presente fue cuantificar el contenido de fenoles totales (FEN) y la actividad

de fenilalanina amonioliase (PAL), peroxidases (POX) y superóxido dismutasa (SOD) en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) con y sin fungicidas, en ausencia y presencia de *Phytophthora infestans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y tratamientos

Bajo condiciones de invernadero, se estableció un diseño de tratamientos factorial 2X3 bajo un diseño experimental completamente al azar ($r=3$). El factor infección tuvo como niveles planta sana (PS) y planta infectada (PI) con *Phytophthora infestans*, mientras que el factor fungicida tuvo como niveles: Testigo (Agua) (T), Fosetyl-Al (12,5 g/10 L agua) (Fos) y Fluoxastrobin (25 mL/10 L agua) (Flu) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados.

Tratamiento	Producto	Dosis	Presencia de enfermedad
T/PS	Testigo (agua)	-	No
T/PI	Testigo (agua)	-	Si
Fos/SP	Fosetyl-Al	12,5 g/10 L agua	No
Fos/PI	Fosetyl-Al	12,5 g/10 L agua	Si
Flu/SP	Fluoxastrobin	25 mL/10 L agua	No
Flu/PI	Fluoxastrobin	25 mL/10 L agua	Si

Muestreo

Se realizaron cinco aplicaciones de tratamientos (a los 20, 27, 34, 41, 48 y 55 días después del trasplante). Los muestreos de hoja se realizaron a los 2 y 7 días después de cada aplicación (dda). Previo a la primera a aplicación se realizó un muestreo para conocer el estatus de las plantas en cuanto al contenido de fenoles y actividad enzimática (M1). Los muestreos M2, M4, M6, M8 y M10 se tomaron a los 2 dda y los muestreos M3, M5, M7, M9 y M11 a los 7 dda. 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, Colinas-León, Martínez-Damián & Soto-Hernández, (2002). A partir de 40 g de foliolo 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 se congeló 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 descrita por Waterman & 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 & Lafuente (1997). A partir de 0.1 g de polvo de acetona se agregaron 5 ml de buffer bTampón 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 se vertió en tubos de centrifuga. La mezcla se centrifugó (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 20 070 Xg, 4 °C durante 20 minutos. Se agregó sulfato de amonio (0.46 g por ml de solución) y se agitó vigorosamente. Los tubos se colocaron en baño de hielo y agitados (Max Q 4450, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) durante 20 min a 15 °C, posteriormente se centrifugó (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 20 070 Xg, 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 se tomaron ambas lecturas a 290 nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts). Se dejó reposar 2 horas incubando a 39 °C y se tomó la lectura nuevamente.

Peroxidasa

La actividad de peroxidasa se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Flukley & 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 se homogeneizó en frío (T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA) durante 30 segundos. La mezcla se centrifugó (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 22 617 Xg, 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 segundos a 470 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts).

Superóxido dismutasa

La determinación de superóxido dismutasa se realizó mediante la metodología descrita por Beyer & 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 se homogeneizó en frío T25 Ultra turrax, IKA, Wilmington, USA) durante 30 segundos. La mezcla se centrifugó (Sorvall RC 6+, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts) a 22 617 Xg, 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 se tomaron 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 cada fecha de muestreo, mientras que para conocer la relación entre enzimas se realizó un análisis de correlación general, para plantas enfermas y para plantas sanas, así como también para cada producto en presencia y ausencia de enfermedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenoles Totales

Se registró un incremento en el contenido de fenoles totales en función del tiempo. De manera general, se observó mayor síntesis de fenoles en plantas infectadas y con fungicidas, seguidas por las sanas con fungicidas, enfermas sin fungicida y sanas sin fungicidas. Además, las evaluaciones realizadas a los 2 dda resultaron en mayor síntesis de fenoles que aquellas realizadas a 7 dda. Hasta el M3 los productos y la infección tuvieron el mismo efecto. En el M4, el Fluoxastrobin indujo mayor síntesis en plantas sanas; en el M6 ocurrió síntesis en todos los tratamientos, excepto el T/SP. El fosetyl-Al indujo mayor síntesis en plantas infectadas en los muestreos 8 y 10. En las evaluaciones a los 7 días no se observaron diferencias significativas, a excepción del M5, donde el T/PI con infección indujo la mayor síntesis (Figura 1 A y Figura 1 B; Cuadro 3). La síntesis de fenoles en las plantas enfermas y sin fungicidas fue aumentando a medida que el tizón la dejaba sin follaje; esto concuerda con lo observado por Lozoya *et al.* (2007), quienes encontraron que a mayor infección existió mayor síntesis de fenoles, cuando se supone que la relación debe ser inversa.

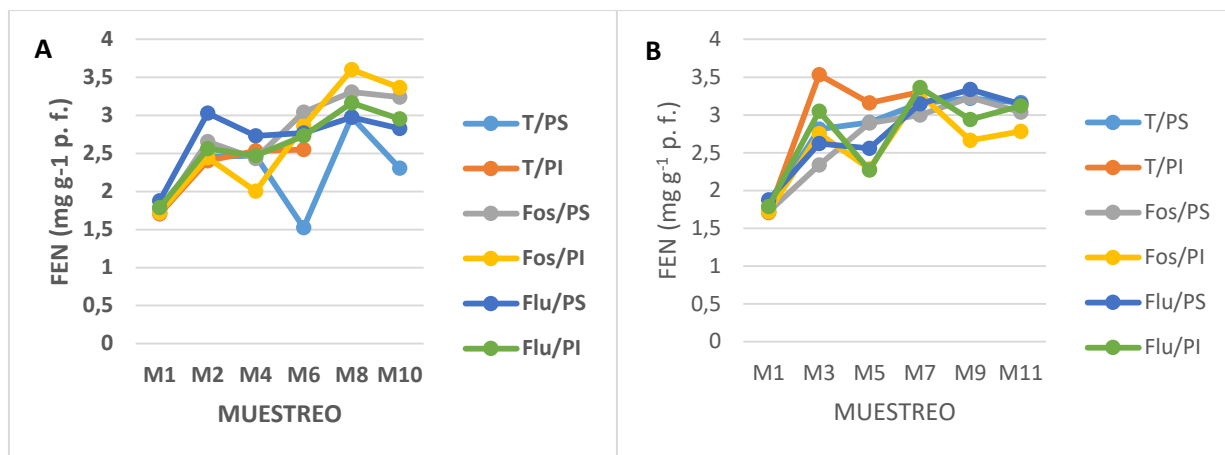


Figura 1. Contenido de fenoles totales. A, evaluaciones a los 2 días después de la aplicación; B, evaluaciones a los 7 días después de la aplicación.

Fenilalanina amonio-liasa

La actividad de fenilalanina amonio-liasa fue variable en función del tiempo. En las evaluaciones realizadas a los 2 dda, los tratamientos no mostraron diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). A pesar de ello, numéricamente existió mayor actividad de la PAL con Fos/SP en M2, M6 y M10, seguidamente T/PI y y Flu/PI mostraron la segunda mayor actividad en M2 y M6. En M8, Flu/PI presentó la mayor actividad de la PAL. También, Fos/PI y Flu/SP se comportaron de manera similar, alcanzando la mayor actividad enzimática en M4 (Figura 2A, Cuadro 4). En las evaluaciones realizadas a los 7 dda, se identificaron diferencias estadísticas en M5 y M11. En M5, Fos/PI presentó la mayor actividad de la enzima, seguida por T/PI. En M11, Flu/PI y Flu/SP mostraron la mayor actividad de la PAL. En M3 se observa una alta actividad enzimática con T/PI y T/PS (testigos) y en M5, la actividad es mayor con Fos/PI y T/PI, sin embargo, en ambas situaciones no se observan diferencias significativas (Tukey, $\alpha \leq 0.05$) (Figura 2B, Cuadro 4). Se registró mayor actividad enzimática en las evaluaciones realizadas a los 2 dda que en las evaluadas a los 7 dda. El tratamiento testigo indujo un único incremento de la actividad enzimática, manteniéndose estable y en los demás muestreos (Figura 2A y 2B, Cuadro 4). Robledo-Esqueda *et al.*, (2012) observaron que la actividad de la PAL se vio inducida por el estímulo generado por Fosetil-AI en plantas de papa infectadas por *P. infestans*, así como ocurre en este trabajo.

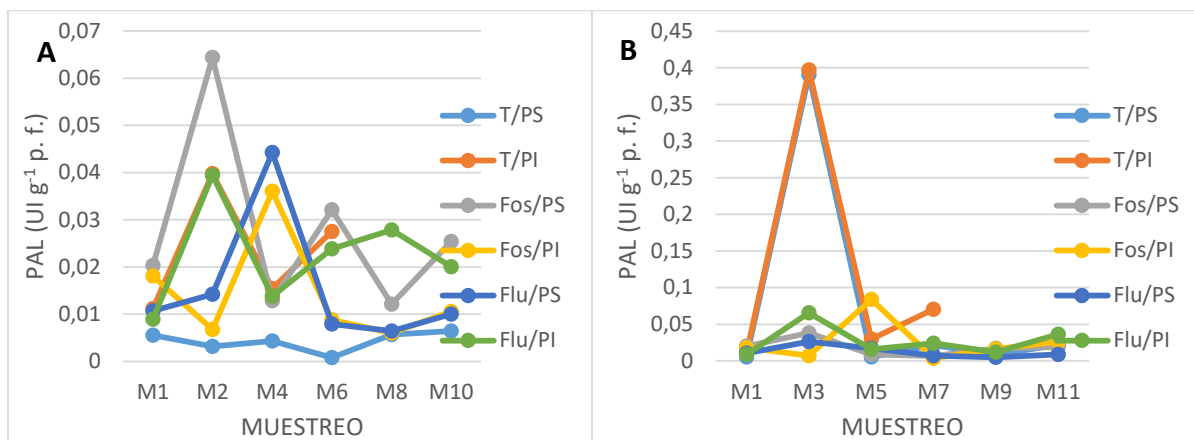


Figura 2. Actividad de PAL; A, evaluaciones a los 2 días después de la aplicación; B, evaluaciones a los 7 días después de la aplicación.

Peroxidasa

La actividad específica de peroxidasa fue variable. Hasta el muestreo 3 los productos y la infección tuvieron el mismo efecto. En M2 y M4, el tratamiento Fos/PS indujo la mayor actividad de la enzima, mientras que Flu/PS lo hizo en M6, M8 y M10. En las evaluaciones a los 7 días no se observaron diferencias significativas, excepto en M3 y M5, en donde el Fos/PS y el Flu/PS indujeron la mayor actividad enzimática (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). Los fungicidas estudiados indujeron mayor actividad de la peroxidasa en plantas sanas como mecanismo de defensa. En plantas infectadas y, en plantas infectadas y con fungicidas no se observaron diferencias significativas (Figura 3A y 3B; Cuadro 5). Serrano-Cervantes *et al.* (2016), encontraron que, en ausencia de patógeno, la aplicación de fosetil-AI indujo la actividad de la POX en el cultivo de papa, no así el fluoxastrobin.

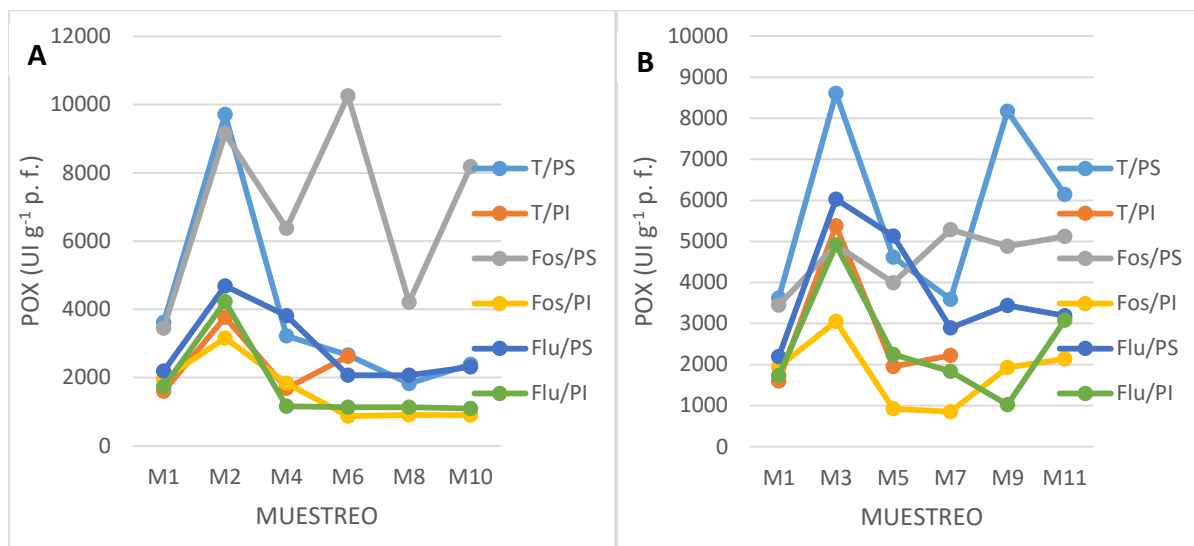


Figura 3. Actividad de la POX; A, evaluaciones a los 2 días después de la aplicación; B, evaluaciones a los 7 días después de la aplicación.

Superóxido dismutasa

La actividad de la SOD fue disminuyendo con el tiempo. Se comportó de manera similar en las evaluaciones a los 2 y 7 dda (Figura 4A, Cuadro 6). En M4, las plantas infectadas y sin fungicidas (T/PI) indujeron la mayor síntesis de la SOD, mientras que en M6, los tratamientos T/PI, Fos/PS y Flu/PI indujeron la mayor actividad de la SOD, registrándose diferencias significativas (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). En M8 y M10, Fos/PS indujo la mayor actividad enzimática. Por otro lado, en los muestreos a los 7 dda, no se registraron diferencias significativas hasta M9 (Tukey, $\alpha \leq 0.05$), en donde Fos/PS, mantuvo alta la actividad de la SOD. En M11, Fos/PS, Fos/PI y Flu/PI mostraron una mayor actividad de la SOD, comparándose con los otros tratamientos. (Figura 5B, Cuadro 6). La respuesta de la SOD difiere de lo observado por Serrano-Cervantes *et al.* (2016), en donde el fluoxastrobin estimuló la actividad de dicha enzima pero en plantas de papa sanas. Por otro lado, Robledo-Esqueda *et al.* (2012) observaron que la actividad de SOD se vio inducida por el estímulo generado por fosetil-Al cuando se aplicó a la semilla y al follaje de papa en presencia de tizón tardío.

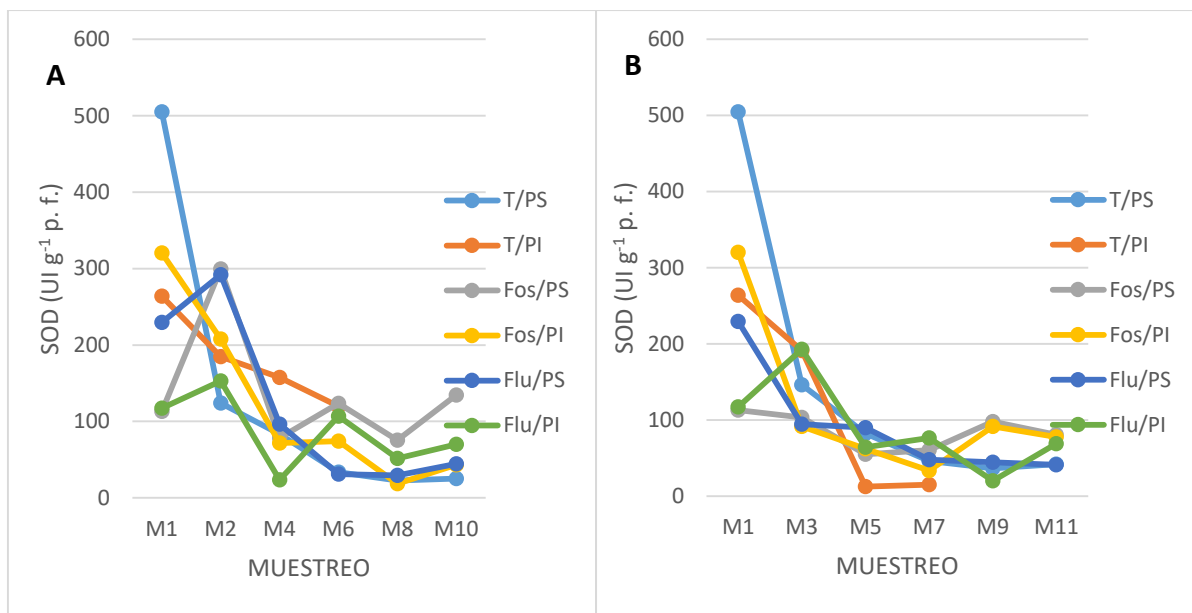


Figura 4. Actividad de SOD; A, evaluaciones a los 2 días después de la aplicación; B, evaluaciones a los 7 días después de la aplicación.

Análisis de correlación

La correlación FEN/POX se registró únicamente para los testigos con y sin enfermedad, siendo mayor la correlación en plantas sanas (Cuadro 2). La correlación FEN/POX solo fue significativa en las plantas infectadas tratadas con fluoxastrobin. Las correlaciones significativas entre FEN/SOD ocurrió en el testigo con enfermedad y de manera negativa en plantas enfermas tratadas con fosetyl-Al. Correlaciones significativas en la interacción POX/SOD fueron halladas en plantas tratadas enfermas sin fungicidas y con fluoxastrobin y en plantas sanas tratadas con fosetyl-Al. En la interacción POX/PAL se observó una alta correlación positiva en el análisis general de plantas sanas, seguida del análisis general de experimento y por último en plantas sanas tratadas con fluoxastrobin. El análisis de correlación general de plantas sin enfermedad también mostró una correlación significativa en la interacción SOD/PAL, así también en para plantas enfermas sin fungicidas y para plantas sanas tratadas con fosetyl-Al. De acuerdo a lo anterior se observa que las correlaciones significativas ocurren con ambos testigos y ambos fungicidas, tanto en presencia como en ausencia de enfermedad (Cuadro 2).

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

Interacción	Tratamiento	Infección	Correlación
FEN/POX	Testigo	NO	0,89
	Testigo	SI	0,74
FEN/POX	Fluoxastrobin	SI	0,35
FEN/SOD	Testigo	SI	0,41
	Fosetyl-Al	SI	-0,59
POX/SOD	Testigo	Si	0,47
	Fosetyl-Al	NO	0,54
	Fluoxastrobin	Si	0,61
POX/PAL	General	-	0,64
	General	NO	0,95
	Fluoxastrobin	NO	0,37
SOD/PAL	General	NO	0,67
	Testigo	Si	0,35
	Fosetyl-Al	NO	0,71

DISCUSIÓN GENERAL

La aplicación de fosetyl-Al y fluoxastrobin indujeron el mayor contenido de compuestos fenólicos y actividad de enzimas tanto en las plantas infectadas como en las sanas. El mayor contenido de fenoles ocurrió en plantas enfermas y con fungicidas, seguidas de plantas sanas con fungicidas, luego por plantas enfermas sin fungicidas y por último en plantas sanas. La actividad de la PAL fue mayor en plantas enfermas y con fungicidas, seguido de plantas enfermas sin fungicida y luego por plantas sanas tratadas con fungicidas; mientras que la mayor actividad de la POX ocurrió en plantas sanas tratadas con fungicidas. Por otro lado, el fosetyl-Al indujo la actividad de la SOD en plantas sanas y en menor medida el fluoxastrobin en plantas enfermas. Se encontró el mismo número de correlaciones positivas entre enzimas y compuestos fenólicos para plantas sanas e infectadas.

El metabolismo de los compuestos fenólicos está regulado por la actividad de diversas enzimas, como la PAL y la POX (Dey & Harborne 1997). El primer paso necesario para la biosíntesis del esqueleto fenilpropanoide en plantas superiores es la desaminación de L-fenilalanina para producir ácido transcinámico y amoniaco. Esta reacción es catalizada

por PAL y se considera comúnmente como un paso clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos (Rösler, Krekel, Amrhein & Schmid, 1997). A su vez, la actividad de la PAL se ve condicionada varios factores como la luz, temperatura, nutrición, reguladores de crecimiento e inhibidores de la síntesis de ARN y/o proteínas (Jones, 1984; Ramamurthy, Ussuf, Nair & Thomas, 2000). La actividad de PAL como la de POX están reguladas por múltiples genes que codifican su expresión, algunos de los cuales solo se expresan bajo condiciones específicas (Taiz & Zeiger, 2006). En este estudio se incluyeron fungicidas que anteriormente fueron reportados como inductores de la actividad de enzimas y de la síntesis de compuestos fenólicos en plantas sanas (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016) y en plantas infectadas (Robledo-Esqueda *et al.*, 2012). Aquí se buscó conocer el efecto de los fungicidas en ambas situaciones a fin de identificar algún reforzamiento de defensa inducido en la planta con fungicidas y cuantificar hasta qué punto los efectos residuales de los tratamientos estimulaba las reacciones de defensa de la planta para protección indirecta contra la infección natural del tizón tardío.

En estudios similares se ha constatado la inducción de las enzimas POX y SOD en plantas de papa sanas (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016) y de la SOD y la PAL en plantas de papa enfermas (Robledo-Esqueda *et al.*, 2012) por medio del fosetyl-Al, el cual es un fungicida multisitio, sistémico y conocido como inductor de resistencia de plantas (Pesticide Properties Data Base [PPBD], 2017). A lo que se debe agregar que dicha estimulación ocurre tanto en plantas sanas como infectadas, a partir de este estudio. Por otro lado, en este estudio, el fluoxastrobin indujo la síntesis de fenoles, la actividad de la PAL y POX en plantas sanas, mientras que en plantas enfermas, se observó un incremento la actividad de la PAL y SOD en plantas infectadas. Se ha reportado a la fluoxastrobina como un fungicida sistémico, inhibidor de la respiración celular (PPBD, 2017), y una investigación reciente ha demostrado que estimula la actividad de la SOD en plantas de papa sanas (Serrano-Cervantes *et al.*, 2016).

Los productos incluidos en el presente estudio estimularon respuestas comunes de defensa enzimática y de compuestos fenólicos tanto en ausencia como en presencia de patógenos. Con los resultados del presente estudio, y considerando ambas situaciones, presencia o no de patógenos, se puede afirmar que los estímulos y las diferencias con el

testigo fueron por efecto de los agroquímicos exclusivamente. Así, a medida que se hicieron las aplicaciones de los productos se detectaron cambios en el contenido de fenoles y en las enzimas incluidas en este estudio.

CONCLUSIONES

- La síntesis y actividad de los metabolitos cuantificados se alteró selectivamente en función de los tratamientos y del momento de aplicación.
- Fosetyl-Al y fluoxastrobin indujeron mayor síntesis/actividad de los compuestos y enzimas incluidos en el presente estudio, tanto en las plantas infectadas como en las sanas.
- Se detectaron correlaciones positivas entre enzimas y compuestos fenólicos independientemente de la infección.

BIBLIOGRAFÍA

- Alia-Tejacal I., M. T. Colinas-León, M. T. Martínez-Damián, & 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.
- Almagro, L.; Gómez-Ros, L. V.; Belchi-Navarro, S.; Bru, R.; Rosbarcelo, A. & M. A. Pedreño (2009).** Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60, 377-390.
- Barbosa-Nascimento, J., & J. E. Freitas-Barrigossi (2014).** O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. *Agrarian Academy*, 1, 234-250.
- Beyer W. F. & I. Fridovich (1987).** Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161, 556-566.
- Calatayud, A. & E. Barreno (2001).** Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomy. *Environmental Pollution* 115: 283-289.
- Dai, G. H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., & D. Boubais (1995).** Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara vitícola*). *Eur. J. Plan. Pathol.*, 101, 541-547.
- Davar, R., Darvishzadeh, R., & A. Majd (2013).** Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia*

sclerotiorum. *Biologia*, 68, 821-829.

Dey, P. M. & J. B. Harborne (1997). *Plant Biochemistry*. Academic Press. 571 p.

Djéballi, N., Mhadhbi, H., Lafitte, C., Dumas, B., Esquerré-Tugayé, M. T., Aouani, M. E. & C. Jacquet (2011). Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. *European Journal Plant Pathology*, 131, 559-571.

Flurkley W. H. & J. J. Jen (1978). Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, 43, 1828-1831.

Fodor, J., Gullner, G., Ádám, A. L., Barna, B., Komives, T. & Z. Király (1997). Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. Role in systemic acquired resistance. *Plant Physiol.*, 1997, 114, 1443-1451.

Gill, S. S. & N. Tuteja (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.

Jones, D. H. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry*, 23, 1349-1359.

Klessig, D. F. & J. Malamy (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.*, 26, 1439-1458.

Lozoya-Saldaña, H., Rivera-Hinojosa, H. 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. & M. T. Lafuente (1997). Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedoof chilled fortune mandarin fruit. *Journal Plant Physiology*, 150, 674-678.

Mittler, R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405-410.

Peluffo, L., Lia, V., Troglia, C., Maringolo, C., Norma, P., Escande, A., Hopp, H. E., Lytovchenko, A., Fernie, A. R., Heinz, R. & F. Carrari (2010). Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Phytochemistry*, 71, 70-80.

Pesticide Properties DataBase (PPBD) (2017). Recuperado de

<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>

- Ramamurthy, M. S., Ussuf, K. K., Nair, P. M., & P. Thomas (2000).** Lignin biosynthesis during wound healing of potato tubers in response to gamma irradiation. *Postharvest Biol. Technol.*, 18, 267-272.
- Robledo-Esqueda. M. N., Lozoya-Saldaña, H. & M. T. Colinas-León (2012).** Inducción de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.) por fungicidas. *Interciencia*, 9, 689-695.
- Rösler, J., Krekel, F., Amrhein, N. & J. Schmid (1997).** Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol*, 113, 175-179.
- Serrano-Cervantes, R., Lozoya-Saldaña, H., Colinas-León, M. T. & S. Gerardo Leyva-Mir (2016).** Algunas alteraciones enzimáticas en papa causadas por fungicidas. *Rev. Fitotec. Mex.* 39, 25–31.
- 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.
- Waterman, P. G. & S. Mole (1994).** Analysis on phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications.Oxford, UK.
- Wendehenne, D.; Durner, J.; Chen, Z. & D. F. Klessig (1998).** Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry*, 47, 651-657.

APÉNDICES

Apéndice 1. Comparación de medias

Cuadro 3. Comparación de medias para fenoles totales (FEN).

Tratamiento	M 1		M 2		M 3		M 4		M 5		M 6	
	mg g ⁻¹ p. f.											
T/PS	1,773	a ^z	2,457	a	2,81	a	2,473	ab	2,902	ab	1,523	B
T/PI	1,707	a	2,404	a	3,533	a	2,533	ab	3,161	a	2,551	A
Fos/PS	1,718	a	2,654	a	2,337	a	2,433	ab	2,894	ab	3,045	A
Fos/PI	1,723	a	2,447	a	2,754	a	2,006	b	2,289	b	2,858	A
Flu/PS	1,876	a	3,032	a	2,623	a	2,732	a	2,558	ab	2,768	A
Flu/PI	1,789	a	2,563	a	3,048	a	2,471	ab	2,271	b	2,73	A
DMSH	0,411		0,677		1,885		0,580		0,644		0,628	
Tratamiento	M 7		M 8		M 9		M 10		M 11			
	mg g ⁻¹ p. f.											
T/PS	3,155	a	2,981	ab	3,218	a	2,307	d	3,165	a		
T/PI	3,305	a	0	d	0	e	0	f	0	b		
Fos/PS	2,997	a	3,308	b	3,23	a	3,242	ab	3,036	a		
Fos/PI	3,276	a	3,602	a	2,663	c	3,367	a	2,783	a		
Flu/PS	3,145	a	2,997	c	3,337	a	2,829	c	3,141	a		
Flu/PI	3,362	a	3,166	bc	2,939	b	2,953	bc	3,123	a		
DMSH	0,480		0,266		0,268		0,309		0,427			

^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.

Cuadro 4. Comparación de medias para fenilalanina amonio-liasas (PAL).

Tratamiento	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
UI g ⁻¹ p. f.						
T/PS	0,0055	a ^z 0,0031	a 0,3904	a 0,0043	b 0,0051	a 0,0008
Fos/PS	0,0203	a 0,0644	a 0,0381	a 0,0128	ab 0,0087	a 0,0321
Flu/PS	0,0106	a 0,0142	a 0,0264	a 0,0442	a 0,0171	a 0,0078
T/PI	0,0111	a 0,0397	a 0,3971	a 0,0154	ab 0,0297	a 0,0275
Fos/PI	0,0180	a 0,0067	a 0,0069	a 0,0360	ab 0,0839	a 0,0087
Flu/PI	0,0089	a 0,0394	a 0,0657	a 0,0138	ab 0,01584	a 0,0238
DMSH	0,0360	0,119	1,011	0,034	0,112	0,055
Tratamiento	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	
UI g ⁻¹ p. f.						
T/PS	0,0214	a 0,0056	a 0,0083	a 0,0064	ab 0,0218	a
Fos/PS	0,0064	a 0,0120	a 0,0171	a 0,0253	a 0,0191	a
Flu/PS	0,0071	a 0,0064	a 0,0049	a 0,0099	ab 0,0087	a
T/PI	0,0703	a 0	a 0	a 0	b 0	a
Fos/PI	0,0035	a 0,0059	a 0,0163	a 0,0105	ab 0,0264	a
Flu/PI	0,0241	a 0,0278	a 0,0117	a 0,0200	ab 0,0366	a
DMSH	0,071	0,0364	0,0105	0,0217	0,0425	

^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.

Cuadro 5. Comparación de medias para peroxidasa (POX).

Tratamiento	M 1		M 2		M 3		M 4		M 5		M 6	
UI g ⁻¹ p. f.												
T/PS	3619,3	a ^z	9710,5	a	8610,2	a	3227,6	bc	4614,0	a	2660,9	b
Fos/PS	3449,1	a	9139,2	a	4910,3	a	6377,5	a	3993,5	ab	10260,3	a
Flu/PS	2192,0	a	4681,8	a	6026,3	a	3811,3	b	5130,3	a	2065,4	a
T/PI	1598,8	a	3769,4	a	5384,5	a	1683,0	cd	1949,8	ab	2627,9	a
Fos/PI	1946,3	a	3153,7	a	3050,0	a	1836,5	cd	919,41	b	871,6	a
Flu/PI	1735,1	a	4229,3	a	4915,1	a	1156,0	d	2250,9	ab	1134,8	a
DMSH	3025,4		7673,7		7463,7		1924,8		3304,4		1798,4	
Tratamiento	M 7		M 8		M 9		M 10		M 11			
UI g ⁻¹ p. f.												
T/PS	3591,5	ab	1822,0	bc	8173,5	a	2385,23	b	6147,9	a		
Fos/PS	5283,5	a	4212,3	a	4882,3	ab	8182,4	a	5125,7	a		
Flu/PS	2891,6	b	2068,0	b	3443,8	bc	2315,9	b	3187,4	b		
T/PI	2226,7	bc	0	d	0	c	0	d	0	c		
Fos/PI	848,6	c	908,7	cd	1926,8	bc	894,3	c	2135,5	b		
Flu/PI	1837,0	bc	1134,5	bcd	1021,3	bc	1094,0	c	3077,9	b		
DMSH	1868,0		1135,0		3999,9		764,2		1697,5			

^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.

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

Tratamiento	M 1		M 2		M 3		M 4		M 5		M 6	
	UI g ⁻¹ p. f.											
T/PS	504,92	a ^z	123,85	a	146,01	a	83,46	b	82,01	a	33,69	B
Fos/PS	112,93	a	299,44	a	103,10	a	78,56	bc	54,73	a	123,7	A
Flu/PS	229,34	a	292,08	a	94,44	a	96,39	b	89,80	a	31,13	B
T/PI	263,86	a	184,74	a	191,30	a	157,49	a	12,56	a	119,61	A
Fos/PI	320,22	a	207,56	a	91,41	a	71,68	bc	62,19	a	73,99	ab
Flu/PI	117,30	a	152,91	a	192,98	a	23,47	c	64,06	a	107,00	A
DMSH	531,47		349,94		207,41		57,37		77,48		68,67	
Tratamiento	M7		M8		M9		M10		M11			
	UI g ⁻¹ p. f.											
T/PS	46,05	a	22,51	cd	36,53	abc	25,05	cd	41,67	ab		
Fos/PS	60,41	a	75,44	a	97,65	a	134,35	a	80,56	a		
Flu/PS	47,74	a	29,43	c	44,57	abc	44,45	bc	40,87	ab		
T/PI	15,00	a	0	e	0	c	0	d	0	b		
Fos/PI	33,61	a	18,28	d	91,62	ab	43,09	bc	77,51	a		
Flu/PI	76,36	a	51,41	b	20,11	bc	70,16	b	68,73	a		
DMSH	71,37		10,88		73,48		27,21		48,39			

^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.