

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Extractos Naturales como Inductores de Resistencia Sistémica en Plantas de  
Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Bajo Estrés Biótico

Por:

**JOSÉ JESÚS HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de

**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Saltillo, Coahuila, México.

Marzo del 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Extractos Naturales como Inductores de Resistencia Sistémica en Plantas de  
Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Bajo Estrés Biótico

Por:

**JOSÉ JESÚS HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**


TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el título de


**INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Adalberto Benavides Mendoza  
Asesor Principal

  
Dra. Susana González Morales  
Coasesor

  
Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente  
Coasesor

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Marzo del 2018



Coordinación  
División de Agronomía

# DEDICATORIA

## ***A mis padres***

*A mi padre J. Samuel Hernández López y a mi madre Ma. de Jesús Hernández Rodríguez por haberme apoyado en todo momento, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. Por su apoyo económico que ha sido fundamental para llegar hasta donde me encuentro, y por darme la oportunidad de demostrarles que se pueden hacer las cosas.*

## ***A mis hermanos***

*A mis hermanos Martín, Ramón, Alfonso, Juan Pablo, Samuel y Emilio y a mis hermanas Mayra, Cecilia, Mariela, Ana María y Luz, por su apoyo incondicional en todo momento, motivación para seguir adelante y hacer siempre realidad los sueños. Por los buenos momentos que hemos pasado y que me han servido como experiencias a considerar, por su presencia que me ha motivado para llegar hasta esta meta. Por su apoyo económico que gracias a eso fue posible llegar a este momento.*

# **AGRADECIMIENTOS**

## ***A Dios.***

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

## ***A mi “ALMA TERRA MATER”.***

*Por brindarme conocimientos, no solo académicos, si no el transmitido en cada uno de los momentos que pude experimentar a través de ella, por brindarme el brillo de la juventud y los mejores años del inicio en mí desarrollo profesional.*

## ***A mis amigos***

*A mis amigos y compañeros de escuela, a los ing. Juan Ramón, Gamaliel Reboseño, Eduardo de la Fuente, Isaías Alcalá, Juan Carlos Acosta, Héctor Hernández, Bryan Ortiz y a los Lic. Cesar Ledezma, Juan Carlos Ramírez, Francisco Ramírez, al chino que olvide su nombre y a todos los demás faltantes que no menciono en este momento, por su infinita amistad que ha sido una fuerza para seguir hacia adelante ante todos los obstáculos, por su compañerismo en momentos de necesidad, por sus consejos de lucha hacia la meta. A Mary Cruz que fue de gran apoyo en este etapa de mi vida y que siempre le agradeceré por sus buenos consejos y regaños también, por su motivación y su apoyo incondicional, me llevo esa parte de ti.*

**A mis maestros.**

*Por su importante participación en mi formación como profesional y que a pesar de que no fui el mejor alumno, siempre estuvieron en disposición para cualquier aclaración de dudas e inquietudes y que hicieron lo mejor que saber hacer, enseñar y ser un modelo a seguir para todos.*

**A mis asesores.**

*A la Dra. Ema Laura García Enciso, por darme la oportunidad de aprender de sus experiencias laborales, como de la vida real, por el tiempo dedicado a mí para la aclaración de dudas, por su paciencia en momentos de estrés y por el apoyo en esta tesis, que fue de gran importancia para el desarrollo y resultado de esta investigación.*

*A la Dra. Susana González Morales, Dr. Adalberto Benavides Mendoza, Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente por su tiempo invertido en la revisión de esta tesis, por el apoyo brindado y por la asesoría brindada que contribuyó a para la mejora del trabajo realizado.*

*Al Dr. Willian, por su ayuda incondicional en los software estadístico que fue de gran utilidad para el desarrollo de este trabajo.*

# INDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
Objetivo general .....	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis.....	4
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
Origen del tomate .....	5
Clasificación taxonómica .....	5
Panorama de la producción de tomate .....	6
Importancia económica.....	6
Sistemas de producción de tomate .....	7
Enfermedades del tomate.....	8
Marchitez vascular del tomate .....	9
Síntomas de la enfermedad.....	10
Defensa en las plantas .....	10
Defensa constitutiva .....	11
Defensa inducida.....	12
Actividad enzimática.....	15
Inductores de resistencia .....	17
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
Localización del sitio experimental .....	20
Material vegetal .....	20

Siembra .....	20
Trasplante.....	21
Tratamientos.....	21
Inoculación de FOL.....	22
Toma de muestras.....	23
Extracción de enzimas.....	23
Actividad de la fenilalanina amonio liasa .....	24
Actividad $\beta$ -1, 3 glucanasa .....	24
Actividad peroxidasa .....	24
Actividad quitinasa .....	25
Evaluación de la enfermedad .....	25
Incidencia .....	25
Severidad .....	26
Evaluación de variables agronómicas .....	27
Diseño experimental.....	27
Análisis .....	27
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
Incidencia y severidad .....	28
Biomasa seca de raíz .....	29
Biomasa seca de tallo.....	30
Biomasa seca de hoja .....	30
Biomasa seca de fruto .....	30
Variables bioquímicas.....	32
Actividad fenilalanina amonio liasa.....	33
Actividad $\beta$ -1,3 glucanasa.....	36
Actividad peroxidasa.....	38

Actividad quitinasa.....	41
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>45</b>



# INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica del tomate. ....	5
<b>Cuadro 2.</b> Descripción de tratamientos . ....	21
<b>Cuadro 3.</b> Escala de severidad reportada por Diener y Ausubel, 2005.....	26
<b>Cuadro 4.</b> Valor de P obtenido del análisis de varianza para variables bioquímicas.....	32
<b>Cuadro 5.</b> Prueba de comparación de medias para la actividad enzimática de PAL en plantas de tomate inoculadas con FOL. ....	35
<b>Cuadro 6.</b> Prueba de comparación de medias para la actividad enzimática de $\beta$ -1,3 glucanasa en plantas de tomate inoculadas con FOL.....	37
<b>Cuadro 7.</b> Prueba de comparación de medias para la actividad enzimática de peroxidasa en plantas de tomate inoculadas con FOL. ....	40
<b>Cuadro 8.</b> Prueba de comparación de medias para la actividad enzimática de quitinasa en plantas de tomate inoculadas con FOL.....	43

# INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Incidencia y severidad de plantas de tomate sometidas a estrés biótico y tratadas con elicitores a los 80 ddt. ....	29
<b>Figura 2.</b> Biomasa seca de raíz, tallo, hoja y fruto de plantas de tomate asperjadas con elicitores e inoculadas con FOL.....	31
<b>Figura 3.</b> Actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa en plantas de tomates asperjadas con elicitores e inoculadas con FOL. ....	35
<b>Figura 4.</b> Actividad enzimática de $\beta$ -1,3 glucanasa en plantas de tomates asperjadas con elicitores e inoculadas con FOL.....	37
<b>Figura 5.</b> Actividad enzimática de peroxidasa en plantas de tomates asperjadas con elicitores e inoculadas con FOL .....	40
<b>Figura 6.</b> Actividad enzimática de quitinasa en plantas de tomates asperjadas con elicitores e inoculadas con FOL. ....	42

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la calidad elicitora o la capacidad inductora de resistencia sistémica de dos formulaciones a base de extractos naturales por aplicación vía foliar en plantas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) en condiciones de invernadero. Una de las formulaciones se obtuvo a partir de extractos de algas (E1) y se asperjó a una dosis de 3.75 mL L<sup>-1</sup>. La otra formulación se obtuvo a partir de extractos de plantas (E2) y se asperjó a una dosis de 1.5 mL L<sup>-1</sup>. El experimento se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar con 4 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento. Se evaluó la incidencia y la severidad de la enfermedad, así como la biomasa seca de raíz, tallo, hoja y fruto, además de la evaluación de la actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL),  $\beta$ -1,3 glucanasa, peroxidasa y quitinasa. Los resultados demuestran que la aplicación de los extractos disminuyó la severidad de la enfermedad en un 28% para E1 y 18% para E2 en comparación con el tratamiento con FOL. En cuanto a la biomasa seca el tratamiento E2 permitió la acumulación de biomasa similar al tratamiento testigo sin inocular. Mientras que este efecto se observó solo para la biomasa de tallo y hoja en el tratamiento E1. En cuanto las enzimas analizadas relacionadas con la resistencia, los resultados indicaron que para E1 y E2 la mayor actividad enzimática se presentó en los últimos muestreos, donde la actividad enzimática fue mayor que la obtenida en el testigo absoluto, obteniendo incrementos en PAL del 44% para E1; en actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa E1 y E2 también tuvieron un incremento del 75% y 106% respectivamente. También se observó un incremento en la actividad peroxidasa en E1 y E2, superando en un 68% y 78% respectivamente al testigo absoluto. Por lo que el uso de estos extractos se propone como una alternativa para el manejo de la enfermedad causada por *F. oxysporum*.

**Palabras clave:** inducción de resistencia, actividad enzimática, elicitores.

# I. INTRODUCCIÓN

Actualmente el jitomate, mejor conocido como tomate rojo (*Solanum lycopersicum*) se considera el segundo cultivo hortícola más importante en el mundo después de la papa. (CNCyUB, 2015). Su importancia radica tanto económicamente como nutricional, ya que es fuente de vitaminas, minerales y antioxidantes, los cuales son fundamentales para la nutrición y la salud humana (SNICS, 2015).

El tomate se ha destacado en los años recientes por la incorporación constante de tecnologías para su producción (Rabie y Humiany, 2004). Una de las tecnologías de producción integrada a esta esta hortaliza es el uso de productos químicos para el control de enfermedades, debido a que los rendimientos en gran parte son afectados por la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo (Jiménez y Sanabria, 2008).

Una de la enfermedades radiculares que afectan drásticamente la producción del cultivo de tomate a nivel mundial y nacional es el marchitamiento vascular ocasionado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), el cual tiene mayor incidencia en regiones de clima cálido, ocasionando grandes pérdidas económicas (Carrillo *et al.*, 2003). La magnitud de los daños ocasionados por esta enfermedad es muy variada, mientras que en algunos campos es apenas perceptible, en otros es muy severa, ocasionando reducciones de la producción superiores al 60% (García, 2001).

En los años 50 y 60 la introducción de fertilizantes y plaguicidas sintéticos como parte de la revolución verde fue exitosa y esperanzadora en esa época, ya que lograba controlar las plagas y enfermedades que afectaban los cultivos. Sin embargo, el uso excesivo de estos insumos provocó resistencia por parte de las plagas y microorganismos causantes de enfermedades, poniendo así en juicio el uso de estos programas, además provocaron serios problemas en la salud humana y animal, causando daños irreparables en el suelo y el ambiente. Esto

ha llevado a revisar detenidamente las prácticas agrícolas y a buscar una agricultura menos contaminante, como la producción orgánica, ecológica y sostenible (Riveros, 2001).

Recientemente, en diferentes partes del mundo, se han incrementado los estudios acerca del empleo de extractos naturales como sustitutos de herbicidas y plaguicidas, debido a los beneficios que estos nos ofrecen, especialmente en la protección de cultivos. Entre estos productos naturales se encuentran los inductores de resistencia, que son compuestos que son capaces de estimular los mecanismos de defensa en las plantas ante el ataque de fitopatógenos (Rodríguez *et al.*, 2006).

La explotación de los mecanismos de inducción de defensa natural se presenta como una alternativa, no convencional y ecológicamente amigable, para la protección de las plantas, contribuyendo a la reducción de la aplicación del control químico y al desarrollo de una agricultura sostenible (González *et al.*, 2013). Estos mecanismos están relacionados con numerosas respuestas de defensa activadas por el hospedero después del contacto con el patógeno o con algún inductor biótico o abiótico (Valueva y Mosolov, 2004).

De ahí, en el presente trabajo se utilizaron dos productos prototipo a base de extractos de algas y extractos de plantas como inductores de resistencia que fueron aplicados sobre plántulas de tomate inoculadas con FOL en condiciones de invernadero para observar los cambios en la actividad enzimática relacionada a la defensa sistémica de la planta ante el ataque de este patógeno, así como evaluar el efecto en relación a las variables relacionadas al vigor de la planta, rendimiento, la incidencia y la severidad de la enfermedad.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el desarrollo de la enfermedad causada por FOL en plantas de tomate en las diferentes etapas fenológicas del cultivo asperjadas con extractos de algas y extractos de plantas como inductores de resistencia.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Evaluar la incidencia y el grado de severidad de la enfermedad en plantas de tomate inoculadas con FOL con la aspersión de extractos de algas y extractos de plantas.
- b) Evaluar las variables agronómicas relacionadas con vigor y el rendimiento en plantas de tomate inoculadas con FOL con la aspersión de extractos de algas y extractos de plantas.
- c) Evaluar los cambios en la activación de enzimas relacionadas con la inducción de resistencia sistémica en plantas de tomate inoculadas con FOL con la aspersión de extractos de algas y extractos de plantas.

## **HIPÓTESIS**

La aspersión de extractos de algas y extractos de plantas como inductores de resistencia sistémica sobre plantas de tomate inoculadas con FOL tendrá un efecto positivo en el control de la enfermedad, notándose al menos en un tratamiento un incremento de la activación de enzimas relacionadas a la defensa de las plantas, vigor y disminución en el grado de severidad e incidencia de la enfermedad.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### Origen del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la familia de las Solanáceas, el nombre del tomate proviene del tomatl, en la lengua náhuatl de México (Jones, 2007). Es una planta nativa de América tropical, cuyo origen se localiza en la región de los andes (Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú y México), e introducido a Europa en el siglo XVI; al principio, fue cultivado como planta de ornato. A partir de 1900, se extendió el cultivo como alimento humano y actualmente ocupa un lugar importante entre las hortalizas en el mundo. Además, es una importante materia prima para la industria de transformación (FAO, 2002).

### Clasificación taxonómica

Recientemente se ha modificado un cambio en la nomenclatura del género *Lycopersicon esculentum* Mill, quedando como *Solanum lycopersicum* L (Peralta ,2005). La clasificación taxonómica ha quedado de la siguiente manera:

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica del tomate.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Genero	<i>Solanum</i>
Especie	<i>lycopersicum</i>

## **Panorama de la producción de tomate**

La producción de tomate rojo en México tuvo un crecimiento en la producción cercano a las 200 mil Ton entre 2015 y 2016, lo que significa que aumento en una tasa promedio anual de 7.8 %, al pasar de una producción de 2, 570,000 Ton a 2, 769,000 Ton (SAGARPA, 2017).

Por una parte, el cultivo a campo abierto redujo la superficie sembrada a una tasa promedio anual de 5.6 % entre 2006 y 2016, al pasar de 65,431 a 36,855 Ha. Por el contrario, en el mismo periodo de tiempo, la superficie establecida con agricultura protegida (malla sombra e invernadero) pasó de 1,078 a 15,006 Ha, es decir, creció a una tasa promedio anual de 30.1 % (FIRA, 2017).

De ahí que, el volumen de tomate rojo obtenido con el uso de estas últimas tecnologías pasó del 6.5 % del total en 2006 a 32.2 % en 2010, y hasta 60.7 % del volumen total en 2016 (FIRA, 2017).

## **Importancia económica**

En 2016 se reportó en México una exportación de alrededor de 2.4 millones de toneladas de jitomate, siendo la hortaliza de mayor exportación en este país, además registro un valor de 20 mil millones de pesos para este mismo año. México participa con un 21% de las aportaciones de jitomate al mercado internacional, destinando más de 51 mil hectáreas para este cultivo y se estima que la producción alcanza los 2.8 millones de toneladas según las Estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SAGARPA, 2016).

Esta hortaliza mantiene su importancia y dinamismo en el comercio exterior agropecuario del país. En 2016 fue el principal producto agropecuario de exportación, con una participación de 13.2 % en el total de las ventas al exterior de productos agropecuarios y pesqueros (FIRA, 2017).



La producción nacional de tomate en mayor medida se aportó por la producción de los estados de Sinaloa, Michoacán, Zacatecas, San Luis Potosí, Baja California Sur y Jalisco (SAGARPA, 2016).

### **Sistemas de producción de tomate**

En México el cultivo de tomate se encuentra ampliamente distribuido en diferentes zonas y con bajo diferentes sistemas de producción, esto se debe principalmente a la variedad de climas que se posee en el país, encontrando el cultivo con sistemas de producción a cielo abierto, sistemas semi-tecnificados y altamente tecnificados, empleando en estos últimos tecnología de lo más avanzado, como lo es con sistemas automatizados de riego, nutrición y control fitosanitario, aunque estos representan altos costos de producción se compensa dicha inversión con los altos rendimientos que llegan a alcanzar (FIRA, 2016).

Independientemente del sistema de producción empleado, este cultivo requiere de ciertas condiciones para su desarrollo y producción, las cuales pueden ser afectadas por factores bióticos y abióticos, como la temperatura, suministro de agua, suministro de nutrientes, energía solar e incidencia de plagas y enfermedades. Estas últimas son de gran importancia económica debido a que ante la presencia de enfermedades en el cultivo se ve afectada la producción y aumentan los gastos de inversión (Beltran, 2014).

## Enfermedades del tomate

En los últimos ciclos, la rentabilidad del cultivo de tomate ha sido seriamente amenazada por diversos factores entre ellos los problemas fitosanitarios, que reducen los rendimientos y por ende la economía de los agricultores. Entre los problemas fitosanitarios podemos describir los daños ocasionados por las plagas y enfermedades. Estas últimas ocasionadas por diversos fitopatógenos como bacterias, hongos, virus y fitoplasmas (Cesaveg, 2007).

Entre las enfermedades más comunes causadas por bacterias se encuentra el cáncer bacteriano causada por *Clavibacter michiganensis*, las manchas bacterianas causadas por los géneros *Pseudomonas* spp y *Xanthomonas* spp. Entre las enfermedades causadas por virus que afectan al cultivo mediante insectos vectores se encuentran Geminivirus (mosca blanca), Potyvirus (pulgones), y Tospovirus (trips). La enfermedad más común causada por fitoplasma es la permanente del tomate y es transmitida por el adulto de *Bactericera cockerelli* (Intagri S.C, 2009).

En cuanto a las enfermedades causadas por hongos se encuentra el Damping off causada por los hongos del género *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp, *Fusarium* spp., el Moho gris causado por *Botrytis cinérea*, tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, tizón temprano causado por *Alternaria solani*, cenicilla polvorienta causada por *Leveillula taurica* y marchitez vascular del tomate causado por *Fusarium oxysporum*, siendo esta una de las enfermedades que sobresale por las grandes pérdidas que ocasiona (Cesaveg, 2007). La más importante en la actualidad por su impacto y distribución es el marchitamiento vascular o fusariosis (*Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici*) Snyder and Hansen (FOL) (Ramírez, 1998).

## **Marchitez vascular del tomate**

El marchitamiento vascular del tomate causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* fue primeramente descrito por Masse en 1885 en las Islas de Wight y Guersney (Carrillo *et al.*, 2003). La marchitez vascular es la principal enfermedad que causa problemas en el cultivo, disminuye en un 60% el rendimiento y afecta la calidad del producto (Ascencio *et al.*, 2008). Esta enfermedad tiene mayor incidencia en regiones de clima cálido, ocasionando grandes pérdidas económicas (Cai *et al.*, 2003).

Hasta la fecha se han reportado tres razas fisiológicas de FOL, las cuales se distinguen por su virulencia en variedades diferenciales de tomate que contienen diferentes genes de resistencia (Cai *et al.*, 2003). La generación de cultivares resistentes constituye el avance más importante en el control de esta enfermedad y son hasta el momento la mejor estrategia de control, ya que estos patógenos permanecen en el suelo por décadas (Reis *et al.*, 2004).

De acuerdo con Ma *et al.*, (2013) el hongo puede sobrevivir en el suelo o en residuos de cosecha constituido por hifas, esporas o clamidosporas aun cuando no esté presente su hospedero y que germinan cuando son activadas por los exudados producidos en las raíces fibrosas del tomate, de manera que, si el hospedero se encuentra cerca, inicia el proceso de infección en las raíces.

La infección se logra empezando con la adhesión del hongo a la superficie, seguido de que los tubos germinativos del hongo penetren la epidermis de las raíces gracias a la descomposición enzimática de barreras físicas por parte del hongo, luego de la liberación de compuestos antifúngicos por parte de la planta, los cuales terminan inactivos y finalmente la muerte de las células huésped por micotoxinas segregadas por el hongo (Agrios, 2005).

Una vez dentro del hospedante se mueven por colonización de los vasos del xilema produciendo la oclusión del sistema vascular de la planta. Su disseminación en el campo se produce a través de material de propagación infectado, fragmentos de plantas enfermas y movimientos de suelo infestado con

clamidosporas de *F. oxysporum*, las cuales pueden sobrevivir en este por más de 10 años (Haglund y Kraft, 2001). La penetración del hongo a la planta se facilita cuando en la raíz hay presencia de nematodos, heridas y estrés así como altas temperaturas superiores a 28°C y alta humedad (Cesaveg, 2007).

La velocidad de la infección depende de factores como el tiempo de la infección inicial, la virulencia y condiciones climáticas. Dependiendo de la tasa de velocidad de infección, el hongo puede ocasionar pudrición radicular y muerte, incluso en plantas muy jóvenes (Agrios, 2002).

### **Síntomas de la enfermedad**

Los síntomas inician con un amarillamiento en las hojas más viejas, extendiéndose a toda la planta y ocasionando una clorosis que a veces se presenta en las hojas de un solo lado de la planta, después se marchitan y mueren, aunque pueden permanecer adheridas al tallo (Cárdenas, 2000). En un corte transversal del tallo se puede observar necrosis de color café rojizo en forma de anillo, la cual se extiende hacia la parte apical de la planta de acuerdo con la severidad. Las plantas muestran un achaparramiento, defoliación, marchitez de las hojas y tallo jóvenes, necrosis marginal de las hojas y finalmente la planta muere (Cesaveg, 2007).

### **Defensa en las plantas**

Normalmente las plantas se mantienen en continuo contacto con diversos organismos, y bajo condiciones naturales ellas interactúan con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos (Madriz, 2002). El ataque de los 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 se defienden de los patógenos ejerciendo mecanismos físicos y químicos que han adquirido durante el proceso evolutivo y

que reducen la posibilidad de infección o previenen el acceso de patógenos al hospedante. Estos mecanismos son considerados como la defensa. En general, existen diversos mecanismos involucrados en la defensa de las plantas a fitopatógenos; sin embargo, la importancia de estos mecanismos depende de la resistencia que exhiben las especies vegetales, la cual es atribuida a uno o varios mecanismos (Cruz *et al.*, 2006). En las especies susceptibles tales mecanismos pueden no presentarse ocasionando de esta forma un desarrollo apreciable del patógeno en el hospedante (Altieri y Muñoz, 2000). Las plantas no susceptibles pueden presentar una defensa pasiva o preformada (preexistente), si está determinada por propiedades ya existentes antes del intento de infección del patógeno; también denominados factores constitutivos, o una defensa activa o inducida, dinámica, si resulta de estructuras o sustancias producidas como respuesta a la penetración del patógeno (Durrant y Dong, 2004).

### **Defensa constitutiva**

Las plantas pueden poseer mecanismos constitutivos de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa físicos o estructurales constitutivos y mecanismos de defensa bioquímicos constitutivos (Madriz, 2002). Dentro de los mecanismos estructurales constitutivos se encuentran las barreras físicas (presencia de pelos glandulares, cera cuticular, grosor de la cutícula, grosor y composición de la pared celular, procesos de lignificación, suberización, formación de calosas formadas antes de la presencia de algún patógeno, forma, tamaño y comportamiento de los estomas y lenticelas y tejido interno de la planta) pueden estar presentes en determinadas etapas o en todo el ciclo biológico de la planta, o bien formarse en respuesta al inicio del proceso infeccioso (Montes, 2009). Una capa cerosa en la cutícula de las hojas de algunas especies de plantas impide la formación de películas de agua en la superficie foliar después de las lluvias, lo que desfavorece la germinación de las esporas de hongos fitopatógenos (Agris, 2005).

Los mecanismos de defensa químicos constitutivos son de diversa índole y poseen una elevada actividad biológica tóxica o inhibidora, algunos se presentan previos al reconocimiento del patógeno, como fenoles, lignina, taninos, saponinas, antocianinas, flavonoides, glucocinolatos, lecitinas, glucanasas y quitinasas, entre otros (Kliebeinstein, 2004). Estos son liberados de la célula vegetal durante los procesos de invasión por el patógeno y que ocurre por diferentes vías: Inhibidores exudados por la planta, exudados radiculares, inhibidores presentes en las células, o bien por deficiencia en nutrientes esenciales para el parásito y ausencia de antígenos comunes (Cruz *et al.*, 2006). Algunos de estos compuestos ya están presentes en concentraciones suficientes para inhibir el desarrollo de los hongos como el ácido protocatéquico y catecol que se hallan en cebollas moradas resistentes a *Antracnosis* (Montes, 2009).

### **Defensa inducida**

Los mecanismos inducidos de defensa se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Villa-Martínez *et al.*, 2014). Las plantas emplean una gran cantidad de señales, originadas por los patógenos o por el medio circundante que les permiten reconocer al agresor y activar sus mecanismos de defensa, por lo que se producen cambios físicos o estructurales y bioquímicos en respuesta al estrés ocasionado por el agresor (Durrant y Dong, 2004).

### **Cambios físicos o estructurales de defensa inducida**

Dentro de los cambios estructurales se encuentran los cambios en las estructuras histológicas de defensa, cambios en las estructuras citológicas de defensa, cambios en las estructuras de defensa citoplasmáticas y la reacción necrótica o reacción de hipersensibilidad (Cruz *et al.*, 2006).

**Formación de capas de corcho.** La infección que ocasionan los hongos, bacterias e incluso algunos virus y nematodos en las plantas con frecuencia induce la formación de varias capas de células de corcho más allá de la zona donde se ha producido la infección, aparentemente como resultado de la estimulación que ejercen las sustancias que secreta el patógeno sobre las células del hospedante. Las capas de corcho no solo inhiben el avance que pueda intentar el patógeno sobre las otras células, sino también bloquean la difusión de cualquier sustancia que el patógeno pueda secretar. Además, estas capas detienen el flujo de agua y nutrientes desde las zonas sanas hasta la zona infectada y suprimen la nutrición del patógeno (Zamora *et al.*, 2008).

**Formación de capas de abscisión.** Las capas de abscisión se forman sobre las hojas jóvenes y funcionales después de haber sido infectadas por cualquiera de los distintos hongos, bacterias o virus. La capa de abscisión consta de una abertura que se forma entre dos capas circulares de células foliares en torno al foco de infección. Después de que ésta se ha producido, la lámina media localizada entre esas dos capas de células se disuelve a lo largo del grosor de la hoja, separando por completo la zona central del resto de la hoja. Gradualmente, esta zona se seca, muere y desprende, llevándose consigo al patógeno. De esta forma, la planta, al deshacerse de esa zona infectada junto con unas cuantas células todavía sanas, impide que el resto de los tejidos de la hoja sean invadidos por el patógeno o que sean afectados por sus secreciones tóxicas (Zamora *et al.*, 2008).

**Formación de tílides.** Las tílides se forman en los vasos xilemáticos de la mayoría de las plantas que se encuentran bajo condiciones ambientales adversas y durante la invasión que llevan a cabo la mayoría de los patógenos vasculares. Las tílides son crecimientos excesivos del protoplasto de las células parenquimatosas adyacentes, las cuales se proyectan hacia los vasos xilemáticos a través de puntuaciones. Las tílides presentan paredes celulósicas y pueden, debido a su tamaño y abundancia, obstruir completamente a los vasos. En algunas variedades de planta, las tílides se forman rápida y abundantemente

frente al patógeno (en tanto éste se encuentre en las raíces jóvenes), bloqueando su avance y por lo tanto, permitiendo que las plantas permanezcan libres y sean resistentes a ese patógeno (Zamora *et al.*, 2008).

**Depósito de sustancias gomosas.** Varios tipos de gomas son formadas por muchas plantas, en algunos casos se depositan en los espacios intercelulares y en otros dentro de las células alrededor de las lesiones, después de la infección, formando así una barrera impenetrable para el parásito. En ausencia de tilosas estas gomas pueden presentarse en el tejido vascular actuando como barreras mecánicas al patógeno, sin embargo, se pueden localizar en infecciones localizadas, limitando la lesión. Estas sustancias contienen compuestos fungitóxicos como polifenoles. Otras veces se acumulan alrededor de las manchas y de ese modo merman su crecimiento (Cruz *et al.*, 2006).

**Cambios morfológicos de pared celular.** Cuando las células son invadidas por el patógeno se han observado dos tipos de estas estructuras en el caso de enfermedades fungosas: 1) Hinchamiento de la pared de las células epidérmicas y subepidérmicas; 2) Formación de una funda que envolverá a la hifa en penetración, la funda está formada por la pared celular (Cruz *et al.*, 2006).

**Estructuras de defensa citoplasmáticas.** Cuando el parásito logre penetrar, el contenido citoplasmático de la célula puede actuar como línea de defensa. Después de la penetración el citoplasma se vuelve denso y granular y aparecen algunas estructuras; en este caso el micelio de invasión del hongo se separa en cuerpos granulares pequeños y de esa forma el avance del hongo se detiene. (Altieri y Muñoz, 2000).

**Reacción de hipersensibilidad.** Es el mecanismo que provoca una muerte rápida de las células contaminadas, porque al penetrar el patógeno la pared celular, una vez establecido el contacto con el protoplasma, el núcleo se mueve hacia el sitio de penetración del patógeno y se desintegra formando gránulos en el citoplasma; el que se torna café y muere; provocando la muerte de la hifa (Cruz *et al.*, 2006).



### **Mecanismos bioquímicos de defensa inducida.**

En las plantas se pueden presentar sustancias sintetizadas posteriores a la infección. Entre las sustancias producidas en la planta hospedera como resultado de la infección, podemos considerar a los inhibidores bioquímicos producidos en respuesta al daño (compuestos fenólicos, fitoalexinas), a los fenoles fungotóxicos liberados de complejos fenólicos no tóxicos y la inducción de síntesis de proteínas y enzimas relacionadas a la patogenicidad (Cruz *et al.*, 2006).

### **Actividad enzimática.**

Dentro de los mecanismos bioquímicos se incluye el incremento en la activación de enzimas relacionadas a la defensa o la expresión de proteínas relacionadas con la patogenicidad tales como fenilalanina amonio liasa (PAL),  $\beta$ , 1-3 gluacanasa, peroxidasa y quitinasa, las cuales también pueden ser expresadas de forma constitutiva como inducida en respuesta a la infección (Pérez, *et al.*, 2004).

### **Fenilalanina amonio liasa (PAL)**

La PAL pertenece a la clase de las liasas y cataliza la primera reacción de la biosíntesis de los fenilpropanoides en plantas superiores (Liater *et al.*, 1996). Entre estos compuestos se encuentran la lignina, suberina, fitoalexinas, flavonoides y compuestos fenólicos en general, cuya síntesis y acumulación parte de la estrategia desarrollada por las plantas para evitar la invasión de patógenos, es así que, la PAL es la clave para la síntesis de metabolitos de defensa importantes, donde se encuentran las fitoalexinas (antibióticos vegetales) que constituyen compuestos altamente tóxicos para los patógenos (Inui *et al.*, 1997).

## **Glucanasa**

Estudios realizados en *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, y *Capsicum annuum*, han mostrado que ante el ataque de *Perenospora tabacina*, *Phytophthora infestans* y *Phytophthora capsici*, respectivamente, ocurre un aumento en la actividad de las  $\beta$ , 1-3 glucanasas y quitinasas. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas desempeñan su función de protección a través de dos mecanismos: a) Por medio de la hidrólisis del enlace  $\beta$  - 1,3/1,6-glucano presente en las paredes celulares de los patógenos. Este hecho hace al patógeno más susceptible a la lisis y posiblemente a otras respuestas de defensa de la planta; y b) se sugiere que las  $\beta$ -1,3-glucanasas desempeñan un papel defensivo indirecto a través del cual los oligosacáridos de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano, que se desprenden de las paredes del patógeno inducen una amplia gama de respuestas de defensa de la planta (Rose *et al.*, 2002).

Pérez *et al.*, 2004, en su estudio en relación a la inducción de mecanismos bioquímicos de defensa en la interacción micorriza-planta con cuatro especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares observó que la acción de las  $\beta$ -1,3-glucanasas sobre las paredes fúngicas provee un mejor acceso para las quitinasas a sus sustratos y viceversa. También sugirió otras funciones para las  $\beta$ -1,3-glucanasas y otras enzimas hidrolíticas, tanto en la morfogénesis y el desarrollo de la planta, como en el intercambio de señales en las interacciones planta- patógeno, actuando de forma sinérgica con las quitinasas.

## **Peroxidasa**

La enzima peroxidasa desempeña un papel determinante en diversos procesos fisiológicos necesarios para el funcionamiento de las plantas, incluida la lignificación (Esteban *et al.*, 2001). La participación de esta enzima en los mecanismos de defensa ha sido ampliamente documentada para diversas especies (Ray *et al.*, 1998). La actividad peroxidasa es importante en resistencia a la penetración de patógenos en plantas por estar involucrada en el depósito de

extensina en la pared celular, mediar en el entrecruzamiento de ésta en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Brownleader *et al.*, 1995) y participar en la polimerización oxidativa de alcohol hidroxicinámico para formar lignina (Conn *et al.*, 1981), procesos que conducen a dar rigidez a la pared celular y colocar barreras a la infección del patógeno (Vera *et al.*, 1994).

### **Quitinasa**

Las quitinasas son enzimas hidrolíticas capaces de romper los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos entre los residuos N-acetil glucosamina de la quitina. Este polisacárido es un componente de la estructura de la pared de todos los hongos verdaderos, incluyendo Micorrizas arbusculares y ectomicorrizas así como de muchos patógenos, lo que indica que las quitinasas son importantes en las interacciones planta-hongo (Pérez *et al.*, 2004). En el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum*) se aplicó un hidrolizado de quitosana a la raíz y después se inoculó con *Phytophthora parasitica*. Posteriormente se observó una estimulación en las enzimas PAL,  $\beta$ -1,3 glucanasa y quitinasa y una disminución de los síntomas de la enfermedad (Falcón *et al* 2002).

### **Inductores de resistencia**

En la actualidad existen varios agentes químicos y naturales capaces de inducir distintos mecanismos de defensa ante agentes bióticos y abióticos (Raddatz, 2001). Estas sustancias son identificadas por las plantas (Schreiber y Desveaux, 2008), e inducen respuestas ante distintos factores ambientales y biológicos, permitiéndoles anticiparse y protegerse local y sistémicamente (Schreiber y Desveaux, 2008). Esta inducción autoprotectora se da al aplicarse estas sustancias de manera exógena (Cavalcanti, *et al.*, 2005), y se consideran una alternativa biológica y ambiental ante el uso de productos químicos (Riveros *et al.*, 2004).

Numerosos estudios fitoquímicos realizados sobre sustancias consideradas extractos de plantas, han reportado una gran diversidad de estructuras químicas de diversa naturaleza con capacidad estimulante o elicitora (García y Pérez, 2003). Algunas de las especies de las cuales se han obtenido extractos, donde sus moléculas estimulan distintos niveles de inducción ante daños microbianos, figuran *Reynoutria sachalinensis*, *Cymbopogon citratus* y *Heliopsis longipes*.

En el patosistema pepino-*Podosphaera xanthii*, causante del mildíu polvoriento, al ser tratado con un inductor exógeno, proveniente de las hojas de milsana (*Reynoutria sachalinensis*), se observó rápidamente la síntesis de una fitoalexina, C-glycosdsil conocida como cucumarina, la cual se acumula en el sitio de penetración del hongo, jugando un papel importante en el bloqueo, colonización y supervivencia del patógeno. Se reportó que la lignificación de la pared celular y el aumento en actividad de las enzimas quitinasas, peroxidasas y  $\beta$ -1, 3 glucanasas (Fofana *et al.*, 2005).

La aplicación del té de limón (*Cymbopogon. Citratus*) sobre plantas de tomate desarrolla efectos fungitóxicos tanto local como sistémica frente a *Alternaria solani* al modificarse los contenidos de la enzima peroxidasa, la polifenoloxidasas y la  $\beta$ -1,3 glucanasa (Terumi *et al.*, 2013).

Gonzalez *et al.*, en 2015, evaluaron el efecto de la aplicación del extracto de *Heliopsis longipes* (nombre común Chilcuague), sobre plántulas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), reportando que la aplicación del extracto a una concentración de 300 mgL<sup>-1</sup> provocó una disminución en las variables de incidencia y severidad de 15% y 80% respectivamente. Además de incrementar las expresiones enzimáticas PAL, peroxidasa, quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa, y modificar ciertas estructuras en los tejidos de tallo y raíz en plantas de tomate (González, 2011).

Los inductores de resistencia han sido utilizados ampliamente sobre muchos cultivos como cucúrbitas, arroz, algodón, banano, papa y tomate, entre otros, permitiendo obtener beneficios que van desde mejoras de calidad en la

producción hasta la formación de resistencia ante los factores dañinos del ambiente, plagas y enfermedades (Granados, 2015)

.La técnica de aplicación depende de la naturaleza del inductor, pudiendo ser asperjados, aplicados en el riego e incluso en el tratamiento de semillas, desencadenando sus efectos en el momento de la aplicación hasta 30 días después aproximadamente (Gómez & Reis, 2011).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Localización del sitio experimental**

El presente experimento se llevó a cabo en un invernadero ubicado en el Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en la localidad de Buenavista, saltillo, Coahuila, México. El invernadero era de mediana tecnología con dimensiones de 10 x 25 m y se encuentra a una altura de 1742 msnm.

La determinación de caracteres relacionados al vigor de la planta, la incidencia y severidad de la enfermedad se realizaron en el mismo invernadero donde se estableció el experimento, mientras que las determinaciones bioquímicas se realizaron en el laboratorio de Fisiología Vegetal ubicado en el Departamento de Horticultura.

#### **Material vegetal**

Se utilizaron semillas de tomate tipo saladette (*Solanum lycopersicum*) con habito de crecimiento determinado de la variedad Rio Grande. La cual produce fruto rojo intenso con excelente firmeza y con paredes gruesas que le permiten tener una larga vida de anaquel.

#### **Siembra**

Las semillas se sembraron en charolas de germinación de plástico de 200 cavidades con una mezcla húmeda de perlita y peat moss en una relación de 1:1 (v/v). Al momento de la siembra se colocó una semilla por cavidad, de tal manera que la profundidad de siembra y cobertura sea homogénea. Una vez sembradas se metieron las charolas a una cámara bioclimática con una temperatura de 23°C, un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad, luego se retiraron hasta tener un 85% de germinación.

## Trasplante

Una vez germinadas las semillas se llevaron al invernadero donde se estableció el experimento, las plantas se trasplantaron una vez teniendo de 5 a 6 hojas verdaderas en bolsas con una capacidad de 10 L utilizando como sustrato peat moss y perlita en una misma proporción. La nutrición del cultivo se realizó mediante la aplicación de la solución nutritiva universal Steiner (Steiner, 1984) la cual se fue adaptando según las etapas de desarrollo de la planta, y manteniendo el pH de la solución en 6.5.

## Tratamientos

La prueba consistió en la evaluación de cuatro tratamientos designados de la siguiente manera: Testigo absoluto (TA), que fueron plantas crecidas bajo condiciones normales; testigo de FOL (FOL), plantas inoculadas con el patógeno *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; Elicitor 1 (E1), plantas inoculadas con FOL y tratadas con un elicitor formulado a partir de extractos de algas. Elicitor 2 (E2), plantas inoculadas con FOL y la aplicación de un elicitor a base de extractos de plantas.

**Cuadro 2.** Descripción de tratamientos evaluados.

Tratamiento	Descripción	Siglas
1	Testigo absoluto con aplicación de agua vía foliar.	TA
2	Plantas inoculadas con FOL y con aplicación del extracto de algas vía foliar.	E1
3	Plantas inoculadas con FOL y con aplicación del extracto de plantas vía foliar.	E2
4	Plantas inoculadas con FOL con aplicación de agua vía foliar	FOL

La aplicación de los elicitores se realizó a los 7 y 14 días después del trasplante (previo a la inoculación del patógeno) y a los 56 ddt (posterior a la inoculación del patógeno). Los elicitores se prepararon en una solución acuosa y fueron asperjados directamente a las hojas de las plantas. Las concentraciones usadas fueron las recomendadas por la empresa Arysta Life Science, que brindó los productos prototipo, siendo de 3.75 mL L<sup>-1</sup> para E1 y de 1.5 mL L<sup>-1</sup> para E2.

### **Inoculación de FOL**

La cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), se aisló de raíces de plantas de tomate con síntomas de marchitez vascular. El aislado se propagó en medio de cultivo sólido papa dextrosa agar (PDA) y se dejó crecer por 10 días. Para la obtención del inóculo para la prueba en plantas de tomates se llevó a cabo la reproducción del patógeno en cultivo sumergido, usando como medio de cultivo el medio papa dextrosa, la inoculación del medio se realizó tomando con un asa un poco del crecimiento del hongo del medio sólido. El medio inoculado se colocó en un shaker a una temperatura de 28° C y agitación de 200 rpm, sin luz. Después de 14 días de que se inoculó el medio se determinó la concentración de esporas usando una cámara de Neubauer. La concentración de esporas se estandarizó en 1×10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>.

La inoculación de las plantas de los tratamientos FOL, E1 y E2, se realizó a los 19 ddt, para lo cual se hicieron heridas a las raíces de las plantas con ayuda de unas tijeras para favorecer la inoculación, posteriormente se midieron 50 ml de la solución con 1×10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup> de FOL y se vaciaron sobre el sustrato cerca de la base del tallo de cada planta.



## **Toma de muestras**

Para la evaluación de los parámetros bioquímicos fue necesario la toma de muestras, las cuales fueron colectadas a los 15 ddt (24 hrs después de la segunda aplicación de los elicitores), 23 ddt (4 días después de la inoculación del hongo), 57 ddt (cuando las plantas presentaron síntomas claros de la marchitez por FOL), a los 60 ddt (24 hrs posteriores a la tercera aplicación de los elicitores) y 61 ddt (48 hrs posteriores a la tercera aplicación de los elicitores).

La toma de muestra se realizó tomando tejido foliar de la tercera hoja fisiológicamente madura debajo del ápice, llevándose a cabo con el uso de guantes, para luego colocarlas en sobres de aluminio, con datos de identificación, como el tratamiento, repetición y número de muestreo. De ahí los sobres fueron colocados en nitrógeno líquido para congelar las muestras y detener por completo la actividad de descomposición. Al término de la colecta, las muestras fueron llevadas a almacenar al ultracongelador (-80°C), hasta su procesamiento en el laboratorio.

## **Extracción de enzimas**

Una vez llevadas al laboratorio, el tejido vegetal obtenido fue macerado con nitrógeno líquido y pesado según las técnicas descritas para cada determinación. Para obtener el extracto enzimático se agregó 1 mL de buffer de fosfatos en 500 mg de tejido vegetal macerado, homogeneizando con vortex para después centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una vez finalizado ese procedimiento se extrajo el sobrenadante o extracto proteínas, la cuantificación de las proteínas totales se realizó por medio de la técnica espectrofotométrica desarrollada por Bradford (1976).

### **Actividad de la fenilalanina amonio liasa**

Para llevar a cabo la determinación de la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), se siguió la técnica usada por Paz y Lago (1999), que consiste en medir 0.9 mL de L-Fenilalanina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y adicionar 0.1 mL de extracto enzimático e incubar a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Para detener la reacción se adicionó 0.25 mL de ácido clorhídrico 5N. Posteriormente las muestras fueron colocadas sobre una cama de hielo y a su vez colocando 5 mL de agua destilada. Finalmente se prosiguió con la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 290 nm. La curva patrón se realizó utilizando concentraciones de ácido trans cinámico como estándar a partir de una solución de 10 mg/ml. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como el equivalente a la producción de  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  de ácido trans cinámico/min\*g de tejido fresco.

### **Actividad $\beta$ -1, 3 glucanasa**

Para determinar la actividad  $\beta$ -1, 3 glucanasa se utilizó la técnica usada por Paz y lago (1999), que consiste en medir 0.2 mL de sustrato Laminarina ( $1 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) y adicionarle 0.1 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 5.2 y 0.1 mL de extracto enzimático, luego las muestras se incuban a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. La actividad enzimática se determinó por medición del nivel de producción de azúcares reductores según Nelson 1944. Una unidad se expresó en términos de actividad específica como  $\mu\text{mol}$  de glucosa/min\*g de tejido fresco.

### **Actividad peroxidasa**

La actividad peroxidasa fue determinada espectrofotométricamente utilizando rojo de fenol como sustrato. Para llevar a cabo la determinación se utilizaron 20  $\mu\text{L}$  de extracto proteico, después se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de rojo de fenol al 0.2% (p/v) y 930  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio a 50 mM (pH 4.2), posteriormente la reacción

fue desencadenada con 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno a una concentración de 1 mM. Después de 3 minutos de incubación la reacción fue detenida con 40  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio (2N) y se evaluó la absorbancia a 610 nm, esta fue calculada con el coeficiente de extinción molar de  $22,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para el producto oxidado. La actividad de peroxidasa fue expresada como milimoles de rojo de fenol oxidado por gramo de tejido fresco por minuto ( $\text{mmol}$  rojo de fenol/g tejido fresco\*min).

### **Actividad quitinasa**

Para lograr la determinación de esta actividad enzimática se adicionó 2 mL de solución amortiguadora de ácido cítrico  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  y fosfato de sodio  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5.2 a 1 mL de extracto enzimático y a 1 mL de quitina coloidal 0.5%. Posteriormente se incubaron las muestras a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 minutos con agitación continua. Para detener la reacción se calentó a ebullición por 5 minutos. Finalmente se determinó el incremento de azúcares reductores (Inui *et al.*,1997) al tomar las lecturas a una  $\lambda = 420 \text{ nm}$ . La actividad enzimática se expresó como  $\mu\text{moles}$  de azúcares reductores/min\*g de tejido fresco.

### **Evaluación de la enfermedad**

La evaluación de la incidencia y la severidad de la enfermedad causada por FOL se realizó a los 80 ddt (61 días después de la inoculación del hongo).

### **Incidencia**

La incidencia es el porcentaje de plantas enfermas dentro de una unidad de muestreo, es una medida cuantitativa, rápida y sencilla que es generalmente más precisa y reproducible que otras medidas cuantitativas (Seem, 1984).

## Severidad

La severidad es la cantidad de la enfermedad que afecta las entidades (área foliar) dentro de una unidad de muestreo. La medida de severidad es más sencilla cuando se expresa como proporción o porcentaje de la unidad de muestreo usando unidades de mediciones directas o estimaciones como claves o escalas (Seem, 1984).

Para esta variable se utilizó la escala reportado por Diener y Ausubel, 2005. A continuación, se define la escala:

**Cuadro 3.** Escala de severidad reportada por Diener y Ausubel, 2005.

Escala	Condición	Porcentaje de severidad
0	Planta muerta	100%
1	Hojas viejas muertas y hojas jóvenes con crecimiento detenido	80%
2	Hojas viejas cloróticas y hojas jóvenes con crecimiento detenido	60%
3	Hojas viejas con clorosis vascular y hojas jóvenes con crecimiento detenido	40%
4	Peciolos de hojas con crecimiento detenido	20%
5	Sin síntomas visibles	0%

## **Evaluación de variables agronómicas**

Esta evaluación se realizó a los 80 ddt, las variables agronómicas evaluadas en cada planta fue la biomasa seca de raíz, tallo, hoja y fruto. Para llevar a cabo la evaluación de estas variables fue necesario seccionar por órganos a las plantas y colocarlos en bolsas de papel estraza, posteriormente se sometieron a un proceso de secado en la estufa de secado a 80°C durante 72 horas. Finalmente se determinó el peso seco en una balanza analítica para cada órgano de la planta, los resultados se expresaron en gramos.

## **Diseño experimental**

El experimento se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar con 4 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento.

## **Análisis**

Para la variable severidad de la enfermedad los valores obtenidos en porcentajes fueron ajustados según la transformación angular de Bliss (Steel y Torrie, 1985).

En cuanto a las variables agronómicas se realizó un análisis de varianza con diseño completamente al azar. Mientras que los datos obtenidos para las variables bioquímicas fueron analizados por medio de un análisis de varianza con arreglo factorial, donde el factor A, fueron los tratamientos estudiados y el factor B, las diferentes fechas de muestreo. Se realizaron pruebas de comparación de medias por la prueba LSD Fisher ( $p \leq 0.05$ ) para todas las variables. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat.

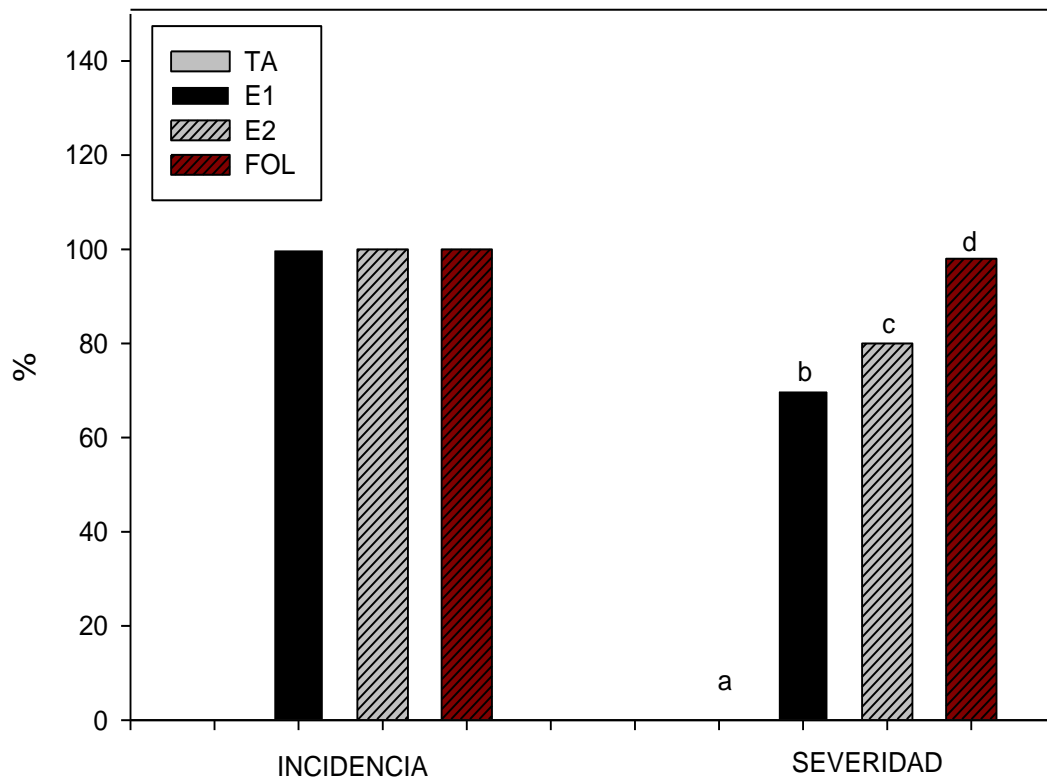
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Incidencia y severidad

Para la fecha en que se realizó la evaluación entre los tratamientos inoculados con FOL (80 ddt), se observó la incidencia del patógeno en todas las plantas evaluadas, es decir todas las plantas mostraron síntomas visibles de la enfermedad. En cuanto a la severidad, la aplicación de los elicitores disminuyó la severidad de la enfermedad en un 28% para E1 y 18% para E2 en comparación con el tratamiento solo con FOL (Figura 1).

En general, se observó que todas las plantas inoculadas con FOL mostraron síntomas visibles de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y que los síntomas variaron de acuerdo con la severidad de la enfermedad. Este resultado es frecuente en la evaluación de productos que inducen resistencia en plantas, ya que la inducción de resistencia solo es uno de los varios métodos para contrarrestar el ataque de enfermedades y plagas, y que debe combinarse con otras prácticas de control para complementar la protección a las plantas, como la resistencia genética, las prácticas culturales, el control biológico y el uso medido de plaguicidas (Vallad y Goodman, 2004).

Estos resultados difieren con los reportados por Gonzales *et al.*, (2015) donde indicó que la aspersion de las plantas de tomate con el extracto de *H. longipes* tuvo un efecto positivo al reducir en 15% la incidencia de la marchitez en las plantas asperjadas con *H. longipes* e inoculadas con FOL con respecto a las plantas solamente inoculadas con FOL. Por otro lado, coincide con los datos encontrados para severidad, donde la severidad disminuyó cerca del 80% con la aplicación del extracto de *H. longipes* con respecto al testigo infestado con FOL.



**Figura 1.** Incidencia y severidad de plantas de tomate sometidas a estrés biótico (FOL) y tratadas con extractos, (80 ddt).

### **Biomasa seca de raíz**

En el análisis de varianza para biomasa seca de raíz se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (Figura 2), donde se observó un comportamiento similar en los valores de biomasa seca de raíz para TA y E2, mientras que para E1 se observó una disminución del 24% en comparación al testigo absoluto (10.74 g). Sin embargo, este decremento fue menor que el observado en FOL, siendo del 30% con respecto al TA.

### **Biomasa seca de tallo**

En cuanto a la biomasa seca de tallo (Figura 2), se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, las plantas asperjadas con los elicitores (E1 y E2) mostraron valores similares al testigo absoluto (29.8 g), mientras que el tratamiento FOL presentó los valores más bajos para esta variable, mostrando un decremento del 25% con respecto al testigo absoluto.

### **Biomasa seca de hoja**

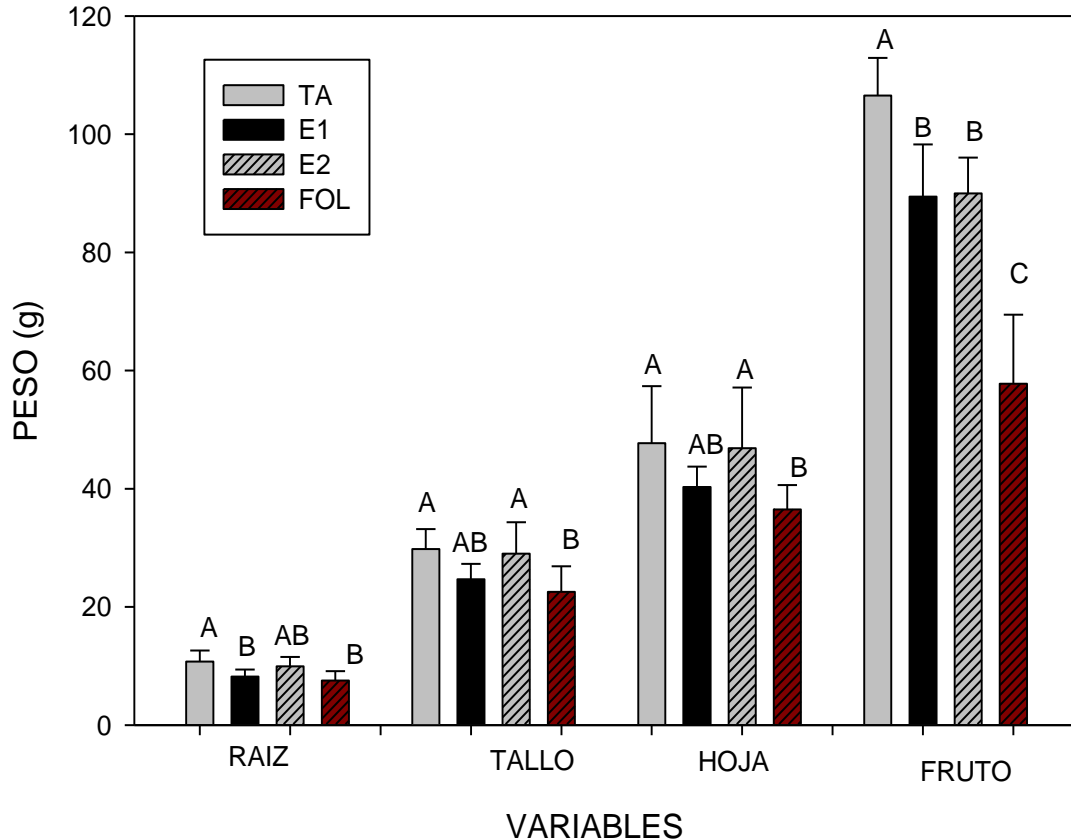
En cuanto a la biomasa seca de hoja (Figura 2), se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, las plantas asperjadas con los elicitores (E1 y E2) mostraron valores similares al testigo absoluto (47.72 g), mientras que FOL obtuvo un decremento del 24% en el valor de esta variable en comparación del testigo absoluto.

### **Biomasa seca de fruto**

Para esta variable se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos estudiados (Figura 2), observándose una disminución del 16% en las plantas asperjadas con los elicitores E1 y E2 con respecto al testigo absoluto (106.52 g), sin embargo, esta disminución fue menor que la obtenida en las plantas de FOL, la cual fue de 46% en la disminución de esta variable.

La disminución de las variables de biomasa seca observada en las plantas de los tratamientos con FOL se debe a los daños causados por el hongo, ya que al penetrar inicialmente por la raíz de forma asintomática coloniza el tejido vascular, boqueando los conductos vasculares, y con ello el transporte de agua y nutrientes de la raíz hacia las hojas y viceversa, lo que desencadena un marchitamiento masivo, necrosis, clorosis de las partes aéreas de la planta, que al final se refleja como disminución en la producción de biomasa seca en la planta (Villa-Martínez *et al.*, 2014).





**Figura 2.** Biomasa seca de raíz, tallo, hoja y fruto de plantas de tomate asperjadas con extractos e inoculadas con *FOL*. Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (LSD Fisher,  $P < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con lo reportado por Gonzales *et al* (2015), quienes indicaron un decremento en la biomasa seca de raíz, tallo y hoja cuando se asperjó el extracto de *H. longipes* en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*, caso contrario cuando el extracto se asperjó en plantas sanas permitiendo una acumulación mayor de biomasa. Por otro lado, los resultados de biomasa seca de raíz difieren con lo reportado por García (2012) quien evaluó la aplicación de ácido salicílico en plantas de tomate inoculadas con *FOL* y observó un incremento del 24% para esta variable.

Por su parte Torres (2014) en su estudio sobre la aplicación de selenio en plantas de tomate sometidas a un estrés biótico (FOL) y su influencia en el crecimiento fisiológico, indicó que las plantas de tomate del testigo absoluto obtuvieron mayor valor de biomasa seca de tallo en comparación a las plantas inoculadas con FOL. Mientras que la aplicación de ácido benzoico en plantas de tomate inoculadas con FOL mostraron un incremento de la biomasa seca foliar (García, 2012).

### Variables bioquímicas

El análisis de varianza realizado a los datos de las enzimas involucradas en la defensa de las plantas mostró la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados; las fechas de muestreo realizado y la interacción entre estos factores (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Valor de P obtenido del análisis de varianza para variables bioquímicas.

<b>Variable</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Muestreo</b>	<b>Tratamiento - Muestreo</b>
<b>PAL</b>	<0,0596 <sup>NS</sup>	<0,0001 <sup>**</sup>	<0,0001 <sup>**</sup>
<b>Glucanasa</b>	<0,0001 <sup>**</sup>	<0,0001 <sup>**</sup>	<0,0001 <sup>**</sup>
<b>Peroxidasa</b>	<0,0001 <sup>**</sup>	<0,0001 <sup>**</sup>	<0,0001 <sup>**</sup>
<b>Quitinasa</b>	0,1919 <sup>NS</sup>	<0,0001 <sup>**</sup>	<0,0001 <sup>**</sup>

\*\*\*p< 0.001; \*\* p< 0.01; \* p< 0.05; NS=No Significativo.

### **Actividad Fenilalanina Amonio Liasa.**

De acuerdo a la Figura 3, la actividad de la PAL presentó cambios durante el desarrollo de las plantas de tomate. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y diferencias altamente significativas entre los muestreos realizados (Cuadro 4).

Durante el primer muestreo se observó que todos los tratamientos tuvieron un comportamiento similar en la actividad de esta enzima observándose valores entre 0.24 y 0.30  $\mu\text{mol}$  de ácido trans cinámico/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco. En el muestreo dos, realizado a los 4 días después de la inoculación del hongo se observaron valores similares en la actividad de PAL para todos los tratamientos oscilando los valores entre 0.22 y 0.33  $\mu\text{mol}$  de ácido trans cinámico/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco.

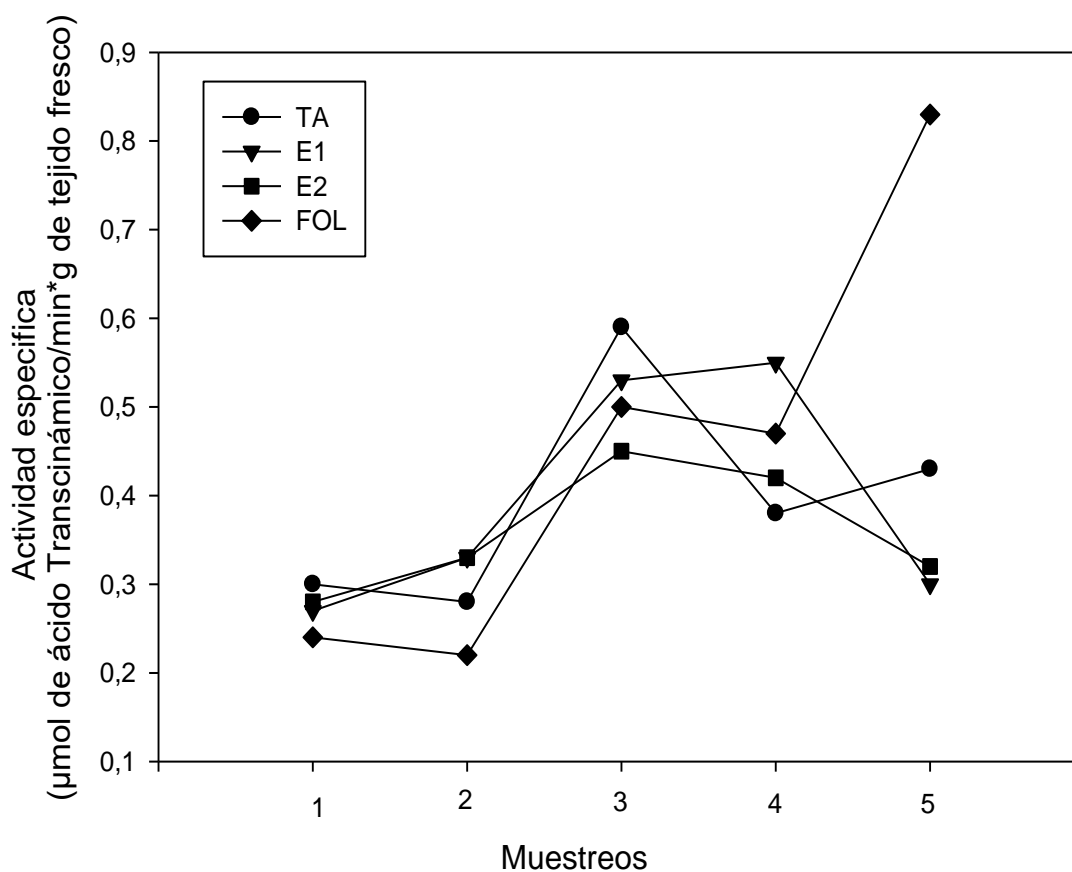
Para el tercer muestreo se obtuvo un incremento de la actividad para todos los tratamientos respecto al muestreo anterior, pero entre los tratamientos evaluados, los valores permanecieron similares en la actividad, oscilando entre 0.45 y 0.59  $\mu\text{mol}$  de ácido trans cinámico/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco. Para el muestreo cuatro se presentó un incremento para E1, siendo el tratamiento que mostró mayor actividad en esta fecha de evaluación, superando en un 44% al TA (0.38  $\mu\text{mol}$  de ácido trans cinámico/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco), mientras que TA, E2 y FOL obtuvieron valores similares en actividad enzimática de PAL.

Para el último muestreo se observó que FOL obtuvo la mayor actividad de PAL, siendo superior en un 93% con respecto a TA (0.43  $\mu\text{mol}$  de ácido trans cinámico/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco) y a la vez tuvo un incremento al muestreo anterior. Por otro lado, TA, E1 y E2 tuvieron un comportamiento similar. Sin embargo, se observó un decremento para E1 y E2 con respecto al muestreo anterior.

Estos resultados confirman que la enzima PAL es activada ya sea por la interacción planta-patógeno, así como en otras condiciones de estrés (Boonchitsirikul *et al.*, 1998).

Resultados similares reportó González (2011), que indicó que la máxima actividad PAL en hojas se presentó a las 12 horas en el tratamiento con el extracto de *H. longipes* con un incremento de 591% (0.394 U/mg de proteína) con respecto al testigo absoluto (0.057 U/mg de proteína). Por su parte Rodríguez *et al.*, (2006) evaluaron el efecto de quitosán en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz, contra *Phycularia grisea* sacc., y observaron que las plantas tratadas con las diferentes dosis del hidrolizado de quitosán e inoculadas, exhibieron en todos los casos los mayores niveles de actividad PAL con respecto a los obtenidos en las plantas provenientes del testigo absoluto, así como también a las plantas provenientes del testigo de *Fusarium*, en la cual obtuvo como resultado un incremento de 308% de PAL y se presentó a las 72 horas, después de la inoculación fúngica. Además, menciona que las plantas testigo inoculadas con FOL provocaron una estimulación mayor de la actividad PAL significativamente mayor que las del testigo absoluto.

### Fenilalanina amonio liasa



**Figura 3.** Actividad enzimática de PAL en plantas de tomates asperjadas con extractos e inoculadas con *FOL*. Muestras (1: 15ddt; 2: 23ddt; 3:57ddt; 4: 60ddt; 5: 61ddt.).

**Cuadro 5.** Prueba de comparación de medias para la actividad enzimática de PAL (umol ácido transcinámico/ min/ g de tejido fresco) en plantas de tomate inoculadas con *FOL*.

Tratamiento	Muestras				
	1	2	3	4	5
TA	0.30 FGHI*	0.28 GHI	0.59 B	0.38 DEFGH	0.43 CDEFG
E1	0.27 HI	0.33 EFGHI	0.53 BC	0.55 BC	0.30 GHI
E2	0.28 GHI	0.33 EFGHI	0.45 BCDEF	0.42 CDEFG	0.32 EFGHI
FOL	0.24 HI	0.22 I	0.50 BCD	0.47 BCDE	0.83 A

\*Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (LSD Fisher,  $P < 0.05$ ).

### **Actividad $\beta$ -1,3 glucanasa.**

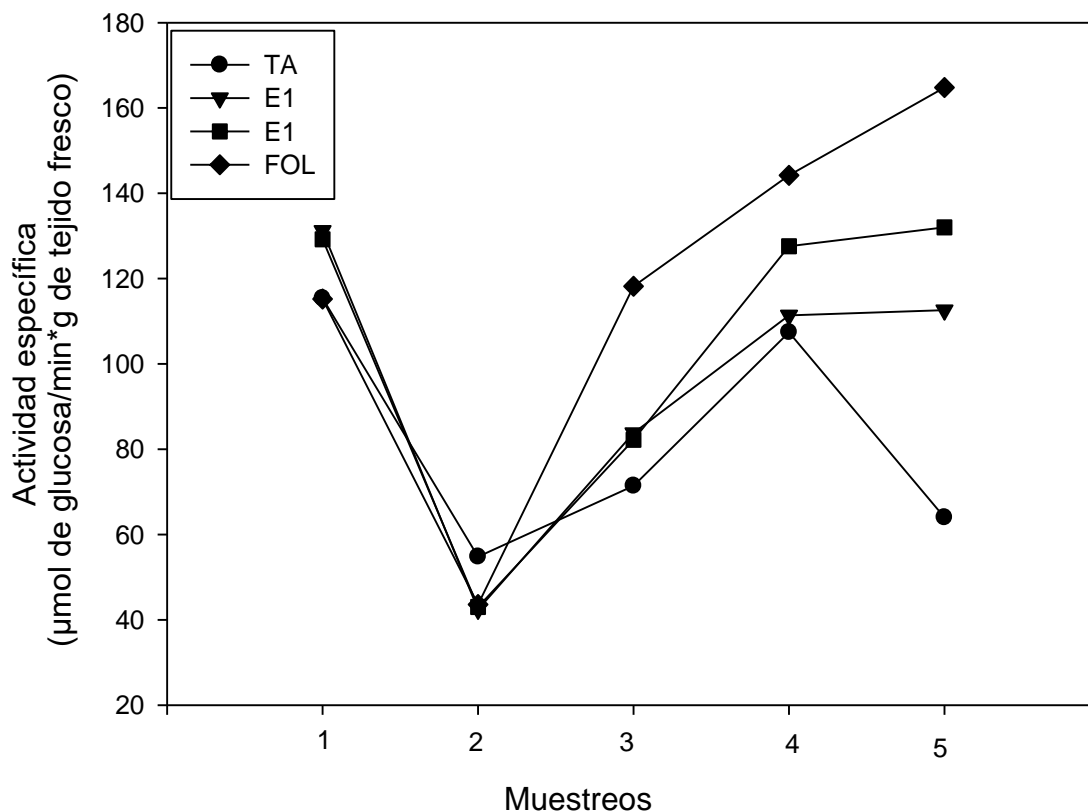
La actividad de la  $\beta$ -1,3 glucanasa presentó diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados y los muestreos realizados (Cuadro 4). De acuerdo a la Figura 4, en el primer muestreo se observó un comportamiento similar en la actividad de esta enzima para todos los tratamientos, con una actividad enzimática entre 115.2 y 131.2  $\mu\text{mol}$  de glucosa/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco. Para el muestreo 2, realizado a los 4 días después de la inoculación del hongo, se observó un decremento en la actividad en todos los tratamientos en comparación al muestreo anterior. Sin embargo, se presentaron valores similares en la actividad de glucanasa para todos los tratamientos oscilando entre 42.4 y 54.8  $\mu\text{mol}$  de glucosa/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco.

En el muestreo 3, la actividad enzimática se incrementó para todos los tratamientos con respecto al muestreo anterior, donde FOL tuvo un incremento del 65% con respecto a TA (71.4  $\mu\text{mol}$  de glucosa/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco), mientras que E1, E2 y TA tuvieron un comportamiento similar. En el muestreo 4, se observó un aumento en la actividad glucanasa para los tratamientos FOL y E2 siendo de 34% y 19% respectivamente, en comparación a TA. Las plantas pertenecientes a E1 mostraron valores similares al testigo (107.4  $\mu\text{mol}$  de glucosa/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco).

Para el último muestreo, FOL alcanzó la máxima actividad de glucanasa presentándose un incremento del 157% (164.8  $\mu\text{mol}$  de glucosa/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco), mientras que E1 y E2 también tuvieron un incremento en esta variable del 75% y 106% respectivamente al ser comparados con TA (64  $\mu\text{mol}$  de glucosa/ $\text{min}^*\text{g}$  de tejido fresco).

De manera general se observó que FOL obtuvo los mayores valores de la actividad de glucanasa a partir del tercer muestreo, que correspondió a las fechas posteriores a la inoculación el hongo. Así mismo el TA obtuvo los valores más bajos de la actividad a partir del tercer muestreo.

### Actividad glucanasa



**Figura 4.** Actividad enzimática de β-1,3 glucanasa en plantas de tomates asperjadas con elicitores e inoculadas con *FOL*. Muestras (1: 15ddt; 2: 23ddt; 3: 57ddt; 4: 60ddt; 5: 61ddt.).

**Cuadro 6.** Prueba de comparación de medias para la actividad enzimática de β-1,3 glucanasa (μmol de glucosa/min\*g de tejido fresco) en plantas de tomate inoculadas con *FOL*.

Tratamiento	Muestras				
	1	2	3	4	5
TA	115.4 CDEF	54.8 IJ	71.4 GHI	107.4 F	64 HI
E1	131.2 BCD	42.4 J	83.8 G	111.4 EF	112.6 DEF
E2	129.2 BCDE	43 J	82.2 GH	127.6 BCDE	132 BC
FOL	115.2 CDEF	43.6 J	118.2 CDEF	144.2 B	164.8 A

\*Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (LSD Fisher, P<0.05).

Estos resultados pueden compararse con lo reportado por Rodríguez *et al.*, (2006) quienes evaluaron el efecto del quitosán en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz, contra *Phycularia grisea* sacc., e indicaron que las plantas obtenidas de semillas tratadas con las diferentes dosis de quitosán y posteriormente inoculadas con FOL, exhibieron mayores valores de  $\beta$ -1,3 Glucanasa que las del testigo absoluto, y que además en todas ellas los mayores valores se registraron en la última evaluación (168 hrs después de la inoculación del hongo). Por su parte Couoh *et al.*, (2016), estudió la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa en las plántulas de *C. chinense* inoculadas con homogenados celulares de *Phytophthora capsici*, indicando que las plantas asperjadas con 20 ug/mL de homogenado fúngico fueron las que mejor respondieron al tratamiento, dado que cuatro días después de inoculadas exhibieron las actividades más elevadas de  $\beta$ -1,3 glucanasa.

### **Actividad peroxidasa**

En cuanto a la actividad de la enzima peroxidasa se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados y los muestreos realizados (Cuadro 4), además se observó que no existe una tendencia definida en ninguno de los tratamientos, ya que se presentaron fluctuaciones en la actividad de esta enzima a través del tiempo.

Durante el primer y segundo muestreo realizado se observó que todos los tratamientos obtuvieron valores similares en la actividad de peroxidasa (Figura 5). Para el primer muestreo los valores de esta enzima se encontraron entre  $7.4E^{-09}$  y  $1.1E^{-08}$  mmol de rojo de fenol/g Tejido Fresco\*min, mientras que para la segunda fecha de evaluación se situaron entre  $3.2E^{-09}$  y  $1.0E^{-08}$  mmol rojo de fenol/g tejido Fresco\*min.

Para el muestreo 3, se observó un comportamiento similar en la actividad de esta enzima para las plantas de E1 y E2, pero superando en un 68% y 78% respectivamente al TA; por otro lado, FOL no mostró diferencia en la actividad



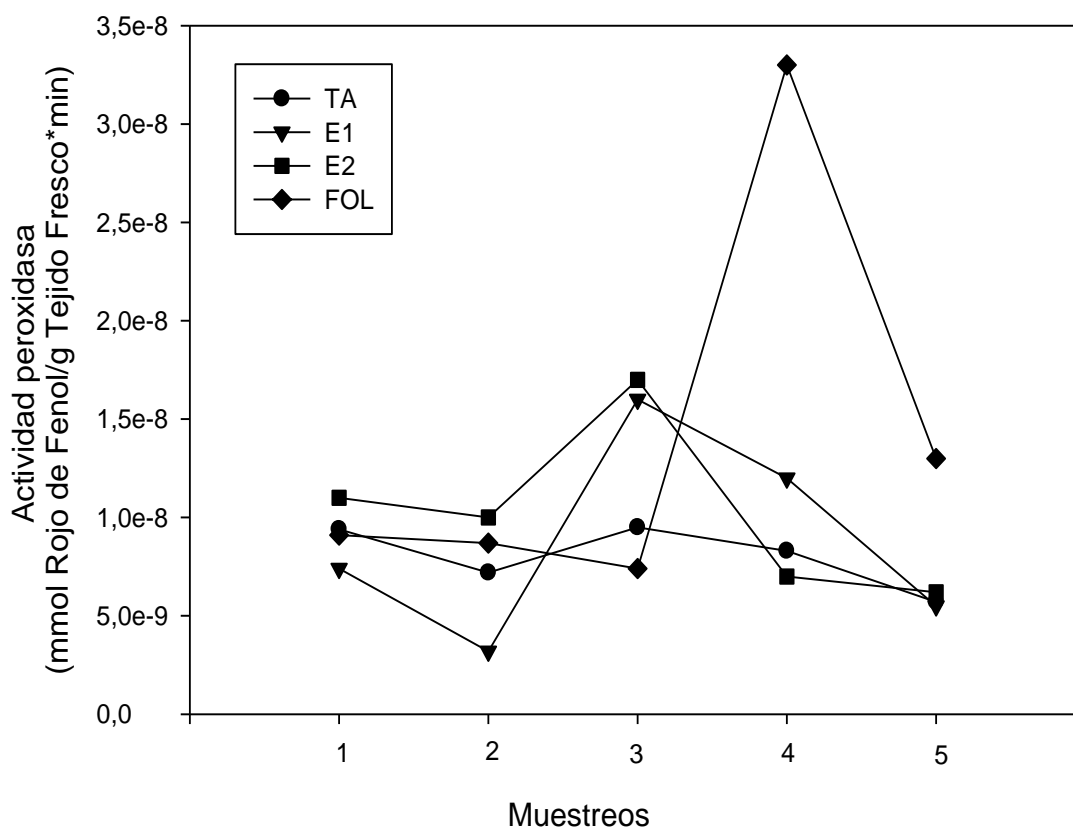
enzimática con respecto a TA cuyo valor fue  $9.5E^{-09}$  mmol rojo de fenol/g tejido fresco\*min. Para el muestreo 4, se observó una tendencia de incremento para FOL alcanzando la máxima actividad de peroxidasa, superando en un 297% al TA ( $8.3E^{-09}$  mmol rojo de fenol/g tejido fresco\*min), mientras que E1, E2 mostraron valores similares para esta variable.

En el último muestreo realizado, se observaron resultados similares en la actividad peroxidasa para TA, E1 y E2 ( $5.7E^{-09}$  mmol rojo de fenol/g tejido fresco\*min), mientras que para FOL se obtuvo la mayor actividad de peroxidasa, superando a los demás tratamientos en 128%.

Estos resultados difieren con lo reportado por Gonzalez (2011), quien indicó que la máxima actividad peroxidasa en hoja fue al cuarto día, con el tratamiento tratado con el producto comercial a base de ácido salicílico con  $1.60309E^{-06}$  U/mg de proteína, y que además en el testigo absoluto no se detectó actividad peroxidasa. Por otro lado, este autor también menciona que la actividad peroxidasa en raíz presentó un incremento en el tratamiento inoculado con FOL al cuarto día con un aumento de 160% ( $5.694$  U/mg de proteína) respecto al testigo absoluto ( $2.183$  U/mg de proteína).

Por su parte Cuervo *et al.*, (2009), en su evaluación de la actividad enzimática peroxidasa y el contenido de lignina en tallos de esquejes de clavel (*Dianthus cayophyllus* L.) inoculados con el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *Dianthi* (Fod) raza 2, observaron que la variedad tolerante presentó inducción de dicha enzima a las 8 y 48 h pos-inoculación y aumento el contenido de lignina a 48 y 72 h. Mientras que en la variedad susceptible no se encontraron cambios significativos en los niveles de POD ni en el contenido de lignina, por lo que establecieron que la inducción de la actividad POD está asociada a la lignificación.

### Actividad peroxidasa



**Figura 5.** Actividad enzimática de peroxidasa en plantas de tomates asperjadas con extractos e inoculadas con *FOL*. Muestras (1: 15ddt; 2: 23ddt; 3: 57ddt; 4: 60ddt; 5: 61ddt.).

**Cuadro 7.** Prueba de comparación de medias para la actividad enzimática de peroxidasa (mmol Rojo de Fenol/g Tejido Fresco\*min) en plantas de tomate inoculadas con *FOL*.

Tratamiento	Muestras				
	1	2	3	4	5
TA	9.4E-09 CDEF	7.2E-09 EFG	9.5E-09CDEF	8.3E-09CDEF	5.7E-09 FG
E1	7.4E-09 DEFG	3.2E-09 G	1.6E-08 B	1.2E-08 BCD	5.5E-09 FG
E2	1.1E-08 CDE	1.0E-08 CDEF	1.7E-08 B	7.0E-09 EFG	6.2E-09EFG
FOL	9.1E-09 CDEF	8.7E-09CDEF	7.4E-09DEFG	3.3E-08 A	1.3E-08 BC

\*Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (LSD Fisher,  $P < 0.05$ ).

### **Actividad quitinasa.**

La actividad de la enzima quitinasa presentó cambios durante el desarrollo de las plantas de tomate en todos los tratamientos estudiados (Figura 6). Sin embargo, durante las primeras fechas de muestreo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

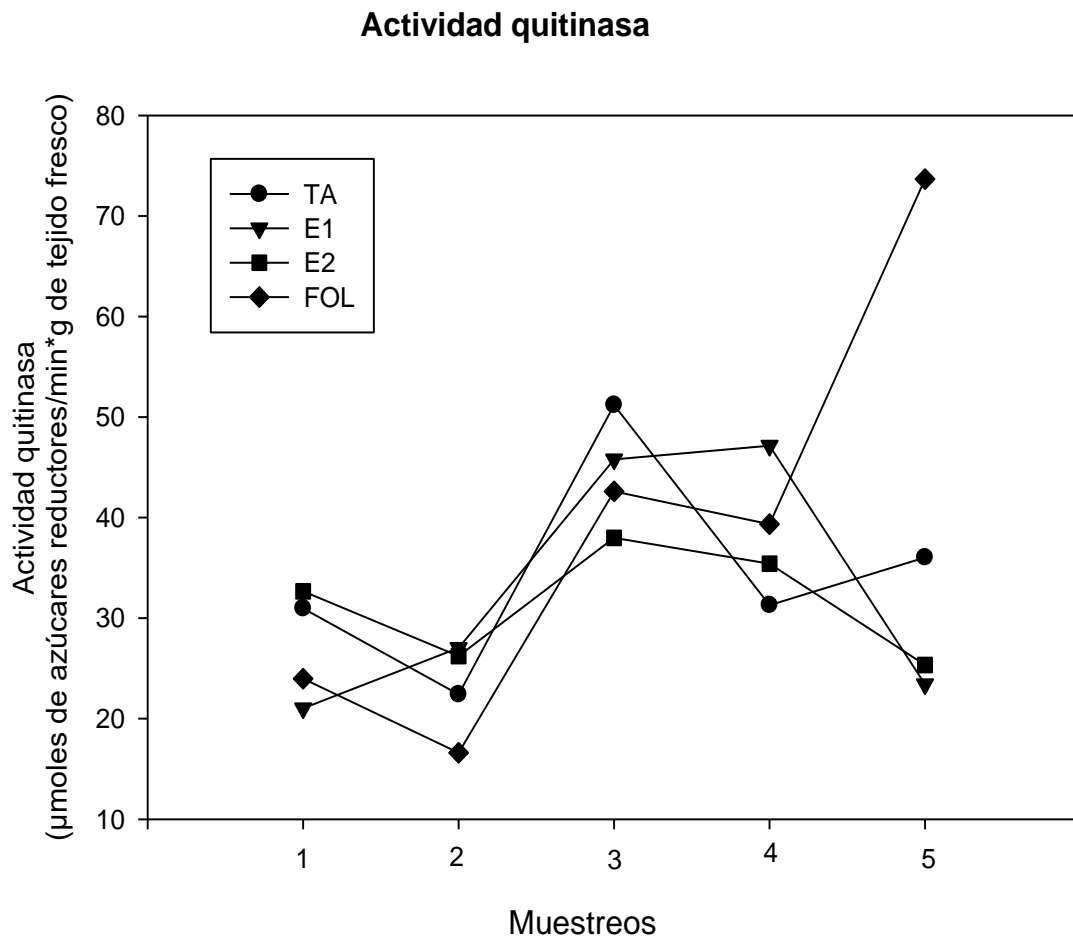
Para la primera fecha de muestreo la actividad de esta enzima se mantuvo entre 21.03 y 32.68  $\mu$ moles de azúcares reductores /min\*g de tejido fresco, mientras que para la siguiente evaluación fue de 16.6 y 27.04  $\mu$ moles de azúcares reductores /min\*g de tejido fresco, cabe mencionar que durante este muestreo se presentó la actividad enzimática más baja para los muestreos realizados.

Para el tercer y cuarto muestreo, la actividad de esta enzima se mantuvo entre 31.28 y 51.2  $\mu$ moles de azúcares reductores/min\*g de tejido fresco, siendo superior a los muestreos anteriores, aunque no se presentaron diferencias entre los tratamientos.

Únicamente se observaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos para la última fecha de muestreo (Cuadro 4). Tanto TA, E1 y E2 mostraron valores similares para esta variable, mientras que FOL presentó un incremento de 104 % con respecto a TA (36,04  $\mu$ moles de azúcares reductores/min\*g de tejido fresco), siendo además la mayor actividad quitinasa para todos los muestreos y los tratamientos.

Estos resultados difieren con lo reportado por Gonzalez (2011), quien señaló que la máxima actividad quitinasa en hojas de tomate se presentó a las 12 horas en el tratamiento asperjado con el extracto de *H. longipes*, mostrando un incremento de 650% (0.060 U/mg de proteína) con respecto al testigo absoluto (0.008 U/mg de proteína). Por otro lado, coincide en parte con lo mencionado, donde indicó que el tratamiento inoculado con FOL también presentó un incremento en la actividad de quitinasa en la raíz al cuarto día (un día después de haber inoculado) con un aumento de 234% (0.341 U/mg de proteína) respecto al testigo absoluto (0.102 U/mg de proteína).

También difieren con lo reportado por Rodríguez *et al.*, (2006) en su evaluación del efecto del quitosán en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz, contra *Phycularia grisea sacc.*, indicando que la actividad de la enzima quitinasa en las plantas tratadas con las diferentes dosis de quitosán fue de 2-3 veces superior a las plantas testigo, observando los mayores valores de la actividad de quitinasa a las 168 h después de la inoculación del hongo.



**Figura 6.** Actividad enzimática de quitinasa en plantas de tomates asperjadas con extractos e inoculadas con *FOL*. Muestreos (1: 15ddt; 2: 23ddt; 3: 57ddt; 4: 60ddt; 5: 61ddt).

**Cuadro 8.** Prueba de comparación de medias para la actividad enzimática de quitinasa ( $\mu$ moles de azúcares reductores/min\*g de tejido fresco) en plantas de tomate inoculadas con FOL.

Tratamiento	Muestras				
	1	2	3	4	5
<b>TA</b>	30,98CDEFGH	22,42 FGH	51,2 B	31,28CDEFGH	36,04BCDEFG
<b>E1</b>	21,03 GH	27,04 DEFGH	45,8 BC	47,16 BC	23,42 EFGH
<b>E2</b>	32,68CDEFGH	26,23 DEFGH	37,98 BCDEF	35,42BCDEFG	25,35 EFGH
<b>FOL</b>	23,98 EFGH	16,6 H	42,6 BCD	39,35 BCDE	73,66 A

\*Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (LSD Fisher,  $P < 0.05$ ).

## V. CONCLUSIONES

La aplicación de elicitores provenientes de extracto de algas y de extractos de plantas indujo la disminución de la severidad de la enfermedad en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). El tratamiento con extracto de plantas permitió la acumulación de biomasa similar al tratamiento testigo sin inocular. Mientras que este efecto se observó solo para la biomasa de tallo y hoja en el tratamiento con extracto de algas.

La actividad enzimática de PAL, peroxidasa,  $\beta$ -1,3 glucanasas y quitinasas se vieron modificadas durante el desarrollo de la enfermedad. Por lo que el uso de estos elicitores se propone como una alternativa para el manejo de la enfermedad causada por *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.

## VI. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. (1996). Fitopatología. Ed. Limusa. 2ª ed. México. 838 p.
- Agrios, G. (2005). Plant Pathology. 5ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. 922 p.
- Altieri, M. A. y Muñoz, M. (2000). Mecanismos de Resistencia de las plantas a fitopatógenos. *En Fitopatología aplicada, epidemiología y manejo de enfermedades. Berkeley: Consorcio Latinoamericano sobre Agroecología y Desarrollo (ELADES). Universidad de California, (fotocopia S.A.): p.29-39.*
- Ardila, H. D., Higuera, B. L. (2005). Inducción diferencial de Polifenol oxidasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi raza 2. *Acta Biológica Colombiana*. (10). Pp.65-78.
- Ascencio, Á. A., López, B. A., Borrego, E. F., Rodríguez, S. A., Flores A., Jiménez, D. F., Gámez, A. J. (2008). Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista mexicana de fitopatología* (Vol. 26). Sociedad Mexicana de Fitopatología. Pp.25-26.
- Beltran, B. M. (2014). Inducción de resistencia en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) A *Candidatus Liberibacter*. UAAAN.43 p.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), Pp. 248-254.

- Carrillo, J. A., Montoya, T. J., García, R. S., Cruz, J. E., Márquez, I., Sañudo, A. J. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), Pp.11-13.
- Cavalcanti L. S., Di Piero R. M., Pascholati S. F., De Resende L. V., Romeiro R. (2005). Inductores de resistencia en plantas a patógenos e insetos. *FEALQ*. Piracicaba. Pp.11-153.
- Cesaveg; (2007). Manual de Plagas y Enfermedades en tomate. Cesaveg.123p.
- Comision Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. (2015). Jitomate. Obtenido de <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/alimentacion/jitomate.html>.
- Cruz, M., Hernández, Y., Rivas, E. (2006). Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patogenos y plagas. Veitía. 65 p.
- Cuervo, D., Martinez, S., Ardilla, H., Higuera, B. (2009). Mecanismo de defensa de las planta. *Revista Colombiana de Química*, (Vol. 38, Núm. 38). Pp. 1–10.
- Durrant, W. E., y Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology*. 42, 185-209.
- FAO. (2002). Agroinformacion del cultivo del tomate. 1parte. El origen del tomate. Taxonomía y morfología. Países y producción. Factores climáticos y suelo.
- FIRA. (2016). Tomate rojo 2016. Panorama Alimentario, 23. Otenido de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama\\_Agr\\_oalimentario\\_Tomate\\_Rojo\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama_Agr_oalimentario_Tomate_Rojo_2016.pdf).



- FIRA. (2017). Tomate Rojo 2017. Panorama Agroalimentario, 24. Obtenido de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama\\_Agroalimentario\\_Tomate\\_Rojo\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama_Agroalimentario_Tomate_Rojo_2017.pdf).
- García, R.S. (2001). Determinación de la raza de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causante de marchitamiento en plantas de tomate (híbrido Sun 0289) cultivadas en el lote de rancho viejo. Informe técnico CIAD/DUC/IT/006/ 01. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Culiacán, Sinaloa, México. 11 p.
- García, J. M. (2012). Inductores de tolerancia al estrés biótico y abiótico aplicados en plantas de tomate. UAAAN. 56p.
- García M. R., & Pérez L. R. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales Y Del Ambiente*, 9(1), Pp.5–10.
- García R. G. (2005). Efectos de un multi-extracto de algas y cianobacterias sobre la producción y calidad de tomate ecológico e integrado. *Horticom*.56 p.
- Gonzalez, S., Benavides, A., García, E. L., Rodríguez, E. M., Flores, A. (2015). Effect of alkamides as tolerance inductors to biotic stress in tomato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (12), Pp.2371–2382.
- Gómez, D. E., & Reis, E. M. (2011). Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Química Viva*. (1) Pp.6–17.
- González, I., Arias, Y., Yailén, Y., Rojas, M. M., González, E., Pino, O., Peteira, B. (2013). Inducción de mecanismos de defensivos en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Amalia) con el uso de aceites esenciales. *Revista de Protección Vegetal*, 28(3), Pp.185–191.
- González, M. S. (2011). Respuesta de defensa relacionada con la aplicación del extracto de *Heliopsis longipes* en el patosistema tomate-*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. UAAAN.158p.

- Granados Escobar E. F. (2015). Efecto de bioestimulantes foliares en el rendimiento del cultivo de berenjena. UAAAN. 64 p
- Higuera, B. L. (2001). Contribución al estudio de la participación de los compuestos fenólicos en los mecanismos de la interacción clavel *Dianthus caryophyllus* L-*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. (Tesis de doctorado en Química). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Pp.23-26.
- Intagri S.C. (2009). Enfermedades del Tomate, 15. Otenido de <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/enfermedades-foliares-en-tomate>.
- Jiménez, C. y Sanabria, N. 2008. Población final de *Trichoderma harzianum* en el control de la marchitez vascular en tomate causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Venezuela. Fitopatología Venezolana. 21:29-30.
- Kliebenstein, D. J. 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant, Cell y Environment*. 27(6), 675-684.
- Ma, L. J.; Geiser, D. M.; Proctor, R. H.; Rooney, A. P.; O'Donnell, K., Trail, F. y Kazan, K. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annual review of microbiology*. 67, 399-416.
- Madriz, K. O. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones. *Manejo Integrado de Plagas*. (63). Pp.22–32.
- Montes B. R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29, 73-82.
- Paz, D., Cabrera, G., Ramírez, M., Pombo, R., Gutiérrez, A. (1999). Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici* a nivel de bioensayo. *Cultivos Tropicales* (20). Pp.59- 66.

- Peralta I.E., Knapp S.K. y Spooner D.M.(2005). New species of wild tomatoes (solanum section Lycopersicon: Solanaceae) *from northern Peru Systematic Botany* 30 (2):424- 434.
- Pérez, E., Rodríguez, Y., Hernandez, M., Noval, B. (2004). Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-TOMATE (*Lycopersicon esculentum* MILL. ) Var. Amalia. I. Inducción de PR2, PR3 Y fenilalanina amonio-liasa en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales*, 25(2), Pp.7-9.
- Raddatz E. (2001). VAM y la resistencia de las plantas contra causantes de daños. Cali, Colombia. 17 p.
- Rabie, G. H. and Humiany, A. A. 2004. Role of VA mycorrhiza on the growth of cowpea plant and their associative effect with N<sub>2</sub> fixing and P-solubilizing bacteria as biofertilizer in calcareous soil. Finlandia. J. Food Agric. Environ. 2(3-4):186-192.
- Ramírez, V.J. 1998. Enfermedades de la raíz en tomate. Pp. 29-49. En : O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 225 p.
- Rao, Riveros, A. S. (2001). Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica. 61(61), Pp.4–11.
- Riveros A. S., Rosales F. E., Pocasangre L. E. (2004). Manejo alternativo de *Mycosphaerella fijiensis* a través de la inducción de resistencia y uso de bioproductos. XVI Reunión Internacional ACORBAT.
- Rodriguez, A. T., Ramirez, M. A., Cardenas, R. A., Falcon A., Buatista, S. (2006). Efecto de la Quitosana en la Inducción de la Actividad de Enzimas Relacionadas con la Defensa y Protección de Plántulas de Arroz ( *Oryza sativa* L .) contra *Pyricularia grisea* Sacc. *Revista mexicana de Fitopatología*.(vol. 24).Num.001. Sociedad mexicana de Fitopatología,

A.C. Ciudad de Obregon ,Mexico. Pp1–7.

SAGARPA. (2017). Produccion de tomate, 2–3. Otenido de [http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2017/febrero/Documents/JAC\\_0055\\_10.PDF](http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2017/febrero/Documents/JAC_0055_10.PDF)

SAGARPA. (2016). SAGARPA. Obtenido de <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/bajacaliforniasur/boletines/2016/agosto/Documents/2016BS345.pdf>

Salgado, S. L. 2012. Inductores de resistencia a TuMV en Arabidopsis thaliana (L). Heynh. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. 82 p.

Sanabria, H. (2011). Beneficio de aminoácidos ante situaciones de estrés del cultivo. Hortalizas. (En línea). Disponible en: <http://www.hortalizas.com/articulo/26092/beneficios-de-aminoacidos-antesituaciones-de-estres-del-cultivo>

SIAP. (2015). SIAP. Obtenido de [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/identidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp)

SNICS. (2015). Tomate Rojo. Otenido de [http://www.sinarefi.org.mx/redes/red\\_jitomate.html](http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_jitomate.html)

Taiz, L. y E. Zeiger. (2006). Plant Physiology. 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. Pp. 23-30.

Taiz, L., Zeiger, E. (1991). Plant Physiology. The Benjamin/Cummings. Redwood City, California. U.S.A. 316 p.

Terumi I. A., Batista T. J. J., Schwan-Estrada, K. R. F. (2013). *Cymbopogon citratus* essential oil bioactivity and the induction of enzymes related to the pathogenesis of *Alternaria solani* on tomato plants. Idesia, 31(4), Pp. 11–17.

- Torres, V. M. (2014). Respuesta de tolerancia al estrés biótico en plantas de tomate con el uso de selenio. UAAAN. Pp.43-44.
- Valueva, T. A., Mosolov, V. V. (2004). Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry* (Moscow), 69(11), Pp.1305–1309.
- Villa, A., Morales, H. A., Pérez, R., Soto, J. M., Basurto, M., Martínez, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp . y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronomica*, 64(2). Pp.194–205.
- Zamora, E. G., Martínez, N. L., Guerrero, M. A., Fuentes M. U., Hernández, C. A. (2008). Sanidad vegetal. Universidad de Sevilla. Pp.6-10.