

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



APLICACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS COMO INDUCTORES DE TOLERANCIA
AL ESTRÉS CAUSADO POR *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN
PLANTAS DE TOMATE

Tesis

Que presenta WILLIAM ZÁRATE MARTÍNEZ
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN AGRICULTURA PROTEGIDA

Saltillo, Coahuila

Julio 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

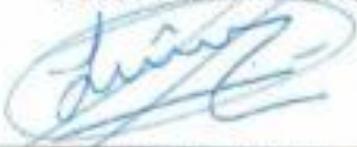
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



APLICACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS COMO INDUCTORES DE TOLERANCIA
AL ESTRÉS CAUSADO POR *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN
PLANTAS DE TOMATE

Tesis

Que presenta WILLIAM ZÁRATE MARTÍNEZ
como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN AGRICULTURA PROTEGIDA



Dr. Antonio Juárez Maldonado
Director UAAAN



Dra. América Berenice Morales Díaz
Director Externo

Saltillo, Coahuila

Junio 2018

APLICACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS COMO INDUCTORES DE TOLERANCIA
AL ESTRÉS CAUSADO POR *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN
PLANTAS DE TOMATE

Tesis

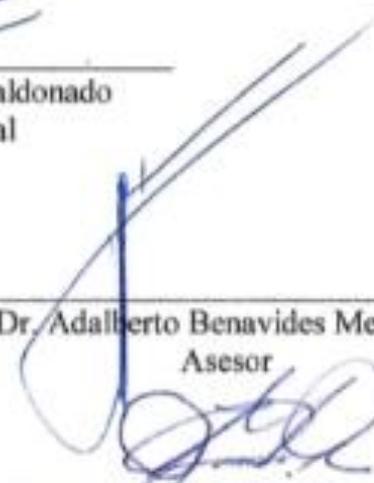
Elaborados por WILLIAM ZÁRATE MARTÍNEZ como requisito parcial para obtener
el grado de Doctor en Ciencias en Agricultura Protegida con la supervisión y aprobación
del Comité de Asesoría



Dr. Antonio Juárez Maldonado
Asesor Principal



Dra. Susana González Morales
Asesor



Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor

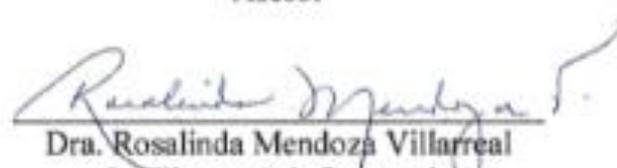


Dr. Armando Robledo Olivo
Asesor

Dra. Francisca Ramírez Godina
Asesor



Dra. América Berenice Morales Díaz
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirectora de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado mediante su programa de becas de posgrado.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) y al programa de Doctorado en Ciencias en Agricultura Protegida por darme la oportunidad de realizar mis estudios de postgrado.

Al Dr. Antonio Juárez Maldonado por la oportunidad de realizar esta investigación, por su tiempo, conocimientos compartidos y apoyo total en la dirección de este proyecto.

A la Dra. Susana González Morales por su apoyo incondicional en la dirección de esta investigación, por sus sugerencias, tiempo y apoyo brindado.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza por sus su tiempo y apoyo brindado para realizar este proyecto de investigación.

A la Dra. Francisca Ramírez Godina por su apoyo para la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Armando Robledo Olivo por su valioso tiempo y apoyo brindado.

A la Dra. América Berenice Morales Díaz por sus comentarios acertados, tiempo brindado y recomendaciones para la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Fabián Pérez Labrada, a la Dra. Mari Carmen López Pérez, a la Ing. Claudia Ariana Pliego Zuñiga y a la MC. Karina Moreno León por su gran apoyo en la realización de este trabajo.

A todas las personas que directa o indirectamente participaron en este trabajo.

DEDICATORIA

Al gran amor de mi vida, Karina, por caminar a mi lado con dirección a la conquista de nuestros sueños. Eres mi gran apoyo, no sé qué haría sin ti, te dedico este trabajo porque sin tu ayuda no lo hubiera logrado, no estaría aquí.

Por ser una gran madre para mis hijas.

A mis dos pequeñas princesas Frida y Alondra, son ustedes mi gran inspiración, mi energía, mi motivación, por sus sonrisas, abrazos, por la enorme felicidad que nos han regalado y sus interminables ocurrencias. Nos han contagiado de su felicidad infinita, de su alegría inagotable que saben obtener de los pequeños detalles de la vida.

A ustedes les dedico todo.

A mi hermosa madre, que con gran cariño y esmero se ha esforzado por darme lo mejor, por siempre creer en mí y ofrecerme su apoyo incondicional.

A mi padre por ser un gran ejemplo para mí, por nunca rendirse y ser una fuente inagotable de ideas.

A mis hermanas Keyla y Marlen por ser las mejores hermanas del mundo, que a pesar de la distancia nuestros corazones están unidos.

CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULOS

Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con *Clavibacter michiganensis*

William Zárate-Martínez

Susana González-Morales

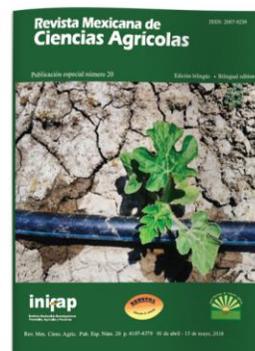
Francisca Ramírez-Godina

Armando Robledo-Olivo

Antonio Juárez-Maldonado

DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.1005>

Palabras clave: cambios histológicos, estomas, incidencia, severidad.



Resumen

Con el objetivo de evaluar el efecto de aplicaciones exógenas de ácidos fenólicos en el cultivo de tomate, se establecieron cuatro tratamientos: 1) un testigo absoluto; 2) plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subesp. *Michiganensis* (Cmm); 3) plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subesp. *michiganensis* y con aplicación de ácidos fenólicos; y 4) plantas solo con aplicación de ácidos fenólicos. Las aplicaciones se realizaron con intervalos de una semana hasta acumular un total de 10 aplicaciones durante el ciclo de cultivo. Los resultados indican que la aplicación de ácidos fenólicos no promovió efectos en las variables agronómicas del cultivo, sin embargo, si se

PDF

PDF (English)

Publicado

2018-03-22

Cómo citar

Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. (2018). Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con *Clavibacter michiganensis*. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, (20).

observó una disminución significativa en severidad de Cmm. Además, se demostró que la aplicación de ácidos fenólicos modifica la densidad e índice estomático y en combinación con estrés biótico induce un menor tamaño de estomas. En las variables histológicas se encontró que con la aplicación de ácidos fenólicos el parénquima empalizada disminuyó su longitud, también indujo un menor número y área de vasos de xilema en hoja y raíz respectivamente y una mayor longitud de córtex en la raíz. Los resultados demostraron que la aplicación de ácidos fenólicos puede ser una alternativa viable para el control de Cmm.

<https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.1005>

Formatos de citación

Número

[Núm. 20 \(2018\); Especial](#)

Sección

Artículos



Esta obra está bajo licencia internacional [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0](#).

Los autores(as) que publiquen en **Revista**

CARTA DE RECEPCIÓN DE ARTÍCULOS

13/6/2018

Gmail - Submission Confirmation for Efecto de los ácidos fenólicos en la actividad enzimática y compuestos antioxidantes en plantas de ...



Antonio Juárez Maldonado <juma841025@gmail.com>

Submission Confirmation for Efecto de los ácidos fenólicos en la actividad enzimática y compuestos antioxidantes en plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter michiganensis*

1 mensaje

RCHSH <em@editorialmanager.com>

13 de junio de 2018, 9:41

Responder a: RCHSH <chapingo.horticultura@gmail.com>

Para: Antonio Juarez-Maldonado <juma841025@gmail.com>

Dear Dr. Juarez-Maldonado,

Your submission entitled "Efecto de los ácidos fenólicos en la actividad enzimática y compuestos antioxidantes en plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter michiganensis*" has been received by Revista Chapingo Serie Horticultura.

You will be able to check on the evaluation progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author (Author Login). The URL is <https://rchsh.editorialmanager.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once the technical check has been approved.

Kind regards,

Revista Chapingo Serie Horticultura

Estimado(a) Dr. Juarez-Maldonado,

La contribución titulada "Efecto de los ácidos fenólicos en la actividad enzimática y compuestos antioxidantes en plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter michiganensis*" ha sido recibida por la Revista Chapingo Serie Horticultura.

Se podrá seguir el proceso de evaluación de éste al ingresar a Editorial Manager en la URL: <https://rchsh.editorialmanager.com/> como autor (Author Login).

A su escrito se le asignará un número de referencia, una vez que la revisión técnica haya sido aprobada.

Si tiene alguna duda con el uso de Editorial Manager, enviar un correo a rchsh.editor@gmail.com o comuníquese al teléfono +52 (595) 9521500 extensión 5912 con el Ing. Oscar Martínez.

Saludos Cordiales,

Revista Chapingo Serie Horticultura

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
Cultivo de Tomate.....	3
Metabolitos secundarios	4
Compuestos fenólicos.....	5
Actividades de los compuestos fenólicos	6
Clasificación	8
Funciones.....	9
PRIMER ARTÍCULO.....	11
Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) inoculadas con <i>Clavibacter michiganensis</i>	11
SEGUNDO ARTÍCULO	25
Aplicación de ácidos fenólicos y su efecto en actividad enzimática en plantas de tomate	25
CONCLUSIONES GENERALES	54
REFERENCIAS	55

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) es un cultivo de importancia económica que podemos encontrar en todo el mundo, en términos económicos representa el 72% del valor de la producción de hortalizas frescas en todo el mundo (Hanssen *et al.*, 2010). Es importante mencionar que en todos los sistemas de producción hay condiciones de estrés biótico y abiótico que afectan la producción y calidad de este cultivo (Kun, 2016). Ejemplo de estrés biótico tenemos a los patógenos bacterianos que reducen el rendimiento de las plantas, particularmente, la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causa la “marchitez” y “chancro bacteriano”, las dos enfermedades más importantes en tomate (Gartemann *et al.*, 2003). Este patógeno se encuentra en todas las zonas productoras del mundo, y es considerada como severa (Chang *et al.*, 1991). Prueba de esto es que se han reportado epidemias de Cmm en el cultivo de tomate en todo el mundo ocasionando daños que van del 1 al 100% (Jones *et al.*, 2004; Rueda-Barrientos *et al.*, 2017).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un indicador de estrés celular, ya que ante estas condiciones la producción de estas ROS en la planta es inevitable (Mittler *et al.*, 2004). Cuando la cantidad de estas especies es mayor que la capacidad antioxidante ocurre un daño celular en las plantas (Michalak, 2006). Ante esta situación, el metabolismo de las plantas debe modificarse y producir los compuestos necesarios para hacer frente al estrés, mecanismo conocido generalmente como aclimatación (Atkinson *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2012).

De forma natural y ante diversas condiciones todas las plantas sintetizan una gran cantidad de compuestos orgánicos, entre los más importantes se encuentran los metabolitos primarios y secundarios (Harman *et al.*, 2004; Nawrocka y Malolepsza, 2013; Baraldi, 2017). Los metabolitos primarios participan y son esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas, mientras que los metabolitos secundarios están involucrados en los sistemas de defensa y en procesos de respuestas a estrés biótico y abiótico (Bellaloui, 2012; Neilson, 2013). Los compuestos fenólicos (CF) son una clase de metabolitos secundarios, cuya síntesis se da en las plantas como mecanismo de defensa ante condiciones de estrés (Muñoz, *et al.*, 2007; Cervilla *et al.*, 2012). Dentro de la

clasificación de los CF se encuentran los Ácidos Fenólicos (AF), ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal con propiedades antioxidantes, antimicrobianas entre otras (Robbins, 2003; Xu *et al.*, 2008).

Se ha reportado que algunos metabolitos secundarios de bajo peso molecular, específicamente CF, pueden inhibir el crecimiento de *Xylella fastidiosa* (bacteria fitopatógena de muchas especies de cultivo) en condiciones *in vitro* (Maddox *et al.*, 2010); en este mismo sentido los CF (ácido p-coumarico y kaempferol) presentes en los extractos de la cáscara de una mezcla de tres cultivares chilenos de *Vitis vinífera*, han sido reportados con potencial contra *Botrytis cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013). También el resveratrol, el ácido gálico y el ácido ferúlico se han reportado contra *Botrytis cinérea* con buenos resultados (Apolonio-Rodríguez, 2017).

Esto demuestra que los CF pueden ser una alternativa para el manejo de fitopatógenos, por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la aplicación foliar de ácidos fenólicos a plantas de tomate y determinar si estos compuestos intervienen en los mecanismos de defensa pasiva y activa bajo condiciones de estrés biótico, condición que se consiguió con la inoculación del patógeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

REVISION DE LITERATURA

Cultivo de Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) pertenece a la familia *Solanaceae*, es considerado uno de los principales cultivos a nivel mundial, debido a su elevado potencial alimenticio (Saleem *et al.*, 2015). Es una rica fuente de licopeno, carotenoides, ácido ascórbico, vitamina A, vitamina E, folato, flavonoides y potasio (Willcox *et al.*, 2003); y la demanda de esta hortaliza aumenta de forma permanente (Ortega-Martínez *et al.*, 2010).

En México la superficie destinada a la producción de tomate es de 21.5 millones de ha, lo que representa 587 mil millones de pesos como valor de producción (SIAP, 2017). Ante este panorama y debido a la importancia de este y otros cultivo en México, la tecnificación de los sistemas de producción ha ido en aumento, la superficie destinada a la agricultura protegida pasó de 3 200 ha en 2005 (Ocaña-Romo, 2008) a 40 862 ha en el 2016 y el 44.8 % de esta superficie está destinada para la producción de tomates (SIAP, 2016).

Constantemente las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Croteau *et al.*, 2000). El estrés abiótico incluyen factores como: altos o bajos niveles de luz, radiación ultravioleta A y B (UV-A y UV-B), altas y bajas temperaturas, sequía, inundaciones, acumulación de metales y salinidad en los suelos, deficiencia y/o toxicidad por nutrimentos (Ahmad y Prasad, 2012). Las plantas al ser organismos inmóviles, para sobrevivir tienen que adaptarse a los factores que derivan en el estrés (Pereira, 2016).

El estrés biótico está representado, por organismos heterótrofos, que dependen totalmente de la energía fijada por las plantas, representan una amenaza constante en la producción de tomate, principalmente para aquellos productores que cultivan a campo abierto (Cih-Dzul *et al.*, 2011). Entre los factores bióticos se encuentran virus, bacterias, hongos y nematodos que causan enfermedades devastadoras provocando grandes pérdidas económicas en el cultivo de tomate (Arshad *et al.*, 2014). Particularmente las enfermedades bacterianas son un problema de gran relevancia en la producción tanto en invernadero como a campo abierto (Balestra *et al.*, 2009). La bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que causa el cáncer bacteriano afecta grandemente el cultivo de tomate (Cooksey, 1990; Hadas *et al.*, 2005 y Yuliar *et al.*, 2015), además se encuentra en todas las zonas productoras del mundo, y es considerada como severa, prueba

de esto es que se han reportado epidemias de Cmm en el cultivo de jitomate en diversos países como Israel, Japón, España y México, y ocasionando pérdidas de 80 a 100% (EPPO, 2010 y De León *et al.*, 2011).

Ante estas condiciones deben emplear ciertas estrategias de defensa, basadas en la gran diversidad química existente en ellas, entre estos compuestos se encuentran algunos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana o actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000). Uno de los métodos potenciales para reducir la severidad de las enfermedades causadas por patógenos, es la inducción de resistencia en la planta (Baysal *et al.*, 2003). Dicha actividad está asociada a numerosas respuestas de defensa activadas por el hospedero una vez que hace contacto con el patógeno (Flores *et al.*, 2009) o con algún inductor biótico o abiótico (Valueva y Mosolov, 2004).

Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos de bajo peso molecular que además de participar en la adaptación de las plantas a su medio ambiente, se sintetizan cuando las plantas son expuestas a condiciones de estrés ya sea biótico o abiótico (Sepúlveda-Jiménez, 2003).

Se conocen más de 20 000 estructuras de metabolitos secundarios, y una gran variedad estructural dentro de este grupo, esta variedad que se debe a modificaciones químicas a su estructura básica, las cuales se dan por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Croteau *et al.*, 2000).

Los precursores en la biosíntesis de MS derivan del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del ácido shikimato. La síntesis de estos metabolitos se puede llevar de forma específica o en todos los órganos y tejidos de las plantas, lo cual depende del nivel de desarrollo de la planta y condiciones de estrés abiótico o biótico. Se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis y su distribución es por xilema o floema.

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (CF) son metabolitos secundarios sintetizados por las rutas metabólicas Shikimato/fenilpropanoide o acetato-malonato/policétida (Quideau, 2011); al igual que la mayoría de los metabolitos secundarios, los CF son la primer línea de defensa de las plantas (Gülçin *et al.*, 2003); cuya principal tarea de los (CF) es proteger contra el estrés o ataque de patógenos, se caracterizan por tener al menos un anillo de benceno aromático (C₆), con sistema conjugado aromático, unido a uno o más grupos hidroxilo libre o sustituido, con una gran diversidad de funciones y estructuras (Cheynier, 2012). Las condiciones de estrés biótico o abiótico juegan un papel importante en la concentración de los CF debido a que bajo condiciones de estrés la concentración de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) incrementa, enzima clave en la ruta primaria (shikimate) y secundaria (phenyl-propanoid), rutas en donde se realiza la biosíntesis de compuestos fenólicos (Dixon y Paiva, 1995).

Los CF tienden a almacenarse en sitios estratégicos, donde desempeñan un papel de señalización o un papel directo en la defensa. Por lo regular se acumulan en las vacuolas centrales de las células protectoras y de las células epidérmicas, también las podemos encontrar en las células subepidérmicas de las hojas y los brotes. Algunos CF se encuentran unidos covalentemente a la pared celular de las plantas y se pueden dividir en dos clases:

- a) Compuestos fenólicos preformados: se sintetizan durante el desarrollo normal de los tejidos de la planta.
- b) Compuestos fenólicos inducidos: son sintetizados por las plantas en respuesta a lesiones físicas, infecciones o ante estrés por elicitores como sales de metales pesados, radiación UV, temperatura, etc. (Dixon *et al.*, 2002; Winkel-Shirley, 2002).

Los CF se producen en las plantas mediante la acción secuencial de cinco vías biosintéticas. Las vías glucolítica y de pentosa fosfato proporcionan precursores (fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato, respectivamente) a la vía del shikimato. La fenilalanina, producida por la vía del shikimato, es el precursor del metabolismo de los fenilpropanoides que, a su vez, alimenta las diversas vías específicas de los flavonoides (Winkel-Shirley, 2001; Austin *et al.*, 2003; Cheynier *et al.*, 2013).

Actividades de los compuestos fenólicos

Con la aplicación de algunos compuestos fenólicos se pueden activar procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas y de esta forma evitar o reducir el progreso de alguna enfermedad, es importante señalar que el nivel de resistencia a una enfermedad dependerá mucho de la edad fisiológica de la planta o la madurez de los tejidos. Los CF actúan también ante algunas condiciones ambientales, las cuales, se enlistan a continuación.

Radiación UV: Las plantas están expuestas a radiación ultravioleta-B (UV-B) la cual se encuentra en el rango de 280-315 nm, esta radiación afecta negativamente al ADN, proteínas y membranas, lo que origina alteración en el metabolismo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las plantas para protegerse de los efectos dañinos de la radiación UV-B sintetizan compuestos fenólicos, los cuales actúan como una pantalla dentro de la capa de células epidérmicas, ajustando los sistemas antioxidantes a nivel celular y del organismo completo, mediante este mecanismo, los CF evitan tanto la mutagénesis como la muerte celular por dimerización de unidades de timina en el ADN, que muestra un máximo de absorción a 260 nm y posible fotodestrucción de las coenzimas NAD o NADP, que tienen un máximo de 260 nm (Winkel-Shirley, 2002; Carletti *et al.*, 2003).

Los flavonoides por su alta capacidad de absorción a 250-270 y 335-360 nm actúan como buenas pantallas UV. Varios estudios han demostrado el cambio en la composición de flavonoides de las hojas de las plantas debido a un exceso de luz o radiación UV. La activación de los genes biosintéticos de flavonoides mediante radiación UV se ha demostrado en una serie de estudios (Tattini *et al.*, 2000). Los efectos más comunes de la radiación UV-B son la reducción del crecimiento de las plantas y el aumento de las cantidades de compuestos fenólicos en los tejidos vegetales (Caldwell *et al.*, 2003).

Un incremento de compuestos fenólicos en las células epidérmicas obstaculiza la penetración de UV-B, protegiendo así los tejidos fotosintéticamente activos (Mazza *et al.*, 2000).

Métales pesados: Los metales pueden causar estrés oxidativo en las plantas y promover la producción de radicales hidroxilo. Algunos metales pesados como el cobre y el cadmio pueden activar diversas reacciones como alterar la actividad redox celular y con esto

reducir el crecimiento de las plantas, la estimulación del metabolismo secundario y la deposición de lignina. Por citar un ejemplo Kisa *et al.* (2016) encontraron una mayor concentración de compuestos fenólicos totales en hojas de plantas de maíz expuestas a diversas dosis de metales pesados (Cd, Cu y Pb).

Altas temperaturas: Las plantas de tomate pueden desarrollar un mecanismo de aclimatación ante el estrés térmico (35 °C), uno de estos mecanismo consiste en la acumulación de compuestos fenólicos como una posible forma de adaptación a las altas temperaturas (Rivero *et al.*, 2001). Es importante mencionar que en hojas de plantas vasculares se pueden encontrar distintas clases de compuestos fenólicos tales como ésteres, amidas y glucósidos de ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, proantocianidinas, además de los compuestos fenólicos poliméricos, como la lignina, la suberina y la melanina. (Lattanzio *et al.*, 2008).

Nutrición mineral: Tanto el metabolismo primario como el secundario de las plantas están influenciados por la nutrición mineral. En la mayoría de los ecosistemas terrestres, el crecimiento de la planta está limitado por el nitrógeno (N), aunque también con frecuencia se puede mencionar al fósforo (P), en estas condiciones, se encuentra mayor concentraciones de CF en tejidos de especies de baja productividad que crecen en estos sitios infértiles (Scheible *et al.*, 2004). Las especies que crecen en suelos pobres a menudo tienen características que conducen a una alta retención de nutrientes y altos niveles de metabolitos secundarios, evidenciando de esta forma que los CF no solo tienen un papel de defensa contra herbívoros y patógenos (Lillo *et al.*, 2008); ya que las plantas que crecen en suelos con deficiencias de elementos esenciales como nitrógeno, fósforo y potasio pueden aumentar las concentración de CF en los tejidos vegetales, como reservas existentes o induciendo a la síntesis de estos (Glynn *et al.*, 2007 y Kováčik *et al.*, 2007). Por citar algunos ejemplos las plantas de cebada cultivadas bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno mostraron una menor biomasa, mientras que los niveles foliares de compuestos fenólicos solubles aumentaron (Mercure *et al.*, 2004). En monocotiledóneas y dicotiledóneas no gramíneas, la deficiencia de hierro indujo una mayor cantidad de ácidos fenólicos en los exudados de las raíces (Vigani *et al.*, 2013).

Bajas temperaturas: Las bajas temperaturas son otro estrés abiótico importante para las plantas, pueden alterar con efectos nocivos, la estructura de la membrana, debido a una

producción excesiva de ROS y finalmente alterar la actividad de las enzimas que están unidas a la membrana. Ante esta situación algunas plantas pueden adaptarse modificando la composición de su membrana y activando los sistemas de eliminación de oxígeno (Airaki *et al.*, 2012). Se ha reportado que las bajas temperaturas intervienen en el aumento de la producción de compuestos fenólicos, que ejercen actividad antioxidante en los tejidos, también se observa una mejora del metabolismo fenilpropanoide en los tejidos vegetales (Lattanzio *et al.*, 2008).

El estrés por baja temperatura, sin llegar a la congelación, induce un aumento en las actividades de fenilalanina amoniaco-liasa y chalcona sintasa, la activación de varios genes implicados en el metabolismo fenólico o la acumulación de antocianinas en las hojas y tallos de algunas especies como *Arabidopsis thaliana* (Stefanowska *et al.*, 2002).

Clasificación

Los grupos más importantes de compuestos fenólicos son los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles, siendo los flavonoides los más estudiados, aunque por sus características estructurales se pueden dividir en varios subgrupos hay quienes también los clasifican en tres subgrupos debido a ser los CF más abundantes en las plantas. A continuación se describe a los tres subgrupos principales: ácidos fenólicos, flavonoides y no flavonoides (Tsao, 2010).

Flavonoides: Los flavonoides, se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas, están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C) y tienen la siguiente estructura en común (difenilpiranos) C6-C3-C6 (Andersen y Markham, 2006). Debido a las variaciones del pirano se pueden clasificar como antocianidinas, flavanos, flavonas y flavonoles (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). La síntesis de los flavonoides tiene lugar en las plantas a partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina, posteriormente estas dos últimas, dan lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico; al condensarse con las unidades de acetato dan origen a la estructura cinamol de los flavonoides. Más tarde se forman los derivados glicosilados o sulfatados (Grotewold, 2006).

Ácidos fenólicos: Los ácidos fenólicos (AF) son un grupo importante de compuestos que se encuentran en forma libre o conjugada. En frutas y hortalizas están principalmente en forma libre (Shahidi y Naczk, 2004), y en los cereales predominan en forma conjugada o ligada (Liu, 2007). Son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, tienen solo un anillo fenólico y se clasifican en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos, basados en la cadena principal C1-C6 o C3-C6 (Robbins 2003, Stalikas, 2007). Los compuestos fenólicos más abundantes en los cereales son los ácidos hidroxicinámicos, siendo el ácido ferúlico el principal, seguido por los ácidos diferúlicos y cumárico, también se ha reportado que el 90 % del ácido ferúlico presente en los cereales se encuentra unido a arabinosilanos (AX) por medio de enlaces éster y el resto en forma libre (Scalbert y Williamson, 2000, Naczk y Shahidi, 2006). El 98 % del total de ácido ferúlico se encuentra distribuido en los tejidos externos de los cereales, siendo la capa aleurona y el pericarpio externo los principales (Manach *et al.*, 2004, Vitaglione *et al.*, 2008).

Una de las principales propiedades biológicas de los CF es su alta actividad antioxidante, la cual se debe a la estructura química que tiene, un núcleo fenólico y una cadena lateral insaturada, que les permite formar un radical fenoxilo estabilizado por resonancia, con actividad como agente secuestrador de radicales libres (Srinivasan *et al.*, 2007, Adalakun *et al.*, 2012).

En el caso específico de los ácidos fenólicos se producen en plantas a través del ácido shikímico a través de la ruta fenilpropanoidea, como subproductos de la vía del monolignol y como productos de descomposición de la lignina y polímeros de la pared celular en plantas vasculares (Carpita, *et al.*, 2000; Croteau, *et al.*, 2000).

No flavonoides: Los no flavonoides, son moléculas que poseen anillos fenólicos con diferentes grupos funcionales (nitrosilo, hidroxilo, etc.), que comprenden estilbenos, alcoholes fenólicos, lignanos y chalconas (Vitaglione *et al.*, 2008).

Funciones

El estrés biótico puede inducir estrés oxidativo en las plantas, el sistema de defensa antioxidante es el principal mecanismo para la eliminación de ROS. Este sistema incluye la producción de compuestos enzimáticos como catalasa, peroxidasa, ascorbato

peroxidasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa, así como compuestos no enzimáticos como ascorbato, glutatión, flavonoides, compuestos fenólicos, tocoferol y carotenoides (Schützendübel y Polle 2002; Mittler *et al.*, 2004; Gratao *et al.* 2005).

Los CF, pueden inhibir el crecimiento de *Xylella fastidiosa* (bacteria fitopatógena de muchas especies de cultivo) en condiciones in vitro (Maddox *et al.*, 2010). El ácido p-coumarico y kaempferol presentes en los extractos de la cáscara de una mezcla de tres cultivares chilenos de *Vitis vinífera*, han sido reportados con potencial contra *Botrytis cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013). También el resveratrol, el ácido gálico y el ácido ferúlico se han reportado contra *Botrytis cinérea* con buenos resultados (Apolonio-Rodríguez, 2017).

Con estos reportes podemos pesar que los CF son una alternativa para el manejo de fitopatógenos, por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la aplicación foliar de ácidos fenólicos a plantas de tomate, interviene en los mecanismos de defensa pasiva y activa bajo condiciones de estrés biótico.

PRIMER ARTÍCULO

**Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)
inoculadas con *Clavibacter michiganensis***

Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con *Clavibacter michiganensis*

William Zárate-Martínez¹
Susana González-Morales²
Francisca Ramírez-Godina³
Armando Robledo-Olivo⁴
Antonio Juárez-Maldonado^{5§}

¹Departamento de Horticultura-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. ²Cátedras CONACyT-Departamento de Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. ³Departamento de Fitomejoramiento-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. ⁴Departamento de Alimentos-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. ⁵Departamento de Botánica-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

§Autor para correspondencia: juma841025@hotmail.com.

Resumen

Con el objetivo de evaluar el efecto de aplicaciones exógenas de ácidos fenólicos en el cultivo de tomate, se establecieron cuatro tratamientos: 1) un testigo absoluto; 2) plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subesp. *Michiganensis* (Cmm); 3) plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subesp. *michiganensis* y con aplicación de ácidos fenólicos; y 4) plantas solo con aplicación de ácidos fenólicos. Las aplicaciones se realizaron con intervalos de una semana hasta acumular un total de 10 aplicaciones durante el ciclo de cultivo. Los resultados indican que la aplicación de ácidos fenólicos no promovió efectos en las variables agronómicas del cultivo; sin embargo, si se observó una disminución significativa en severidad de Cmm. Además, se demostró que la aplicación de ácidos fenólicos modifica la densidad e índice estomático y en combinación con estrés biótico induce un menor tamaño de estomas. En las variables histológicas se encontró que con la aplicación de ácidos fenólicos el parénquima empalizada disminuyó su longitud, también indujo un menor número y área de vasos de xilema en hoja y raíz respectivamente y una mayor longitud de córtex en la raíz. Los resultados demostraron que la aplicación de ácidos fenólicos puede ser una alternativa viable para el control de Cmm.

Palabras clave: cambios histológicos, estomas, incidencia, severidad.

Recibido: enero de 2018

Aceptado: marzo de 2018

Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un cultivo que en términos económicos representa 72% del valor de la producción de hortalizas frescas en todo el mundo (Hanssen *et al.*, 2010). Es de las hortalizas más cultivadas y de mayor valor económico a nivel mundial ya que su demanda se incrementa de forma permanente (Ortega-Martínez *et al.*, 2010). Sin embargo, el desarrollo de este cultivo se puede ver afectado por diferentes factores que pueden ser bióticos o abióticos. Entre los factores bióticos se encuentran virus, bacterias, hongos y nematodos que causan enfermedades devastadoras provocando grandes pérdidas económicas en el cultivo de tomate (Arshad *et al.*, 2014).

Particularmente las enfermedades bacterianas son un problema de gran relevancia en la producción tanto en invernadero como a campo abierto (Balestra *et al.*, 2009). La bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) que causa el cáncer bacteriano afecta considerablemente el cultivo de tomate (Cooksey, 1990; Hadas *et al.*, 2005; Yuliar *et al.*, 2015), además que está presente en todas las zonas productoras del mundo, y es considerada como severa (Chang *et al.*, 1991). Se han reportado epidemias de Cmm en el cultivo de tomate en diversos países como Israel, Japón, España y México, ocasionando pérdidas en la producción entre 80 a 100% (Borboa-Flores *et al.*, 2009; EPPO, 2010; De León *et al.*, 2011). Esto origina una necesidad de disminuir las afectaciones causadas por los patógenos que aunado al interés de aumentar la productividad y la calidad agrícola, ha llevado a un uso excesivo de productos químicos, creando problemas como la contaminación ambiental (Arredondo, 2017).

Por su parte, las plantas han generado mecanismos de defensa que les permitan tolerar los daños causados por patógenos (Harman *et al.*, 2004; Nawrocka y Malolepsza, 2013). Uno de estos mecanismos es la defensa sistémica que incluye la generación de metabolitos secundarios, que son compuestos que no presentan una función aparente dentro del metabolismo primario, pero que poseen un papel importante en las interacciones bióticas como la defensa química contra herbívoros y patógenos (Neilson, 2013).

Los compuestos fenólicos son necesarios para la supervivencia de las plantas ante situaciones de estrés impuestas por factores tanto bióticos como abióticos (Broun, 2005; do Nascimento, 2010). Se sabe que los compuestos fenólicos tienen funciones protectoras contra los microorganismos patógenos (Osorio *et al.*, 2010). Existen reportes sobre el uso de compuestos fenólicos como inhibidores de distintos patógenos; por ejemplo, Mendoza (2013) reporta el potencial de estos compuestos contra *Botrytis cinerea*. De la misma manera compuestos aislados de *Veratrum album*, se reportaron como compuestos activos contra los hongos *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* y *B. cinerea* en el cultivo de la vid (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011; Adrian y Jeandet, 2012; Wu *et al.*, 2013).

Esto demuestra que los compuestos fenólicos pueden ser una alternativa potencial al control químico para el manejo de las bacterias fitopatógenas, además de que el desarrollo de antibacterianos naturales ayudará a disminuir los efectos negativos del control químico (Riviera *et al.*, 2014) lo que impactará positivamente al ambiente.

El objetivo del trabajo consistió en evaluar la aplicación foliar de ácidos fenólicos en el cultivo de tomate y su efecto sobre la tolerancia a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, así como determinar los cambios en las características agronómicas, fisiológicas e histológicas.

Materiales y métodos

Establecimiento del cultivo

El cultivo se estableció en un invernadero tipo tunel con dimensiones de 20 x 8 m con 30% de sombreado del Departamento de Horticultura, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se usó semilla de tomate de la variedad "Rio Grande" tipo saladete y de crecimiento determinado. Se trasplantó en bolsas de polietileno color negro con capacidad de 10 litros. Como sustrato se usó una mezcla de perlita:peat moss relación 1:1 (v:v). El cultivo se manejó a un solo tallo con la ayuda de tutores. La nutrición fue administrada a través de un sistema de riego dirigido usando la solución Steiner (Steiner, 1961), la cual fue aplicada a distintas concentraciones: 25% en etapa vegetativa, 50% en floración, 75% en amarre de frutos, y 100% en llenado y cosecha de fruto.

Aplicación de tratamientos

Los tratamientos consistieron en la aplicación de ácidos fenólicos usando como fuente el producto Defense Gr[®] (10 000 ppm ácidos fenólicos en forma de granulo soluble). Se aplicaron en total cuatro tratamientos que se describen a continuación: 1) un testigo absoluto (T0); 2) plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm); 3) plantas inoculadas con Cmm y aplicación de ácidos fenólicos (Cmm+AF); y 4) plantas solo con aplicación de ácidos fenólicos (AF).

Las aplicaciones de los ácidos fenólicos fueron a una dosis de 1 kg ha⁻¹, iniciando siete días después del trasplante (DDT), se realizaron un total de 10 aplicaciones durante el ciclo de cultivo cada siete días.

Inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

La bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se aisló de plantas de tomate con síntomas atribuibles a ésta. Se obtuvo savia de las plantas colectadas mediante un macerado en mortero de porcelana. La savia fue sembrada en cajas Petri con medio de cultivo NBY y se incubaron a 29 °C por 48 h. Posteriormente la savia fue resembrada para obtener su purificación. A las colonias obtenidas se les realizó pruebas morfológicas y bioquímicas para su identificación.

La bacteria se incrementó en cajas Petri con medio de cultivo NBY (Caldo nutritivo 0.8%, extracto de levadura 0.2%, K₂HPO₄ 0.2 %, KH₂PO₄ 0.025%, agar 1.5%) (Borboa, 2009). Las cajas Petri se incubaron a 28 °C por 48 h, posteriormente se realizó un lavado del crecimiento bacteriano ajustando a la concentración y volumen requerido, esto se realizó en el Laboratorio de Fisiología del Departamento de Horticultura.

Las plantas correspondientes a los tratamientos con estrés biótico fueron inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) a los 21 DDT, y usando una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. Para la inoculación de las plantas de tomate con Cmm se realizaron cortes en las hojas y fueron sumergidas en 30 mL de solución bacteriana por 5 min, el sobrante se asperjó al follaje.

Análisis agronómicos

Para determinar el efecto en el vigor de las plantas de tomate se estudiaron las siguientes variables agronómicas: altura de planta (AP), número de hojas (NH), diámetro de tallo (DT), número de hojas (NH), número de racimos (R) a los 75 días después del trasplante (DDT), peso fresco parte aérea (PFPA) y peso fresco raíz (PFR) a los 85 DDT. Después de secar en horno de secado a temperatura constante de 80 °C durante 72 h se obtuvo el peso seco parte aérea (PSPA) y el peso seco raíz (PSR). Además, se cuantificó el número de frutos cosechados (NFC) y peso de frutos cosechados (PFC) por planta.

Análisis en hojas y frutos

En las hojas se midieron las unidades SPAD (US) en tres ocasiones a lo largo del cultivo, a los 30, 75 y 105 DDT, para lo que se utilizó un medidor de clorofila SPAD (Minolta 502). La medición se realizó en la primera hoja fisiológicamente madura. Se determinó también el contenido de vitamina C (VC) por el método de titulación con 2,6 diclorofenolindofenol (Padayatt *et al.*, 2001). Los resultados se expresan en mg/100 g peso fresco.

Para estas variables evaluadas en fruto se tomaron un total de cinco tomates por tratamiento, con un grado de madurez 5 (Light red): color rojo a rosado entre 60-90% del fruto, según la carta de colores propuesta por Boyette (1997) con escala de 1-6 (1) Green, 2) Breakers, 3) Turning, 4) Pink, 5) Light red y 5) Red). En estos frutos se determinaron los sólidos solubles totales (SST) con un refractómetro manual Atago (Master-T) y la acidez titulable (AT) se determinó de acuerdo a la metodología de la AOAC (2000). La conductividad eléctrica (CE) se obtuvo con un potenciómetro HI 98130 (Hanna Instruments) y la medición se realizó en 10 g de fruto completamente macerado.

La firmeza (F) (kg cm^2) se determinó con un penetrómetro manual FDK-20 (Wagner Instruments), para esto se tomaron tres mediciones por fruto. El índice de madurez (IM) se calculó mediante la relación sólidos solubles totales/acidez titulable (Casierra-Posada, 2008). El contenido de Licopeno (L) se determinó mediante la metodología de Fish *et al.*, (2002). El potencial de hidrógeno (pH) se determinó con un potenciómetro HI 98130 (Hanna Instruments) en 10 g de fruto completamente macerado. El contenido de vitamina C (VC) se determinó por el método de titulación con 2,6 diclorofenolindofenol (Padayatt *et al.*, 2001). El diámetro ecuatorial (DE) y diámetro polar (DP) se determinaron con un vernier digital. Estas variables fueron determinadas en el Laboratorio de Fisiología del Departamento de Horticultura.

Incidencia y severidad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

La incidencia de Cmm se determinó a los 30, 45, 60, 75, 90 Días después de inoculación (DDI) y se expresó como el porcentaje de plantas que presentaron síntomas (Anfoka, 2000). Mientras que para medir la severidad se utilizó la escala visual de Baysal *et al.* (2003). Esta escala tiene valores

de 0-5: (0: las hojas no muestran signos de marchitez; 1: 1-10% de las hojas presentan marchitez marginal leve; 2: 11-25% de las hojas marchitas; 3: 26-49% de las hojas presentan marchitez asociada con clorosis, el marchitamiento en forma sectorizada; 4: 50-74% de las hojas presentan marchitez, excesiva caída de hojas; y 5: todas las hojas marchitas). Por su parte, el índice de severidad se calculó mediante la fórmula descrita por Raupach *et al.*, (1996) como sigue:

$$IS = [\sum(NC \times NPC) \times 100\%] / (NTP \times CMA)$$

Donde: IS= índice de severidad; NC= número de clasificación; NPC= número de plantas en la clasificación; NTP= número total de plantas; CMA= clasificación más alta.

Análisis de estomas

Para determinar cambios en lo estomas se realizó un muestreo a los 75 DDT, donde se utilizaron seis plantas por tratamiento. Se tomó por planta una hoja madura totalmente expandida de la y con la misma orientación. De la parte media de esta hoja se tomó una impresión epidérmica del haz (adaxial) y otra del envés (abaxial) utilizando poliestireno-xilol en forma líquida, el cual se aplicó sobre la superficie foliar con un pincel. Una vez que la película secó, ésta fue removida con cinta adhesiva transparente y colocada sobre un portaobjetos. Para cada impresión se observaron al azar tres campos microscópicos a 100X, en los que se determinó el número de estomas y de células epidérmicas. Se tomaron por cada impresión tres microfotografías y de cada una de estas se midió el ancho y largo (μm) de las células oclusivas de dos estomas. La densidad estomática se obtuvo de la siguiente forma:

$$DE \text{ (estomas por mm}^2\text{)} = \frac{\text{Número de estomas}}{AC}$$

Donde: AC= 0.0254 mm².

Mientras que para obtener el índice estomático se utilizó la siguiente fórmula (Wilkinson, 1979):

$$IE = \frac{\text{Número de estomas}}{(\text{células epidérmicas} + \text{número de estomas})} \times 100$$

Para tomar las fotografías se utilizó un microscopio compuesto (Carl Zeiss) con cámara digital (PixeraWinder Pro) y se procesaron en el software de medición AxionVision Rel. 4.8.

Análisis histológico

Para verificar los cambios en las estructuras de las plantas de tomate se realizó adicionalmente un análisis histológico. Para esto se realizó un muestreo de tres plantas por tratamiento a los 90 DDT, de cada planta se tomaron las siguientes estructuras: a) segmentos de tallo de 1 cm de longitud tomado a 3 cm de la base del tallo; b) raíz de 1 cm de longitud tomado a 5 cm de la base de la raíz; y c) un fragmento de foliolo de 1 cm² tomado de la parte media de la cuarta hoja. Para detener el metabolismo celular de los tejidos se realizó la fijación en FAA, el cual está compuesto como sigue: 5 ml de formaldehído al 36-40%, 90 ml de alcohol etílico al 70% y 5 ml de ácido acético glacial.

Después se deshidrataron a intervalos de una hora en alcohol al 60%, 70%, 85% y 96%, y en mezclas de alcohol absoluto-xilol en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3. Posterior a esto las muestras se incluyeron en parafina, en moldes de aluminio con las siguientes dimensiones 8.2 x 9.4 de base y 5 cm de altura. Se realizaron cortes de 20 μm de grosor con un micrótopo de rotación y se adhirieron a un portaobjetos con adhesivo de Haupt. Los tejidos se tiñeron con safranina y verde rápido (Rivero *et al.*, 2007). Para su observación se utilizó un microscopio compuesto (Carl Zeiss) con cámara digital (PixeraWinder Pro), y se tomaron microfotografías de tres campos por corte de tallo, raíz y hoja en aumentos de 10 X y 40 X. Las mediciones de las imágenes de los tejidos se realizaron con el software Axion Vision Rel 4.8.

Por su parte, la descripción de los caracteres anatómicos se hizo de acuerdo con la terminología de Evert (2006). Las variables que se determinaron fueron los siguientes: epidermis superior de hoja (ESH), epidermis inferior de hoja (EIH), parénquima empalizada de hoja (PEH), número de vasos de xilema en hoja (NVXH), córtex de raíz (CR), número de vasos de xilema en raíz (NVXR), área de vasos de xilema en raíz (AVXR), epidermis de tallo (ET), número de vasos de xilema en tallo (NVXT) y área de vasos de xilema en tallo (AVXT). Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Fitomejoramiento.

Análisis estadístico

El diseño experimental para el trabajo de campo fue de bloques completos al azar. Mientras que para el resto de los análisis se usó un diseño completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias según la prueba LSD de Fisher ($p \leq 0.05$) con el programa InfoStat versión 2016.

Resultados y discusión

En el Cuadro 1 se observan los resultados obtenidos de las variables agronómicas evaluadas. La aplicación de ácidos fenólicos con o sin estrés no provocó cambios en las variables agronómicas, ya que no se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos. Sin embargo, se observa una tendencia de menores valores en el tratamiento con estrés biótico, lo que puede ser debido a que la planta activa los mecanismos de defensa ante el estrés (Conrath, 2006) y sintetiza metabolitos secundarios lo cual se traduce en un gasto energético (Brown, 2003; Cipollini, 2003; Lattanzio *et al.*, 2013). Villanueva-Couoh (2009) observó en plantas de crisantemo asperjadas con compuestos fenólicos mayor altura, mayor diámetro de tallo y mayor producción de biomasa (San Miguel *et al.*, 2003), resultados que se muestran diferentes a los observados en este trabajo.

La aplicación foliar de compuestos fenólicos aumentó la biomasa de plantas de soya (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 1998) y el rendimiento de trigo (López-Tejeda *et al.*, 1998). Además, extiende la vida de anaquel de plátano (Srivastava y Dwivedi, 2000). En el tomatillo casi todas las variables respondieron de forma negativa con la aplicación de ácido benzoico y salicílico por lo cual no muestran un patrón de respuesta (Valdez, 2015). Estos resultados muestran que el efecto de las aplicaciones de compuestos fenólicos no siempre será positivo.

Cuadro 1. Variables agronómicas evaluadas en las plantas de tomate.

Trat	AP	NH	DT	R	PFPA	PFR	PSPA	PSR	NFC	PFC
T0	104 a	17.6 a	10.13 a	14.67 a	304.6 a	51.4 a	83.8 a	12.3 a	28 a	1461.1 a
Cmm	102.8 a	19.27 a	10.2 a	11.03 a	234 a	55.6 a	75.4 a	12.1 a	28.1 a	1633.3 a
Cmm+AF	100.4 a	18.2 a	9.87 a	16.23 a	294.7 a	62 a	82.9 a	13.9 a	27.4 a	1542.7 a
AF	98.53 a	16.87 a	10.13 a	13.73 a	275 a	57.8 a	66.9 a	12.9 a	28.6 a	1692.8 a
CV (%)	11.88	11.74	7.17	40.75	28.1	23.66	15.78	13.46	10.6	14.9

T0= testigo; Cmm= *C. michiganensis*; AF= ácidos fenólicos; AP= altura de planta (cm); NH= número de hojas; DT= diámetro de tallo (mm); R= racimos; PFPA= peso fresco parte aérea (g); PFR= peso fresco raíz (g); PSPA= peso seco parte aérea (g); PSR= peso seco raíz (g); NFC= número de frutos cosechados por planta; PFC= peso de frutos cosechados por planta (g). Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a LSD Fisher ($p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos de las mediciones realizadas en las hojas se encuentran en el Cuadro 2. En la medición de unidades SPAD que se realizó a los 30, 75 y 105 DDT no se encontró diferencia estadística por la aplicación de ácidos fenólicos. Sin embargo, el tratamiento con ácidos fenólicos (AF) indujo entre 1 a 5% más Unidades SPAD con respecto al T0, contrario a lo que pasa en el tratamiento AF+Cmm ya que presenta menores valores con respecto al T0 los cuales van de 1 a 9%.

Cuadro 2. Mediciones realizadas en las hojas de plantas de tomate.

Tratamiento	US (30 ddt)	US (75 ddt)	US (105 ddt)	VC (90 ddt)
T0	49.25 a	51.19 a	44.51 a	17.43 a
Cmm	47.15 a	47.43 a	44.75 a	17.3 a
Cmm+AF	49.29 a	46.75 a	44.37 a	15.83 a
AF	48.80 a	51.89 a	46.74 a	17.43 a
CV (%)	8.19	18.3	13.47	11.08

T0= testigo; Cmm= *C. michiganensis*; AF= ácidos fenólicos; US= unidades SPAD; VC= vitamina C ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a LSD Fisher ($p \leq 0.05$).

Los resultados de las variables evaluadas en los frutos de tomate se presentan en el Cuadro 3. Se encontró diferencia entre tratamientos en las variables de acidez titulable, licopeno y vitamina c. mientras que en las variables, conductividad eléctrica, firmeza, índice de madurez, potencial de Hidrogeno, Diámetro ecuatorial y polar no se observaron diferencias entre tratamientos.

En los resultados obtenidos se observa que el tratamiento con Cmm (plantas con estrés biótico) presentó la mayor concentración de sólidos solubles totales, acidez titulable, conductividad eléctrica y vitamina c, siendo superiores al T0 por 13.8, 25, 22.7 y 28.7% respectivamente. Bajo condiciones de estrés biótico las plantas como mecanismo de defensa sintetizan una mayor cantidad de antioxidantes, en este sentido Muñoz (2007), reporta una mayor capacidad antioxidante en distintos frutos que contenían mayor cantidad de compuestos fenólicos. Los antioxidantes se incrementan ante condiciones de estrés debido al papel crucial que juegan para inactivar las especies reactivas de oxígeno, además de que influyen en la expresión génica asociada con las respuestas de estrés biótico y abiótico (Tokunaga *et al.*, 2005).

Cuadro 3. Variables de calidad de fruto de plantas de tomate.

Trat	SST	AT	CE	F	IM	L	pH	VC	DE	DP
T0	3.6 a	0.12 ab	2.2 a	4.9 a	30.9 a	4.9 b	4 a	21.9 bc	43.1 a	52.7 a
Cmm	4.1 a	0.15 a	2.7 a	4.3 a	28 a	3.9 b	3.9 a	28.2 a	46.6 a	60.3 a
Cmm+AF	3.7 a	0.12 ab	2.2 a	4.8 a	30.3 a	5.3 b	4 a	23.2 b	46.1 a	59.9 a
AF	3.8 a	0.11 b	2.8 a	4.8 a	34.8 a	12.2 a	4 a	19.7 c	47.4 a	59.2 a
CV (%)	8.87	13.35	30.78	8	16.05	48.31	6.8	5.93	6.37	6.62

T0= testigo; Cmm= *C. michiganensis*; AF= ácidos fenólicos; SST (°Brix)= sólidos solubles totales; AT (%)= acidez titulable; CE (mS cm⁻¹)= conductividad eléctrica; F (kg cm⁻¹)= firmeza; IM= índice de madurez; L (mg kg⁻¹)= licopeno; pH= potencial de hidrogeno; VC (mg 100 g⁻¹)= vitamina C; DE (mm)= diámetro ecuatorial y DP (mm)= diámetro polar. Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a LSD Fisher ($p \leq 0.05$).

Con relación a los resultados de incidencia y severidad de Cmm, éstos se presentan en las Figuras 1a y 1b. La incidencia de Cmm se puede ver en la Figura 1a, en las mediciones realizadas a los 50, 65 y 80 días el tratamiento AF+Cmm presentó menor incidencia en comparación al tratamiento Cmm, ya que redujo la incidencia de Cmm hasta 12%. En la Figura 1b se observan los resultados de severidad de Cmm, para esta variable el tratamiento AF+Cmm registró hasta 36% menor severidad de la enfermedad con respecto al tratamiento Cmm, esto a los 95 DDT. Se ha reportado que algunos compuestos fenólicos desempeñan un papel clave en las respuestas de las plantas ante los ataques de patógenos o insectos (Kutchan *et al.*, 2005; Muthuswamy *et al.*, 2007; Lattanzio *et al.*, 2008), lo que corresponde al resultado obtenido en el presente estudio donde se observa claramente este efecto.

Los resultados obtenidos demuestran que la aplicación de ácidos fenólicos de manera foliar reduce la incidencia y severidad de Cmm (Figura 1a y 1b), al igual que lo mencionado por Cornell (2003) y Bhattacharya (2010), quienes resaltan su función como agentes protectores. Además de que se ha recomendado el uso de ácidos fenólicos como agentes antimicrobianos naturales por mostrar un grado de inhibición del crecimiento de bacterias y hongos (Sivakamim, 2007).

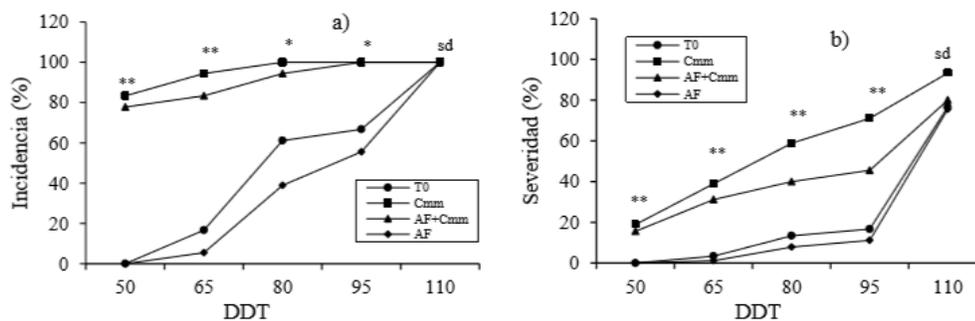


Figura 1. a) incidencia y b) severidad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de tomate. T0= testigo; Cmm= *C. michiganensis*; AF= ácidos fenólicos. Diferencias estadísticas de acuerdo a LSD Fisher, * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de las variables evaluadas en el análisis de estomas. Se puede observar que en la densidad de estomas y células tabloides, así como en el índice estomático no se encontró diferencia estadística entre tratamientos. Sin embargo, la aplicación de ácidos fenólicos (AF) indujo en la superficie adaxial menor densidad de estomas e índice estomático en 13 y 28% con respecto al T0. Además, este mismo tratamiento, pero en la superficie abaxial provocó menor densidad celular 86% con respecto al T0.

Cuadro 4. Variables evaluadas relacionadas a los estomas.

Trat	DEAd	DCAd	DEAb	DCAb	IEAd	IEAb	LEAd	AEAd	LEAb	AEAb
T0	118 a	884.6 a	263.3 a	697.6 a	11 a	27.6 a	32.3 a	17.3 a	35.6 a	22.3 a
Cmm	111.3 a	859.6 a	250.6 a	681.3 a	11.3 a	27.3 a	32 a	16.6 a	35.3 a	21 a
Cmm+AF	117.3 a	940.3 a	260.3 a	684.6 a	11.3 a	27.6 a	31.3 a	17.3 a	33.6 a	21.6 a
AF	85.3 a	915.6 a	289.6 a	99.6 a	9.6 a	29.6 a	33.6 a	17.6 a	37 a	22.3 a
CV (%)	29.43	27.01	16.78	10.76	19.15	13.16	11.77	7.91	9.28	7.20

T0= testigo; Cmm= *C. michiganensis*; AF= ácidos fenólicos; DEAd (Num mm⁻²)= densidad de estomas adaxial, DCAd (Num mm⁻²)= densidad celular adaxial; DEAb (Num mm⁻²)= densidad de estomas abaxial; DCAb (Num mm⁻²)= densidad celular abaxial; IEAd= índice estomático adaxial, IEAb= índice estomático abaxial; LEAd (µm)= largo de estomas adaxial; AEAd (µm)= ancho de estomas adaxial; LEAb (µm)= largo de estomas abaxial; AEAb (µm)= ancho de estomas abaxial. Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a LSD Fisher ($p \leq 0.05$).

El tratamiento al que se le aplicaron ácidos fenólicos + Cmm presentó estomas de menor largo en ambas superficies. El tratamiento Cmm, presentó estomas de menor ancho en ambas superficies, sin presentar diferencia estadística con respecto a los demás tratamientos. Lo anterior, es una característica importante a destacar ya que la bacteria penetra a los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidátides de la hoja (Gleason *et al.*, 1993; Ramírez y Sáinz, 2006). Particularmente el tamaño de los estomas influye en el ingreso de la bacteria a la planta, mayor tamaño facilitará el ingreso y viceversa. Los tratamientos Cmm y AF presentaron menor número de estomas lo que finalmente en menor probabilidad de acceso para las bacterias.

Conclusiones

La aplicación de ácidos fenólicos no tiene efectos sobre la morfología y fisiología del cultivo ya que no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados.

No obstante, los ácidos fenólicos disminuyen significativamente la incidencia y severidad de Cmm, por lo que el uso de éstos compuestos puede ser una alternativa para el manejo de *Clavibacter michiganensis* en el cultivo de tomate.

En variables histológicas se observó claramente que la aplicación de ácidos fenólicos induce cambios en las diferentes estructuras de la planta, lo cual puede aumentar la tolerancia al ataque de los patógenos como *Clavibacter michiganensis*.

Proponemos el estudio de los ácidos fenólicos en el control de otros patógenos en diferentes cultivos.

Literatura citada

- Anaya, A. L. 2003. Ecología Química. Plaza y Valdés Editores. Instituto de Ecología, UNAM, México. 349 p.
- Anfoka, G. H. 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. *Vollendung*) to cucumber mosaic virus. *Crop Protection*. 19:401-405.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th (Ed.). Arlington, Virginia, USA. 384 Pp.
- Arredondo, V. R.; Hernández, C. F. D.; Anguiano, C. J. C.; Ochoa, F. Y. M.; Gallegos, M. G.; Jasso, C. D. and Cristóbal, N. A. 2017. Review of antibacterial activity of plant extracts and growth-promoting microorganism (GPM) against phytopathogenic bacterial tomato crop. *Eur. J. Biotechnol. Gen. Eng.* 4(1):11-36.
- Arshad, W.; Haq, I.; Waheed, T. M.; Mysore, K. S. and Mirza, B. 2014. Agrobacterium-mediated transformation of tomato with a rolb gene results in enhancement of fruit quality and foliar resistance against fungal pathogens. *PLoS One*. 9(5):e96979.
- Balestra, G. M.; Heydari, A.; Ceccarelli, D.; Ovidi, E. and Quattrucci, A. 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protec.* 28:807-811.
- Baysal, Ö.; Soyly, E. M. and Soyly, S. 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Reino Unido. Plant Pathol.* 52(6):747-753.
- Bhattacharya, A.; Sood, P. and Citovsky, V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. *Mol. Plant. Pathol.* 11:705-719. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x.
- Borboa, F. J.; Rueda, P. E. O.; Acedo, F. E.; Ponce, J. F.; Cruz, M.; Grimaldo, J. O. y García, O. A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32(4):319-326.
- Boyette, M. and Estes, E. 1997. Postharvest cooling and handling of field- and greenhouse-grown tomatoes. Maintaining the quality of aparat. *Carolina Fresh Produce*. 3:1-8.
- Broun, P. 2005. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol.* 8: 272-279. DOI: 10.1016/j.pbi.2005.03.006.
- Brown, J. K. M. 2003. A cost of disease resistance: paradigm or peculiarity? *Trends Genet.* 19:667-671. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2003.10.008>.
- Casierra, P. F. y Aguilar, A. O. E. 2008. Calidad en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cosechados en diferentes estados de madurez. *Agron. Colomb.* 26(2):300-307.
- Cipollini, D.; Purrington, C. B. and Bergelson, J. 2003. Costs of induced responses in plants. *Basic Appl Ecol.* 4:79-85.
- Conrath, U.; Beckers, G.; Flors, V.; García, A. P.; Jakab, G.; Mauch, F.; Newman, M. A.; Pieterse, C.; Poinssot, B.; Pozo, M. J.; Pugin, A.; Schaffrath, U.; Ton, J.; Wendehenne, D.; Zimmerli, L. and Mauch-Mani, B. 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol Plant-Microbe Interact.* 19:1062-1071.
- Cooksey, D. A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plantpathogenic bacteria. *Annual Rev. Phytopathol.* 28:201-219. DOI: 10.1007/s10658-016-1035-2.

- Cornell, H. V. and Hawkins, B. A. 2003. Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. *Am Nat.* 161:507-522. DOI:10.1086/368346.
- Dangl, J. L. and Jones, J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 411:826-833. DOI:10.1038/35081161.
- De León, L.; Siverio, F.; López, M. M. and Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant dis.* 95(11):1328-1338.
- do Nascimento, N. C. and Fett-Neto, A. G. 2010. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. *In: Fett-Neto, A. G. (Ed.). Plant secondary metabolism engineering - methods and application, methods in molecular biology.* Humana Press, New York. 643:1-13.
- Durrant, W. E. and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:185-209.
- EPPO. 2010. Diagnostics *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*. *Bulletin.* 40:353-364.
- Evert, R. F. 2006. Esau's plant anatomy: meristems, cells and tissues of the plant body: their structure, function and development, Hoboken. 3rd Ed. Wiley-Interscience. 624 p.
- Fish, W. W.; Perkins, V. P. and Collins, J. K. 2002. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *J. Food Compos. Ann.* 15:309-317.
- Gleason, M.; Braun, E. J. and Peterson, R. H. 1993. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology.* 1:1519-1523.
- Gutiérrez, C. M. A.; Trejo, L. C. and Larqué, S. A. 1998. Effect of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 36(8):563-565.
- Hadas, R.; Kritzman, G.; Kletman, F.; Gefen, T. and Manulis, S. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathol.* 54:643-9. DOI: 10.1111/ppa.12454.
- Hansen, I.; Lapidot, M.; and Thomma, B. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *The Am. Phytopathol. Soc.* 23(5):539-548. doi: 10.1094/MPMI-23-5-0539.
- Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* spp., opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Microbiology Review.* 2:43-56.
- Kutchan, T. and Dixon, R. A. 2005. Physiology and metabolism - Secondary metabolism: nature's chemical reservoir under deconvolution. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8(3):227-229. doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.016
- Lattanzio, V. 2013. Phenolic compounds: Introduction. *In: Nat. Prod. (Ramawat, K. G. and Mérillon, J. -M. (Eds.). Springer Berlin Heidelberg.* 1543-1580 pp. doi: 10.1007/978-3-642-22144-6_57
- Lattanzio, V.; Kroon, P. A.; Quideau, S. and Treutter, D. 2008. Plant phenolics-secondary metabolites with diverse functions. *In: Daayf, F. and Lattanzio, V. (Eds.). Recent advances in polyphenol research, Wiley-Blackwell, Oxford.* 1.1-35 doi: 10.1002/9781444302400.ch1.
- López, T. R.; Camacho, R. V. y Gutiérrez, C. M. A. 1998. Aplicación de ácido salicílico para incrementar el rendimiento agronómico en tres variedades de trigo. *Terra Latinoam.* 16(1):43-48.
- Lu, L.; Wang, J.; Zhu, R.; Lu, H.; Zheng, X.; and Yu, T. 2015. Transcript profiling analysis of *Rhodosporidium paludigenum* mediated signalling pathways and defense responses in mandarin orange. *Food Chem.* 172:603-612.

- Muñoz, J. A. M.; Ramos-Escudero, F. D.; Alvarado-Ortiz, U. C. and Castañeda, C. B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 73(3):142-149.
- Muthuswamy, S. and Rupasinghe, H. P. V. 2007. Fruit phenolics as natural antimicrobial agents: selective antimicrobial activity of catechin, chlorogenic acid and phloridzin. *Food Agric Environ.* 5(3-4):81-5.
- Nawrocka, J. and Malolepsza, U. 2013. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biol. Control.* 67:149-156.
- Neilson, E. H.; Goodger, J. Q. D.; Woodrow, I. E. and Møller, B. L. 2013. Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Sci.* 18:250-258. doi:10.1016/j.tplants.2013.01.001.
- Ortega, M. L. D.; Sánchez, O. J.; Díaz, R. R. y Ocampo, M. J. 2010. Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Ra Ximhai.* 6:365-372.
- Osorio, E.; Flores, M.; Hernández, D.; Ventura, J.; Rodríguez, R. and Aguilar, C. 2010. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Ind. Crop Prod.* 31(1):153-157.
- Padayatt, S. J. M.; Daruwala, R.; Wang, Y.; Eck, P. K.; Song, J.; Koh, W. S. and Levine, M. 2001. Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. *In: Cadenas, E. and Packer, L. (Eds.). Handbook of antioxidants.* CRC Press. Washington, DC, USA. 117-145 pp.
- Ramírez, V. J. y Sáinz, R. R. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1^{ra}. Ed. Once Ríos. México. 19-160 pp.
- Raupach, G. S.; Liu, L.; Murphy, J. F.; Tuzun, S. and Kloepper, J. W. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis.* 80:891-894.
- Richard, A. D. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 411:843-847. DOI:10.1038/35081178.
- Rivero, M. G. C.; Quirós, G.; Sánchez, U. A. B. y Sanabria, M. E. 2007. Morfoanatomía de sépalos y pedúnculo del fruto de *Psidium guajava* L., estructuras de preferencia del ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). *Venezuela. Rev. Fac. Agron.* 24(1):135-140.
- Riviera, S. E. V.; Escobar, S. M. A.; Morales, D.; Noé, A. C. y Rodríguez, H. R. 2014. Synergistic effects of ethanolic plant extract mixtures against food-borne pathogen bacteria. *African J. Biotechnol.* 13(5):669-704. DOI:10.5897/AJB2013.12273.
- San Miguel, R.; Gutiérrez, M. and Larqué, S. A. 2003. Salicylic acid increases the biomass accumulation of *Pinus patula*. *Southern J. Appl. Fores.* 27:52-54.
- Sivakamim, M. and Vasantha, R. H. P. 2007. Fruit phenolics as natural antimicrobial agents: Selective antimicrobial activity of catechin, chlorogenic acid and phloridzin. *J. Food, Agric. Environ.* 5 (3-4):81-85.
- Srivastava, M. K. and Dwivedi, U. N. 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Sci.* 158(1-2):87-96.
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil.* 15:134-154.
- Tancos, M. A.; Chalupowicz, L.; Barash, I.; Manulis, S. S. and Smart, C. D. 2013. Tomato fruit and seed colonization by *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:6948-6957.

- Tokunaga, T.; Miyahara, K.; Tabata, K. and Esaka, M. 2005. Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta*. 220:854-863.
- United Nations Food and Agricultural Organization. 2016. FAOSTAT. Available from world wide Web.
- Valdez, S. L.; González, M. S.; Valdez, A. L. A.; Ramírez, G. F y Benavides, M. A. 2015. Efecto de la aplicación exógena de ácido benzoico y salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate, tomatillo y pimiento. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 12:2331-2343.
- Villanueva, C. E.; Alcántar, G. G.; Sánchez, G. P.; Soria, F. M. y Larque, S. A. 2009. Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de [*Chrysanthemum morifolium*(Ramat) *Kitamura*] en Yucatán. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 15(2):25-31.
- Wilkinson, H. P. 1979. The plant surface (mainly leaf). En: Metcalfe, C. R. y Chalk, L. Eds. *Anatomy of the Dicotyledons, 2nd (Ed.)*. Clarendon Press, Oxford. 1. 97-165 pp.
- Yuliar, N. Y. A. and Toyota, K. 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia Solanacearum*. *Microbes. Environ.* 30(1):1-11. doi:10.1264/jsme2.ME14144.

SEGUNDO ARTÍCULO

**Aplicación de ácidos fenólicos y su efecto en actividad enzimática en plantas de
tomate**

**Effect of phenolic acids on enzymatic activity and antioxidant compounds
in tomato plants inoculated with *Clavibacter michiganensis***
**Efecto de los ácidos fenólicos en la actividad enzimática y compuestos
antioxidantes en plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter*
*michiganensis***

William Zárate-Martínez¹, Antonio Juárez-Maldonado^{2*}

¹ Programa de Doctorado en Ciencias en Agricultura Protegida, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

² Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

*Autor de correspondencia: juma841025@hotmail.com, tel. (844) 411-0317

Resumen

Los ácidos fenólicos pertenece al grupo de los compuestos fenólicos (metabolitos secundario), su síntesis y/o concentración en las plantas aumenta cuando estas se encuentran bajo condiciones de estrés biótico y/o abiótico. En este trabajo de investigación, se propuso evaluar aplicaciones foliares de un producto a base de ácidos fenólicos, en el sistema de defensa enzimático y no enzimático mediante la cuantificación de proteínas, antioxidantes enzimáticos, antioxidantes no enzimáticos, capacidad antioxidante y contenido de H₂O₂ en hoja (15, 31 y 92 días después del trasplante) y fruto (92 días después del trasplante). Para cumplir con el objetivo planteado se estableció un cultivo de tomate tipo Saladette de la variedad Rio Fuego, se trabajó con seis tratamientos los cuales se describen a continuación: un testigo absoluto (T0), plantas a las que se le aplicó Defens (AF), aplicación de Defens antes de la inoculación con *Clavibacter* (AFA), aplicación de Defens después de la inoculación con *Clavibacter* (AFD), aplicación de Defens antes y después de la inoculación con *Clavibacter* (AFAD) y plantas inoculadas con *Clavibacter* (Cmm). Los resultados obtenidos muestran que la aplicación foliar de AF intervienen en la actividad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en las plantas, los tratamientos mostraron más diferencias en el tercer muestreo (92 ddt). Se encontró mayor capacidad antioxidante en hoja que

en fruto la cual se determinó por ABTS y DPPH. En la mayoría de los tratamientos el contenido de H₂O₂ en las hojas fue aumentando en cada muestreo.

Palabras clave: proteínas; antioxidantes enzimáticos; antioxidantes no enzimáticos; peróxido de hidrogeno; capacidad antioxidante.

Contenido sobresaliente:

- 1) La inoculación con *C. michiganensis* disminuye el contenido de proteínas en las plantas.
- 2) La aplicación de ácidos fenólicos aumenta la actividad SOD y PAL. Las aplicaciones de ácidos fenólicos, redujeron la actividad SOD y GPX en fruto.
- 3) La inoculación con *C. michiganensis* aumenta la actividad de las enzimas CAT y PAL en hoja y una disminución de la actividad enzimática GPX en fruto.
- 4) La aplicación de ácidos fenólicos o la inoculación con *C. michiganensis* no modifica la capacidad antioxidante en hoja ni en fruto.

Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) es un cultivo de importancia económica que se encuentra en todo el mundo. México ocupa el décimo lugar como productor de esta hortaliza (SIAP, 2017). Los patógenos bacterianos reducen el rendimiento de los cultivos, particularmente, la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causa la “marchitez” y “chancro bacteriano”, las dos enfermedades más importantes en jitomate (Gartemann *et al.*, 2003). Este patógeno causa pérdidas económicas en todo el mundo (Jones *et al.*, 2004). El grado de afectación en unidades de producción de tomate por el cancro bacteriano va de 1 a 100% (Rueda-Barrientos *et al.*, 2017).

Ante condiciones de estrés la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la planta es inevitable, debido a que son un indicador (Mittler *et al.*, 2004). Es importante señalar que el daño en la planta ocurre cuando la cantidad de ROS es mayor que la capacidad antioxidante (Michalak, 2006). De forma

natural todas las plantas sintetizan una gran cantidad de compuestos orgánicos, entre estos, los metabolitos primarios y secundarios (Baraldi, 2017). Los metabolitos primarios participan y son esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas; los metabolitos secundarios están involucrados en los sistemas de defensa y en procesos de respuestas a estrés biótico y abiótico (Bellaloui, 2012).

Los compuestos fenólicos (CF) son metabolitos secundarios, esenciales durante el crecimiento y reproducción de las plantas, actúan como agentes protectores frente a patógenos (Cervilla *et al.*, 2012). Dentro de la clasificación de los CF se encuentran los ácidos fenólicos (AF), conocidos como compuestos bioactivos multipropósito, se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal, poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas entre otras (Xu *et al.*, 2008); por ejemplo, los ácidos gálico y ferúlico se han reportado como buenos inhibidores del crecimiento de *Botrytis cinérea* (Apolonio-Rodríguez, 2017).

Así también el estrés biótico puede inducir estrés oxidativo en las plantas, ante este panorama las plantas activan su sistema de defensa antioxidante, principal mecanismo para la eliminación de ROS (Mittler *et al.*, 2004). Ante este panorama, se planteó como objetivo realizar aplicaciones foliares de ácidos fenólicos a plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y evaluar sus efectos sobre el sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático en estas plantas.

Materiales y métodos

Establecimiento del cultivo

El Presente trabajo se desarrolló en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se trasplantó tomate tipo Saladette de la variedad Rio Fuego, en bolsas negras de polietileno que contenían 10 L de sustrato perlita:peat moss relación 1:1 (v:v). El cultivo se manejó a un solo tallo. La nutrición fue administrada a través de un sistema de riego dirigido, usando la, solución Steiner (Steiner, 1961).

Aplicación de tratamientos

Los tratamientos consistieron en la aplicación de ácidos fenólicos (AF) usando como fuente el producto Defense Gr® (10 000 ppm de ácidos fenólicos en forma de granulo soluble). Se establecieron seis tratamientos los cuales se describen a continuación: 1) un testigo absoluto (T0); 2) plantas con aplicación de ácidos fenólicos antes de la inoculación con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (AFA); 3) plantas con aplicación de ácidos fenólicos después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (AFD); 4) plantas con aplicación de ácidos fenólicos antes y después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (AFAD); 5) plantas solo con aplicación de ácidos fenólicos (AF) y 6) plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).

La aplicación de ácidos fenólicos se realizó vía foliar a intervalo de una semana, la dosis fue de 1 kg ha⁻¹ realizado un total de 10 aplicaciones, esta dosis se aplicó a todos los tratamientos a excepción de (AFA) donde se manejaron tres aplicaciones a una dosis de 3.3 kg ha⁻¹ a intervalos de cinco días. La aplicación de ácidos fenólicos se inició siete días después del trasplante (DDT), a los 21 días DDT se realizó la inoculación con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, restableciendo las aplicaciones a los 28 DDT.

Las plantas correspondientes a los tratamientos con estrés biótico fueron inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a los 21 DDT, usando una concentración de 1X10⁵ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro. Se realizaron cortes en las hojas, fueron sumergidas en 30 mL de solución bacteriana por 5 minutos el sobrante se asperjo al follaje.

Muestreos y variables estudiadas

Se realizaron muestreos de hojas a los 15, 31 y 92 DDT; de fruto a los 90 DDT.

Las variables estudiadas son: proteínas, antioxidantes enzimáticos (catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX), fenilalanina amonio liasa (PAL)); antioxidantes no enzimáticos (glutatión reducido (GSH), flavonoides totales (FT), compuestos fenólicos totales (CFT)); capacidad antioxidante por ABTS y DPPH y contenido de peróxido de hidrógeno (PH).

Extracto Enzimático: (EE). En un tubo eppendorf de 2 mL, se colocaron 200 mg de tejido vegetal previamente liofilizado y macerado en mortero de mano, se adicionaron 20 mg de polivinil pirrolidona y 1.5 mL de buffer de fosfatos pH 7-7.2 (0.1 M), se sometió a sonificación durante 5 minutos, y a continuación se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga (Labnet Int. Inc., Modelo Prism™ R). El sobrenadante fue recolectado y filtrado con filtros para jeringa de membrana de PVDF de 0.45 micras de poro (Ramos *et al.*, 2010). Con el EE se determinó proteínas, CAT, SOD, GPX, APX, PAL, GSH y capacidad antioxidante ABTS y DPPH.

Proteínas: Mediante la técnica colorimétrica de Bradford (1976). Se determinó la absorbancia en el Lector de Microplacas (Modelo ELx808™) a 595 nm. Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en la ecuación de la curva de calibración realizada con Albúmina Sérica Bovina (ABS) (10 a 1000 ppm). Los datos se expresaron en mg g⁻¹.

Antioxidantes enzimáticos

Catalasa: La actividad enzimática de catalasa se cuantificó midiendo 2 tiempos de reacción, tiempo 0 (T0) y tiempo 1 (T1) por el método espectrofotométrico (Cansev *et al.*, 2011). La reacción se realizó a 20 °C bajo agitación constante, el consumo de H₂O₂ se leyó a 270 nm en el espectro de UV-VIS. La diferencia de las absorbancias obtenidas fue interpolada en la ecuación de la curva de calibración realizada con H₂O₂ (20 a 200 mM). Los resultados se reportaron como actividad específica (U mg⁻¹ proteínas).

Superóxido dismutasa: Esta prueba se realizó con el Kit de Cayman Superoxide Dismutase Assay (CAYMAN, 2017). En una microplaca, se agregó por pocillo lo siguiente: 10 μL de extracto enzimático, 200 μL del Radical Detector, 20 μL de Xantina Oxidasa, se agitó suavemente durante cinco segundos y se cubrió la microplaca para incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, enseguida se determinó la absorbancia en el Lector de Microplacas (Modelo ELx808 TM) a 450 nm. Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en la ecuación de la curva de calibración realizada con SOD (0.0 a 0.050 U/ml). Se reporta como actividad específica (U mg^{-1} proteínas).

Glutación peroxidasa: Se determinó con la metodología propuesta por Flohé & Günzler (1984) y modificada por Xue, Hartikainen, & Piironen (2001), usando H_2O_2 como sustrato. Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm y estas fueron interpoladas en la ecuación de la curva de calibración realizada con GSH (0.02 a 1 mM). Se reportó como actividad específica (U mg^{-1} proteínas).

Ascorbato peroxidasa: La medición se realizó en dos tiempos T0 (Tiempo inicial) y T1 (Tiempo un minuto de reacción) de acuerdo a Nakano & Asada (1987). Se reportó como actividad específica (U mg^{-1} proteínas).

Fenilalanina amonio liasa: Se determinó de acuerdo a Sykłowska-Baranek (2012). Se determinó absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Las absorbancias fueron interpoladas en la ecuación obtenida de la curva de calibración con ácido transcinámico (0.01-0.8 mg mL^{-1}). Los resultados se reportan como actividad específica (U mg^{-1} proteínas).

Antioxidantes no enzimáticos

Glutación reducido: Esta cuantificación se realizó según la metodología espectrofotométrica establecida por Xue *et al.* (2001), mediante la reacción con

DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)). Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 412 nm y estas fueron interpoladas en la ecuación de la curva de calibración realizada con GSH (0.02 a 1 mM). Los resultados se expresaron en mM de GSH por mg de proteínas totales.

Flavonoides totales: Se realizó por el método Dowd, adaptado por Arvouet-Grand *et al.*, (1994). Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. El contenido total de flavonoides fue determinado usando una curva de calibración con quercetina (0 a 50 ppm) en metanol, los resultados fueron expresados en miligramos Equivalentes de Quercetina por 100 gramos de peso seco (mg EQ 100 g⁻¹ PS).

Fenoles Totales: Se realizó según la metodología propuesta por Yu & Dahlgren (2000). La cuantificación se realizó según Sultana & Anwar (2009) & Nsor-Atindana *et al.*, (2012). Se determinó absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 750 nm. Las absorbancia fueron interpoladas en la ecuación obtenida de la curva de calibración con ácido gálico (1-12.5 ppm), los resultados fueron expresados en miligramos Equivalentes de Ácido Gálico por 100 gramos de peso seco (mg EAG 100 g⁻¹ PS).

Capacidad Antioxidante

Se determinó capacidad antioxidante por DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)). Para hacer la determinación por DPPH se utilizó la metodología propuesta por Sykłowska-Baranek *et al.*, (2012). La absorbancia se determinó en el Lector de Microplacas (Modelo ELx808™) a 540 nm. La determinación de antioxidantes por ABTS (C₁₈H₁₈N₄O₆S₄) se realizó por el método espectrofotométrico de Miller (1993); se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 754 nm. Las absorbancias fueron interpoladas en las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración realizada con TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido

carboxílico) ($C_{14}H_{18}O_4$) y ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) con estándares a una concentración de 0.1 a 5 mM y 0.01 a 0.5 mg mL⁻¹ respectivamente.

Peróxido de hidrogeno: Se inició con la estandarización del peróxido de hidrogeno y la extracción según Patterson *et al.*, (1984). Se determinó la absorbancia a 505 nm mediante un espectrofotómetro de UV/VIS. La concentración de peróxido de hidrogeno se determinó mediante el uso de la ecuación de Lambert-Beer, utilizando el grosor de la celdilla (1 cm), la absorción molar del peróxido de hidrogeno ($40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y la absorbancia de la muestra.

$$A = E\ell c$$

donde

E= Longitud de la celdilla que es atravesada por la luz en el medio (cm); l= Concentración del absorbente en el medio (mol/L=M); c= Coeficiente de absorción ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y A= Absorbancia (sin unidad).

Resultados y discusión

Antioxidantes enzimáticos

A los 15 ddt, se encontró diferencia estadística en la actividad CAT, el tratamiento AFA presentó 37.9 % más actividad CAT con respecto al T0 (Tabla 1), los tratamientos AFAD, AF y Cmm presentaron menor actividad CAT en un 70.2 % con respecto al testigo. En el segundo muestreo 31 ddt no hubo diferencias significativa, sin embargo, el tratamiento AF presentó 81.3 % menos actividad CAT que el T0. A los 92 ddt se encontró diferencias significativa, siendo el tratamiento Cmm el que presentó mayor actividad de esta enzima en un 264.0 % más con respecto al T0. Los distintos tratamientos no provocaron diferencia estadística en la actividad enzimática de CAT en fruto (90 ddt).

Plantas que se encuentran bajo condiciones de estrés biótico, están en desequilibrio entre la producción y eliminación de ROS (Vellosillo *et al.*, 2010),

las plantas al encontrarse bajo perturbaciones por patógenos inducen la sobreproducción de ROS, lo cual causa daño celular oxidativo (Mittler, 2002).

La catalasa es una enzima que cataliza la dismutación de H_2O_2 en H_2O y O_2 , se produce en todos los eucariotas aeróbicos y su función es eliminar el H_2O_2 (Asada, 1999; Mittler, 2002). La mayor actividad de la enzima catalasa observada en el último muestreo se debe al estrés de las plantas ocasionado por Cmm.

Jones & Dangl (2006) afirman que las plantas tienen una red de defensa muy bien organizada y coordinada, que es inducible en respuesta a estímulos/señales apropiadas durante la patogénesis, información que explica la mayor actividad de la enzima CAT en el tercer muestreo. En este mismo sentido cuando hay baja actividad CAT puede haber baja tolerancia de la planta al estrés en cuestión. El aumento de la actividad CAT es un rasgo adaptativo que posiblemente ayuda a superar el daño al metabolismo tisular al reducir los niveles tóxicos de H_2O_2 (Vandenabeele., 2004).

En el primer y segundo muestreo (15 y 31 ddt), los tratamientos no provocaron diferencias significativas en la actividad enzimática específica de SOD (Tabla 1). A los 92 ddt se encontró diferencias significativas, los tratamientos AFD y AFAD presentaron la mayor actividad enzimática en un 72.6 y 77.9 % más con respecto al T0, por los resultados obtenidos podemos mencionar que la aplicación de ácidos fenólicos al igual que la inoculación con Cmm incrementó la actividad SOD en hojas, este incremento es aún mayor cuando las aplicaciones de AF se hacen a plantas inoculadas con Cmm, lo cual lleva a pensar que el patógeno así como los ácidos fenólicos activan los mecanismo de defensa antioxidante.

En frutos (90 ddt), se encontraron diferencias significativas en la actividad SOD, la aplicación de AF redujo al máximo la actividad de esta enzima en un 54% con respecto al T0, inocular las plantas con Cmm también redujo la actividad SOD en un 45.1 %, cuando las aplicaciones de AF se hacen a plantas inoculadas con

Cmm la actividad SOD incrementó, sin embargo, es importante decir que el T0 presentó la mayor actividad de esta enzima en fruto.

Debido a que la enzima SOD proporciona protección a las plantas contra las ROS, las cuales se generan ante condiciones de estrés biótico y abiótico (Alscher y Erturk, 2002; Mittler y Blumwald, 2010; Feng *et al.*, 2015). Explicar el hecho por el cual el T0 en el tercer muestreo presentó la menor actividad de la enzima SOD, o que en fruto la aplicación de AF redujo la actividad de esta enzima.

SOD se encuentra en el citoplasma, los cloroplastos y las mitocondrias de las células eucariotas y procariotas (Kun, 2016). El anión superóxido es usualmente el primer radical libre formado de manera natural en la fotosíntesis y respiración; por lo tanto, la SOD representa la línea primaria de control del estrés oxidativo (Gill & Tuteja, 2010); transformando el O_2 en H_2O_2 y las enzimas ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa y catalasa lo destoxifican reduciendolo a H_2O (Asada, 2006). Se encontró un efecto inverso en la actividad SOD entre las hojas (31 y 92 ddt) y el fruto. El T0 presentó la mayor actividad SOD en fruto, pero la menor actividad en hoja. Según los datos anteriores podemos concluir que los ácidos fenólicos activan el mecanismo de defensa antioxidante de la planta.

A los 15 y 31 ddt los tratamientos no provocaron diferencias significativas en la actividad de GPX, en ambas fechas el tratamiento AFD presentó la menor actividad de esta enzima, hasta en un 25.4% (31 ddt) con respecto al T0. En el tercer muestreo (92 ddt) si se encontró diferencia significativa, el tratamiento AFD presentó 309.7 % más actividad de esta enzima con respecto al T0, lo cual, posiblemente se debe a que los ácidos fenólicos se asperjaron a estas plantas después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis*, lo cual generó plantas más estresadas En las hojas la actividad de esta enzima fue aumentando conforme pasaban los días, esto se deba a que conforme la planta crece las ROS también aumentan al ser subproductos normales de varias vías metabólicas en la planta, ante esta situación la planta activa su mecanismo de defensa

antioxidante, en este caso GPX (Navrot *et al.*, 2007). En fruto se encontró diferencia significativa, la aplicación de ácidos fenólicos redujo la actividad de GPX en los siguientes tratamientos AFAD, AFD, AF y AFA en un 29.9, 31.9, 36.4 y 37.8 % con respecto al T0.

GPX pertenece a una familia de enzimas que protege a las células contra el daño oxidativo causado por el exceso de ROS (Wang *et al.*, 2017). GPX junto con Ascorbato Peroxidasa (APX) son las dos principales enzimas que eliminan ROS y catalizan la reducción de H₂O₂ con el fin de prevenir el daño celular (Ozyigit *et al.*, 2016). Por lo anterior la actividad de GPX aumenta bajo condiciones de estrés biótico y abiótico (Diao *et al.*, 2014), comparando con los resultados obtenidos en hoja a los 92 ddt, las plantas del tratamiento AFD se encontraban mayormente estresada y por lo tanto activaron en mayor medida su sistema antioxidante enzimático; en frutos los tratamientos T0 y Cmm presentaron la mayor actividad GPX, posiblemente la condición de estrés de estos frutos se deba únicamente a su metabolismo normal, y los ácidos fenólicos redujeron los niveles de estrés mediante la eliminación de ROS. Una mayor concentración de GPX significa una mayor tolerancia contra el estrés por su capacidad de eliminar ROS (Herbette *et al.*, 2011).

La actividad enzimática de APX solo mostró diferencia significativa en la medición realizada a los 15 ddt (Tabla 1), los tratamientos con aplicaciones de ácidos fenólicos presentaron menor actividad de la enzima en un 71.5 % (AFA) y 67.3 % (AFAD, AF y Cmm) con respecto al T0, cabe señalar que en este muestreo solo se había realizado una aplicación de ácidos fenólicos, al tratamiento AFA (1 de 3), a los tratamientos AFAD, AF y Cmm (1 de 10). Con estos resultados podemos inferir que la actividad de la enzima APX no es modificada significativamente por *Clavibacter michiganensis* ni con aplicaciones de ácidos fenólicos, aunque Ozyigit *et al.* (2016) menciona que APX es una de las principales enzimas que eliminan ROS en cloroplastos y citosol de células vegetales (Asada, 2000).

El Ascorbato peroxidasa (APX) juegan un papel clave catalizando la conversión de H_2O_2 en H_2O monodeshidroascorbato (Asada, 2000). Tiene dos formas citosólicas, una con funciones defensivas, y otra unida a la membrana (Foyer y Noctor, 2005). Es un eficaz secuestrador de ROS, esto cobra importancia ya que bajo condiciones estresantes, la producción de ROS aumenta causando un daño significativo a las células, por lo que el proceso de detoxificación de ROS en las plantas es esencial (Pignocchi *et al.*, 2003). En este trabajo no hubo diferencia significativa entre tratamientos, por lo tanto estos resultados no coinciden con lo reportado por Ozyigit *et al.* (2016) quienes afirman que plantas estresadas presentaron mayor concentración de APX.

La actividad enzimática (PAL) determinada en el primer muestreo (15 ddt) no mostró diferencias significativas. En el segundo muestreo (31 ddt), los tratamientos provocaron diferencias significativas, el tratamiento Cmm presentó la mayor actividad PAL con 288.4 % más que el T0, sin embargo, aplicaciones de ácidos fenólicos redujeron la actividad de esta enzima en un 43.4, 45.4 y 61.8 % en los tratamientos AFA, AFD y AFAD con respecto al tratamiento Cmm. A los 92 ddt el tratamiento Cmm, presentó 338.4 % más actividad PAL que el T0. En este muestreo también la aplicación de ácidos fenólicos redujo la actividad PAL con respecto al tratamiento Cmm, en un 40.1, 51.1 y 78 % en los tratamientos AFAD, AFD y AFA respectivamente. En frutos los tratamientos no provocaron diferencias significativas en la actividad de la enzima PAL.

La actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) se activa ante condiciones de estrés ocasionadas por el ataque de algún patógeno (Flores-Torres, 2017). Estos reportes coinciden con los resultados obtenidos en el segundo y tercer muestreo (31 y 92 ddt), ya que el tratamiento que presentó la mayor actividad PAL fue (Cmm) plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis*. La máxima actividad de esta enzima se dio a los 31 ddt, fecha en la que el mecanismo de defensa de las plantas se encontraba más activa.

La PAL se encuentra involucrada en la vía de los fenilpropanoides que interviene en la deposición de compuestos fenólicos en las paredes celulares (van Loon et al., 2006), por lo que aumentos en su actividad permiten suponer que la planta se está reforzando contra el avance de un patógeno (Perez *et al.*, 2015). Está relacionada con la inducción de defensa, responsable de la biosíntesis de muchos metabolitos secundarios, alguno de ellos antocianinas, flavonoides y ligninas (Saharan *et al.*, 2015). Así también Pérez *et al.* (2015) al evaluar la enzima PAL en plantas con y sin estrés biótico (*Oidiopsis taurica*), encontró mayor actividad PAL en las plantas a las que se le inoculo el patógeno.

Tabla 1. Actividad enzimática de CAT, SOD, GPX, APX y PAL en hojas y frutos de tomate con aplicaciones de Ácidos fenólicos.

Tratamiento	CAT (Catalasa)(U proteínas ⁻¹)			
	15 ddt (Hoja)	31 ddt (Hoja)	92 ddt (Hoja)	90 ddt (Fruto)
TO	443.7 ab	459.2 a	173.5 b	449.9 a
AFA	612.9 a	266.4 a	172.1 b	340.7 a
AFD	443.7 ab	185.9 a	98.7 b	482.4 a
AFAD	131.9 b	158.6 a	89.8 b	560.3 a
AF	131.9 b	85.8 a	152.5 b	431.7 a
Cmm	131.9 b	121.4 a	631.7 a	447.8 a
	SOD (Superóxido dismitasa)(U proteínas⁻¹)			
TO	523.3 a	514.1 a	343.9 b	564.7 a
AFA	500.2 a	652.2 a	504.1 ab	457.0 ab
AFD	523.3 a	787.0 a	593.6 a	432.1 bc
AFAD	425.2 a	851.5 a	612.1 a	333.1 bcd
AF	425.2 a	587.4 a	470.1 ab	259.4 d
Cmm	425.2 a	794.0 a	371.3 ab	309.6 cd
	GPX (Glutación peroxidasa)(U proteínas⁻¹)			
TO	1.65 a	9.67 a	10.16 b	7.47 a
AFA	2.63 a	9.44 a	13.21 b	4.64 b
AFD	1.65 a	7.21 a	31.47 a	5.08 b
AFAD	2.21 a	13.00 a	12.71 b	5.23 b
AF	2.21 a	10.90 a	7.62 b	4.75 b
Cmm	2.21 a	10.35 a	15.80 b	7.26 a
	APX (Ascorbato peroxidasa)(U proteínas⁻¹)			
TO	18.27 a	11.04 a	6.97 a	6.86 a
AFA	5.96 b	11.70 a	13.14 a	8.88 a
AFD	18.27 a	11.08 a	12.84 a	8.08 a
AFAD	5.19 b	9.48 a	12.49 a	7.41 a
AF	5.19 b	8.59 a	9.13 a	5.88 a

Cmm	5.19 b	14.17 a	9.78 a	9.00 a
PAL (Fenilalanina Amonio Liasa)(U proteínas⁻¹)				
TO	9.60 a	8.97 c	5.72 b	11.60 a
AFA	6.07 a	19.69 abc	5.50 b	11.83 a
AFD	9.60 a	19.00 abc	12.24 ab	9.55 a
AFAD	5.40 a	13.30 bc	14.02 ab	7.80 a
AF	5.40 a	27.20 ab	8.46 b	7.43 a
Cmm	5.40 a	34.84 a	25.08 a	9.27 a

ddt: días después del trasplante. T0: Testigo absoluto. AFA: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos antes de la inoculación con *Clavibacter*. AFD: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis*. AFAD: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos antes y después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis*. AF: Plantas solo con aplicación de ácidos fenólicos. Cmm: Plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis*.

Antioxidantes no enzimáticos

En hoja, los tratamientos no provocaron diferencias en la concentración de glutatión en los muestreos realizados a los 15 y 92 ddt (Tabla 2). A los 31 ddt se encontraron diferencias significativas, el tratamiento AF incrementó en un 58.2 % la concentración de glutatión con respecto al T0. Los tratamientos provocaron diferencias en la concentración de glutatión en frutos, sin embargo, la concentración de glutatión en el testigo, no fue diferente a ningún otro tratamiento. El tratamiento AFA indujo la mayor concentración de glutatión con un 42.6 % más que el T0 y AF la menor concentración con 25.6 % menos que el T0.

El glutatión juega un rol importante en las plantas, ya que interviene en el crecimiento, desarrollo y en la respuesta al estrés, al ser una molécula clave en las reacciones redox (Dubreuil-Maurizi y Poinssot, 2012). Mantiene el equilibrio redox, propiedad de gran importancia biológica porque permite el ajuste fino del entorno redox celular en condiciones normales y, al inicio del estrés, proporciona la base para la señalización de estrés GSH (Wang *et al.*, 2004). Un residuo de cisteína nucleofílica central es responsable del alto potencial reductor del GSH,

que elimina el H_2O_2 citotóxico y reacciona de forma no enzimática con otros ROS, como el $^1\text{O}_2$, O_2^- y OH^\cdot (Wang et al., 2004). Una elevada concentración de GSH se correlaciona con la capacidad de las plantas para resistir el estrés oxidativo.

A los 15 ddt (Tabla 2) el tratamiento AFA indujo la mayor concentración de Flavonoides en un 18.4 % más que el T0. En este primer muestreo la aplicación de ácidos fenólicos promovió un mayor contenido de Flavonoides en las hojas. En el segundo muestreo (31 ddt), se encontraron diferencias significativas y el tratamiento AFD indujo la mayor concentración de Flavonoides en un 33 % más que el T0. Así también se encontró diferencia significativa en el último muestreo (92 ddt), donde el tratamiento AFD presentó el menor contenido de flavonoides en un 39.3 % menos que el tratamiento testigo. En fruto los tratamientos no provocaron cambios en la concentración de Flavonoides Totales.

Los flavonoides son antioxidantes no enzimáticos que incrementan su síntesis y concentración en plantas que crecen bajo condiciones de estrés (Appel, 2004). La importancia de estos compuestos, se debe a que pueden actuar como eliminadores de ROS, ofreciendo de esta manera, protección contra las tensiones bióticas y abióticas (Shi et al., 2015). Lo anterior concuerda con lo observado a los 92 ddt, donde el tratamiento Cmm presentó el mayor contenido de flavonoides, debido a la situación de estrés en la que se encontraba, en este mismo muestreo, la aplicación de ácidos fenólicos redujo el contenido de flavonoides en los tratamientos con estrés biótico, tal como lo podemos corroborar en los tratamientos AFAD, AFA y AFD donde la reducción fue de 19.3, 33.3 y 48.7 % con respecto al tratamiento Cmm. Esta reducción probablemente sea porque algunos ácidos fenólicos actúan como toxinas contra ciertos patógenos, reduciendo el nivel de estrés en la planta y como consecuencia la concentración de flavonoides (Maham et al., 2018).

En el primer muestreo (15 ddt) no se encontraron diferencias significativas en el contenido de Fenoles Totales (Tabla 2). En el segundo muestreo (31 ddt) hubo

diferencias significativas, el T0 solo fue diferente al tratamiento AFAD, tratamiento que presentó 20 % menos contenido de Fenoles Totales con respecto al T0. A los 92 ddt también se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, el T0 no fue diferente a ningún tratamiento. En la medición realizada en fruto los tratamientos indujeron diferencias significativas. Los tratamientos AFD, Cmm, AF y AFAD presentaron 37.5, 47.1, 50.5 y 53 % menos concentración de Fenoles Totales.

Los compuestos fenólicos cumplen funciones de defensa en las plantas, ayudan a hacer frente a factores bióticos y abióticos (Lu *et al.*, 2015). Estos compuestos tienen una importancia fisiológica y morfológica para las plantas, ya que poseen propiedades como antioxidantes y antimicrobianos (Balasundram *et al.*, 2006). No se observó una tendencia en la concentración de compuestos fenólicos en las diferentes fechas de muestreo, lo cual probablemente se deba a que los niveles de los compuestos fenólicos en la planta dependa más de factores externos que de los mismos tratamientos, tal como lo menciona Marguez-Garcia *et al.* (2009) que los niveles de los compuestos fenólicos en la planta, depende de los tiempos de muestreo y las condiciones del medio ambiente. Diversos autores reportan que los compuestos fenólicos se encuentran asociados al sistema de protección antioxidante, ya que hay un incremento en la producción y contenido de los compuestos fenólicos, ante factores de estrés biótico y abiótico (estrés oxidativo) (Treutter, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación no corresponden a los reportados, por lo que podemos inferir que la aplicación de ácidos fenólicos no provocó diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos.

Tabla 2. Contenido de Glutación Reducido, Flavonoides y Fenoles totales en hojas y frutos de tomate con aplicaciones de ácidos fenólicos.

Tratamiento	GSH (Glutación Reducido) (mM de GSH por mg de proteínas totales)			
	15 DDT (Hoja)	31 DDT (Hoja)	92 DDT (Hoja)	90 DDT (Fruto)
T0	2.38 a	2.42 b	2.98 a	0.82 abc

AFA	1.99 a	2.05 b	2.94 a	1.17 a
AFD	2.38 a	2.37 b	2.60 a	0.76 bc
AFAD	2.74 a	2.43 b	2.33 a	0.77 bc
AF	2.74 a	3.83 a	2.55 a	0.61 c
Cmm	2.74 a	2.90 ab	3.38 a	1.06 ab
Tratamiento	Flavonoides (mg EQ 100 g⁻¹ PS)			
	15 ddt (Hoja)	31 ddt (Hoja)	92 ddt (Hoja)	90 ddt (Fruto)
TO	344.6 b	361.5 b	472.4 ab	107.0 a
AFA	408.2 a	400.6 ab	372.3 cd	126.0 a
AFD	344.6 b	481.1 a	286.5 d	122.6 a
AFAD	377.7 ab	366.4 ab	451.1 bc	129.3 a
AF	377.7 ab	340.2 b	413.3 bc	126.2 a
Cmm	377.7 ab	349.0 b	559.0 a	134.3 a
Tratamiento	Fenoles Totales (mg EAG 100 g⁻¹ PS).			
	15 ddt (Hoja)	31 ddt (Hoja)	92 ddt (Hoja)	90 ddt (Fruto)
TO	160.5 a	238.5 a	218.1 ab	133.5 a
AFA	143.0 a	221.9 ab	204.8 ab	156.2 a
AFD	160.5 a	211.2 ab	224.2 a	83.4 b
AFAD	133.5 a	190.7 b	194.4 ab	62.7 b
AF	133.5 a	216.4 ab	190.8 b	66.0 b
Cmm	133.5 a	207.3 ab	193.8 ab	70.6 b

ddt: días después del trasplante. T0: Testigo absoluto. AFA: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos antes de la inoculación con *Clavibacter*. AFD: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis*. AFAD: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos antes y después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis*. AF: Plantas solo con aplicación de ácidos fenólicos. Cmm: Plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis*.

Capacidad Antioxidante

En el primer muestreo (15 ddt), se encontró diferencia significativa para la variable capacidad antioxidante (ABTS) (Tabla 3), donde los tratamientos AFAD, AF, y Cmm presentaron 19 % más actividad que el tratamiento testigo. En hoja, a los 31 y 92 ddt y en fruto (90 ddt) se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, el testigo no fue diferente significativamente a ningún otro tratamiento. La menor capacidad antioxidante se registró en el tratamiento AFAD.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de capacidad antioxidante por DPPH, en todos los muestreos realizados tanto en hoja como en fruto se encontraron diferencias significativas. En el primer muestreo (15 ddt) la aplicación de ácidos fenólicos aumentó la capacidad antioxidante, tal como se puede observar en el tratamiento AFA al presentar un 19.2 % más capacidad antioxidante que el T0. A los 31 ddt aunque hubo diferencias entre tratamientos, la aplicación de ácidos fenólicos no provocó cambios en la capacidad antioxidante, ya que los tratamientos donde se aplicaron ácidos fenólicos no fueron diferentes al T0. En el muestreo realizado a los 92 ddt los tratamientos AFD y AFAD presentaron la mayor capacidad antioxidante en un 22.6 y 18.5 % más con respecto al T0. En fruto aunque hubo diferencias entre tratamientos, el T0 no fue diferente a ningún otro tratamiento.

Tabla 3. Capacidad antioxidante determinada por ABTS y DPPH en hojas y frutos de tomate con aplicaciones de ácidos fenólicos.

Tratamiento	ABTS							
	15 ddt (Hoja)		31 ddt (Hoja)		92 ddt (Hoja)		90 ddt (Fruto)	
	TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC
TO	42.0 b	340.7 b	52.4 ab	696.6 ab	58.2 ab	894.6 ab	35.1 ab	137.8 ab
AFA	43.1 b	378.4 b	55.6 a	805.3 a	61.4 ab	1004.5 ab	34.6 ab	129.1 ab
AFD	42.0 b	340.7 b	49.1 ab	585.6 ab	59.3 ab	933.5 ab	34.8 ab	132.3 ab
AFAD	50.0 a	616.5 a	41.0 b	307.5 b	48.2 b	553.6 b	31.8 b	97.2 b
AF	50.0 a	616.5 a	53.4 a	731.0 a	53.5 ab	734.4 ab	40.2 a	227.3 a
Cmm	50.0 a	616.5 a	49.5 ab	598.2 ab	69.9 a	1295.2 a	35.2 ab	136.3 ab
Tratamiento	DPPH							
	15 ddt (Hoja)		31 ddt (Hoja)		92 ddt (Hoja)		90 ddt (Fruto)	
	TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC
TO	46.8 c	409.6 c	45.3 ab	342.2 ab	34.0 c	219.2 c	25.6 ab	393.7 ab
AFA	55.8 a	821.9 a	45.9 ab	369.9 ab	38.6 ab	433.3 ab	26.3 ab	425.4 ab
AFD	46.8 c	409.6 c	40.7 b	132.0 b	41.7 a	572.1 a	21.8 b	219.2 b
AFAD	52.2 b	658.0 b	56.7 a	865.5 a	40.3 a	508.7 a	22.2 b	235.1 b
AF	52.2 b	658.0 b	53.0 ab	695.0 ab	36.3 bc	326.3 bc	30.1 a	599.9 a
Cmm	52.2 b	658.0 b	41.2 b	155.8 b	34.6 c	227.2 c	28.5 a	524.5 a
c.v.	4.4	18.0	21.9	111.2	5.7	26.4	13.3	39.5

ABTS: (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)). DPPH: (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). ddt: días después del trasplante. TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente Trolox. VCEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente Vitamina C. T0: Testigo absoluto. AFA: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos antes de la inoculación con *Clavibacter*. AFD: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis*. AFAD: Plantas con

aplicación de ácidos fenólicos antes y después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis*. AF: Plantas solo con aplicación de ácidos fenólicos. Cmm: Plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis*.

Los antioxidantes son compuestos producidos por organismos aerobios para contrarrestar el estrés oxidativo causado por un desequilibrio de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Halliwell, 2006), las plantas incrementan la producción de ROS ante tensiones ambientales. Algunos autores reportan que el contenido de compuestos fenólicos como los flavonoides son los compuestos más comunes en frutas y vegetales, que tienen una fuerte capacidad antioxidante y esta capacidad antioxidante presentan una alta correlación con sustancias fenólicas (Gaviria *et al*, 2012). Con esta información podemos inferir que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante.

En las hojas de plantas de tomate se encontró mayor actividad antioxidante con respecto a los frutos, esto posiblemente se explique debido a que en las hojas hay mayor número de cloroplastos, las cuales desarrollan fotosíntesis, proceso que genera ROS (Blanke y Lenz, 1989). La actividad antioxidante se correlaciona positivamente con el contenido de compuestos fenólicos, y de forma más específica Edet *et al*. (2015) reportan que los valores de antioxidantes en frutos (Hidrofílicos) se correlacionaron significativamente con el contenido de flavonoides, compuestos fenólicos y ácido ascórbico.

Los resultados del contenido de H_2O_2 en hojas se presentan en la Tabla 4. Solo hubo diferencia estadística en el segundo muestreo (31 ddt). La aplicación de ácidos fenólicos a plantas sin estrés indujo 4.65 % más contenido de H_2O_2 en las hojas que en el T0.

Entre las principales especies reactivas de oxígeno (ROS), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) interviene en el metabolismo de las plantas, el H_2O_2 en bajas concentraciones modula muchos procesos biológicos y fisiológicos en las

plantas; mientras que altos niveles puede causar daños a las estructuras celulares, con graves consecuencias, por lo cual, los niveles de H₂O₂ deben estar estrictamente regulados (Ozyigit *et al.*, 2016). El H₂O₂ es una ROS endógeno conocido por desempeñar un doble papel en las plantas, donde es benéfica a bajas concentraciones, pero letal en niveles más altos (Petrov y Van Breusegem, 2012). El H₂O₂ también interviene en la fotosíntesis, el ciclo celular, el desarrollo, la senescencia y la apoptosis (Mittler *et al.*, 2004). Debido a que en el tratamiento AFA (31 ddt) presentó un mayor contenido de H₂O₂, se puede inferir que la aplicación de ácidos fenólicos a plantas sin estrés, puede inducir un incremento en el contenido de H₂O₂.

Tabla 4. Peróxido de Hidrogeno (PH).

Tratamiento	PH (mM de H ₂ O ₂ g ⁻¹ PS)		
	15 ddt (Hoja)	31 ddt (Hoja)	92 ddt (Hoja)
TO	478.9 a	522.4 b	536.1 a
AFA	485.1 a	538.3 ab	545.9 a
AFD	478.9 a	533.6 ab	551.1 a
AFAD	502.2 a	543.1 ab	553.4 a
AF	502.2 a	547.9 a	539.0 a
Cmm	502.2 a	533.1 ab	538.5 a

PH: Peróxido de Hidrogeno, ddt: días después del trasplante. T0: Testigo absoluto. AFA: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos antes de la inoculación con *Clavibacter*. AFD: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis*. AFAD: Plantas con aplicación de ácidos fenólicos antes y después de la inoculación con *Clavibacter michiganensis*. AF: Plantas solo con aplicación de ácidos fenólicos. Cmm: Plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis*.

Conclusiones

Estresar las plantas con *Clavibacter michiganensis* con o sin aplicaciones de ácidos fenólicos disminuye los niveles de proteínas con respecto al T0. Se encontró un mayor contenido de proteínas en frutos que en hojas.

La aplicación de ácidos fenólicos no modificó la actividad enzimática CAT ni APX en hoja ni en fruto. En hoja aumentó la actividad SOD y PAL, no promovió

cambios en la actividad GPX. Las aplicaciones de ácidos fenólicos, redujeron la actividad SOD y GPX en fruto, sin modificaciones en la actividad enzimática de PAL. Al inocular las plantas con *Clavibacter michiganensis* aumentó la actividad de las enzimas CAT y PAL en hoja y una disminución de la actividad enzimática GPX en fruto.

La aplicación de ácidos fenólicos no modificó la concentración de GSH y Flavonoide en hojas y en frutos, sin embargo, es importante mencionar que en la etapa final del ciclo de la planta se observó una reducción en el contenido de Flavonoides por efecto de los ácidos fenólicos. No se observaron cambios en el contenido de compuestos fenólicos en hoja, en fruto estos disminuyeron por las aplicaciones de ácidos fenólicos. La inoculación con *Clavibacter michiganensis* no modificó la concentración de GSH y Flavonoide en hojas y en frutos y la concentración de fenoles totales disminuyó solo en fruto.

La aplicación de ácidos fenólicos o la inoculación con *Clavibacter michiganensis* no modificó la capacidad antioxidante en hoja ni en fruto, solo en la medición por DPPH se observó un incremento en la capacidad antioxidante por efecto de los ácidos fenólicos.

La aplicación de ácidos fenólicos a plantas sin estrés, puede inducir un incremento en el contenido de H₂O₂.

Referencias

- Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M. L. & Aquino-Martínez, J. G. (2017). Inhibición in vitro de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.). *Revista mexicana de fitopatología*, 35(2), 170-185. doi: 10.18781/r.mex.fit.1611-1
- Appel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*, 55, 373–399.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A. & Lergret, P. (1994). Standardisation dun extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. Pharm. Belgique*, 49, 462-468.

- Asada, K. (1999). The water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601-639. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.601
- Asada, K. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355, 1419–1431.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141, 391–396.
- Auraiporn, P., Porntip, S., Charassri, N. & Korakot, N. (2018). Expression profile of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and phenolic content during early stages of graft development in bud grafted *Hevea brasiliensis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14, 88-95. doi:10.1016/j.bcab.2018.02.010
- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 99, 191–203.
- Baraldi, R., Bertazza, G., Fontana, A. R., Murcia, G., Pontin, M. A. & Piccoli, P. N. (2017). ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. *Phytochemistry*, 135, 34-52. doi:10.1016/j.phytochem.2016.12.007
- Bellaloui, N. (2012). Soybean seed phenol, lignin, and isoflavones partitioning as affected by seed node position and genotype differences. *Food and Nutrition Sciences*, 3(4), 447-454. doi:10.4236/fns.2012.34064
- Blanke, M. M. & Lenz, E. (1989). Fruit photosynthesis. *Plant Cell Environment*, 12(1), 31-46.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.
- Cansev, A., Gulen, H. & Eris, A. (2011). The activities of catalase and ascorbate peroxidase in olive (*Olea europaea* L. Cv. Gemlik) under low temperature stress. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52(2), 113-120. doi: 10.1007/s13580-011-0126-4

- CAYMAN. (2017). Superoxide Dismutase Assay Kit Item № 706002. Visto en <https://www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf>
- Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M. M., Romero, L. & Ruiz, J. M. (2012). Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants. *J Bot*, 2012, 1-17. doi:10.1155/2012/726206
- Diao, Y., Xu, H., Li, G., Yu, A., Yu, X. & Hu, W. (2014). Cloning a glutathione peroxidase gene from *Nelumbo nucifera* and enhanced salt tolerance by overexpressing in rice. *Mol. Biol. Rep*, 41, 4919–4927. doi: 10.1007/s11033-014-3358-4
- Dubreuil-Maurizi, C. & Poinssot, B. (2012). Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant Signal Behav*, 7, 210-212.
- Edet, E. E., Ofem, J. E., Igile, G. O., Ofem, O. E., Zainab, D. B., & Akwaowo, G. (2015). Antioxidant capacity of different African seeds and vegetables and correlation with the contents of ascorbic acid, phenolics and flavonoids. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(13), 454-461.
- Feng, X., Lai, Z., Lin, Y., Lai, G. & Lian, C. (2015). Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao (AAA group). *BMC Genomics*.16: 823. doi: 10.1186/s12864-015-2046-7
- Flohé, L. & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105, 114–120.
- Flores-Torres, L. M., Flores-Olivas, A., Ochoa-Fuentes, Y. M., López -Arroyo, J. I., Olalde-Portugal, V., Benavides-Mendoza, A., González-Morales, S. & Zamora-Villa, V. M. (2017). Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(2), 314-325.
- Foyer, C. H. & Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ*, 29, 1056–107.

- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R. & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2), 179-191. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.07.011
- Gaviria, M. C., Hernández, A. J., Lobo, A. M., Medina, C. C. & Rojano, B. (2012). Cambios en la Actividad Antioxidante en Frutos de Mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) durante su Desarrollo y Maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65 (1), 6487-6495.
- Gill, S. S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141, 312–322. doi: 10.1104/pp.106.077073.
- Herbette, S., de Labrouhe, D. T., Drevet, J. R. & Roeckel-Drevet, P. (2011). Transgenic tomatoes showing higher glutathione peroxydase antioxidant activity are more resistant to an abiotic stress but more susceptible to biotic stresses. *Plant Sci*, 180, 548–553. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.12.002
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. & Schaad, N. W. (2004). Reclassification of the Xanthomonads Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(6), 755-762. doi: 10.1078/0723202042369884.
- Jones, J. D. & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444 7117), 323-9.
- Kun, F., Jiahong, Y., Yuan, C., Meiyang, R. R., Rongqing, W., Qingjing, Y., Guozhi, Z., Zhimiao, Li., Zhuping, Y., Yuejian, Y., Qingsong, Z. & Hongjian, W. (2016). The SOD Gene Family in Tomato: Identification, Phylogenetic Relationships, and Expression Patterns. 7: 1279. doi: 10.3389/fpls.2016.01279

- Lu, L., Wang, J., Zhu, R., Lu, H., Zheng, X. & Yu, T. 2015. Transcript profiling analysis of *Rhodosporidium paludigenum* mediated signalling pathways and defense responses in mandarin orange. *Food Chemistry*, 172: 603-612.
- Maham, S., Muhammad, K. & Muhammad, S. (2018). Differential Responses of Plants to Biotic Stress and the Role of Metabolites. En *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*. Academic Press. pag: 69-87.
- Marguez-Garcia, B.; Fernandez-Angeles, M. & Cordoba, F. (2009). Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *Bioresour Technol* 100(1): 446–451.
- Michalak A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol J Environ Stud*, 15:523–53.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 84. 407–412.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7, 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Breusegem, F. V. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*. 9, 490–498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Mittler, R. & Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annu. Rev. Plant Biol*, 61, 443–462. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112116
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22, 867–880.
- Navrot, N., Roubier, N., Gelbaye, E. & Jacquot, J-P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol Plant*, 129, 185–195.

- Nsor-Atindana, J., Zhong, F., Mothibe, K. J., Bangoura, M. L. & Lagnika, C. (2012). Quantification of total polyphenolic content and antimicrobial activity of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Beans Shells. *Pakistan J. Nurt*; 11 (7), 574 - 579.
- Ocaña-Romo, C. R. (2008). En crecimiento. Desarrollo de invernaderos en México. www.hortalizas.com.
- Ozyigit, I. I., Filiz, E., Vatansever, R., Kurtoglu, K. Y., Koc, I., Öztürk, M. X. & Anjum, N. A. (2016). Identification and Comparative Analysis of H₂O₂-Scavenging Enzymes (Ascorbate Peroxidase and Glutathione Peroxidase) in Selected Plants Employing Bioinformatics Approaches. *Frontiers in Plant Science*, 7, 301. doi: 10.3389/fpls.2016.00301
- Perez, O. E., de la Noval, B. M., Martínez, C. B., Torres, de la N. W., Medina, C. A., Hernández, A. H. & León, O. (2015). Inducción de mecanismos de defensa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) micorrizadas frente al ataque de *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm. *Cultivos Tropicales*. 36(1), 98-106.
- Petrov, V. D. & Van, B. F. (2012). Hydrogen peroxide - a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants* 2012:pls014. doi: 10.1093/aobpla/pls014
- Pignocchi, C., Fletcher, J. M., Wilkinson, J. E., Barnes, J. D., & Foyer, C. H. (2003). The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology*. 132, 1631–1641.
- Ramos, S. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G.; Castro, E. M., Ávila, F. W., Carvalho, G. S., Bastos, C. E. A. & Oliveira C. (2010). Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant soil environ*, 56(12), 584-588. <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/31992.pdf>
- Rueda-Barrientos, M. C., Martínez-Fernández, E., Villegas-Torres, O. G., Sainz-Aispuro, M. J., Peña-Chora, G., Hernández-Velazquez, V. M. & Hernández-Romano, J. (2017). Sensibilidad de la prueba de

- InmunoStrips® en la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate. *ActA Agrícola y pecuaria*. 3(2), 50-57.
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R. & Biswas, P. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu–chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *Int. J. Biol. Macromol.* 75: 346–353.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Atlas Agroalimentario 2017. http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017
- Shi, J. X., Cui, M. H., Yang, L., Kim, Y. J. & Zhang, D. B. (2015). Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. *Trends Plant Sci*, 20, 741–753. doi:10.1016/j.tplants.2015.07.010
- Steiner, A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and soil*, 15 (2), 134-154. doi: 10.1007/BF01347224
- Sultana, F. B. & Anwar, M. A. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts *Molecules*. 14, 2167-2180.
- Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A & Naliwajski, M. R. (2012). Effect of lphenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *Vitr Cell Dev Biol – Plant*, 48(5), 555-564. doi:10.1007/s11627-012-9443-2.
- Treutter, D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology* 7(6): 581-591.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidilitz, H. K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inze, D. & Van Breusegem, F. (2004). Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 39, 45–58.

- van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol*, 44, 135-162.
- Vellosillo, T., Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M. & Castresana, C. (2010). Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiol*, 154, 444–448.
- Xu, G., Ye, X., Liu, D., Ma, Y. & Chen, J. (2008). Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuyou) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 382–389. doi:10.1016/j.jfca.2008.03.003
- Xue, T., Hartikainen, H., & Piironen, V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*, 237(1), 55-61. doi: 10.1023/A:1013369804867
- Yu, Z. & Dahlgren, R. A. (2000): Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *J. Chem. Ecol*, 26, 2119-2140.
- Wang, B., Lüttge, U. & Ratajczak, R. (2004). Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C3, halophyte *Suaeda salsa* L. *J. Plant Physiol*, 161, 285–293. doi: 10.1078/0176-1617-01123
- Wang, X., Fang, G. & Yang, J. (2017). A Thioredoxin-Dependent Glutathione Peroxidase (OsGPX5) Is Required for Rice Normal Development and Salt Stress Tolerance. *Plant Mol Biol Rep*, 35, 333. doi: 10.1007/s11105-017-1026-2

CONCLUSIONES GENERALES

La aplicación de ácidos fenólicos no tiene efectos sobre la morfología y fisiología del cultivo ya que no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados.

Los ácidos fenólicos disminuyen significativamente la incidencia y severidad de Cmm, al retrasa la incidencia hasta 20 días y reducir la severidad hasta un 35.2%, por lo cual el uso de éstos compuestos puede ser una alternativa para el manejo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el cultivo de tomate.

En las variables histológicas se encontró que la aplicación de ácidos fenólicos induce cambios en las diferentes estructuras de la planta, lo cual puede aumentar la tolerancia al ataque de los patógenos como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

La aplicación de ácidos fenólicos o la inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* afectan la actividad enzimática en las hojas de tomate, y el estresar las plantas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reduce la concentración de proteínas en hojas.

La aplicación de ácidos fenólicos redujo la actividad de las enzimas catalasa, ascorbato peroxidasa (APX) y fenilalanina amonio liasa (PAL), pero incrementó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la capacidad antioxidante por ABTS.

En base a los resultados obtenidos proponemos el estudio de los ácidos fenólicos en el control de otros patógenos en diferentes cultivos.

REFERENCIAS

- Ahmad, P. y Prasad, M. N. V. 2012. Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. Department of Plant Sciences. University of Hyderabad, India. 509 pp.
- Adelakun, O. E.; Kudanga, T.; Parker, A.; Green, I. R.; Roes-Hill, M. L. y Burton, S. G. J. 2012. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 74: 29-35.
- Airaki, M.; Leterrier, M.; Mateos, R. M.; Valderrama, R.; Chaki, M.; Barroso, J. B.; del Rio, L. A.; Palma, J. M. and Corpas, F. J. 2012. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell Environ*. 35: 281–295.
- Anderson, O.M. y Jordheim, M. 2006. The anthocyanins. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O. M. y Markham, K. R. Eds. CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA. pp. 472–551. 4.
- Apolonio-Rodríguez, I.; Franco-Mora, O.; Salgado-Siclán, M. L. and Aquino-Martínez, J. G. 2017. Inhibición in vitro de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.). *Revista mexicana de fitopatología*. 35(2): 170-185. Doi: 10.18781/r.mex.fit.1611-1.
- Atkinson, N.J.; Urwin, P.E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. *J. Exp. Bot*. 63: 3523–3543.
- Austin, M. B. y Noel, J. P. 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep*. 20: 79–110.
- Baraldi, R.; Bertazza, G.; Fontana, A. R.; Murcia, G.; Pontin, M. A.; and Piccoli, P. N. 2017. ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. *Phytochemistry*. 135: 34-52. doi:10.1016/j.phytochem.2016.12.007.
- Baysal, Ö.; Soyulu, E. M. y Soyulu, S. 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*. Reino Unido. *Plant Pathol*. 52(6) :747-753.
- Balestra, G. M.; Heydari, A.; Ceccarelli, D.; Ovidi, E. and Quattrucci, A. 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protec*. 28:807-811.

- Bellaloui, N. 2012. Soybean seed phenol, lignin, and isoflavones partitioning as affected by seed node position and genotype differences. *Food and Nutrition Sciences*. 3(4): 447-454. doi:10.4236/fns.2012.34064.
- Caldwell, M. M.; Ballaré, C. L.; Bornman, J. F.; Flint, S. D.; Bjorn, L. O.; Teramura, A. H.; Kulandaivelu, G. y Tevini, M. 2003. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2: 29–38.
- Carletti, P.; Masi, A.; Wonisch, A.; Grill, D.; Tausz, M. y Ferretti, M. 2003. Changes in antioxidant and pigment pool dimensions in UV-B irradiation maize seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 50:149–157.
- Carpita, N. y McCann, M. 2000. The cell wall. In: Buchanan, et al., editors. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville MD: American Society of Plant Physiologists. pp. 52–108.
- Cervilla, L. M.; Blasco, B.; Rios, J. J.; Rosales, M. A.; Sanchez-Rodriguez, E.; Rubio-Wilhelmi, M. M.; Romero, L. and Ruiz, J. M. 2012. Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants. *J Bot.* doi:10.1155/2012/726206.
- Chang, R. J.; Ries, S. M. y Pataky, J. K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*. 81 (10): 1276-1281. DOI: 10.1094/Phyto-81-1276
- Cheynier, V., 2012. Phenolic compounds, from plants to foods. *Phytochem. Rev.* 11: 153–177.
- Cheynier, V.; Comte, G.; Davies, K. M.; Lattanzio, V. y Martens, S. 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* 72: 1–20.
- Cih-Dzul, I. R.; Jaramillo-Villanueva, J. L.; Tornero-Campante, M. A. y Schwentesius-Rindermann, R. 2011. Caracterización de los sistemas de producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Estado de Jalisco, México. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 14 (2): 501-512.
- Cooksey, D. A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plantpathogenic bacteria. *Annual Rev. Phytopathol.* 28:201-219. DOI: 10.1007/s10658-016-1035-2.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites) In: Buchanan, et al., editors. *Biochemistry andmolecular biology of plants*. Rockville MD: American Society of Plant Physiologists. pp. 1250–1318.
- De León, L.; Siverio, F.; López, M. M. and Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* a seed borne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant dis.* 95(11):1328-1338.

- Dixon, R. A. y Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plan Cell.* 7 (7): 1085–1097.
- Dixon, R. A.; Achnine, L.; Kota, P.; Liu, C. J.; Reddy, M. S. S. y Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology.* 3: 371–390. doi:10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x
- EPPO. 2010. Diagnostics *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*. *Bulletin.* 40:353-364.
- Flores, J. B.; Puente, E. O. R.; Félix, E. A.; Ponce, J. F.; Cruz, M.; Juárez, O. G. y Ortega, A. M. G. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *México. Rev. Fitotec. Mex.* 32(4):319-326.
- Gartemann, K. H.; Kirchner, O.; Engemann, J.; Gräfen, I.; Eichenlaub, R. & Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology,* 106(2): 179-191. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.07.011
- Glynn, C. Herms, D. A. Orians, C. M. Hansen, R. C. Larsson, S. 2007. Testing the growth-differentiation balance hypothesis: Dynamic responses of willows to nutrient availability. *New Phytol.* 176: 623–634.
- Gratao, P. L.; Polle, A.; Lea, P. L. and Azevedo, R. A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32:481–494.
- Grotewold, E. 2006. *The Science of Flavonoids.* New York, NY: Springer.
- Gülçin, Ý.; Oktay, M.; Kireççi, E. y Küfreviođlu, Ö. Ý. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. *Food Chemistry.* 83: 371–382.
- Hadas, R.; Kritzman, G.; Klietman, F.; Gefen, T. and Manulis, S. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathol.* 54:643-9. DOI: 10.1111/ppa.12454.
- Hanssen, I.; Lapidot, M.; and Thomma, B. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *The American Phytopathological Society.* 23(5), 539-548. doi: 10.1094/MPMI-23-5-0539.
- Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* spp., opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Microbiology Review.* 2: 43-56.
- Kisa, D.; Elmastaş, M.; Öztürk, L. y Kayir, Ö. 2016. Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress. *Appl Biol Chem.* 59(6): 813–820.
- Kováčik, J.; Klejdus, B.; Bačkor, M. and Repčák, M. 2007. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Sci.* 172: 393–399.

- Kun, F.; Jiahong, Y.; Yuan, C.; Meiyong, R.; Rongqing, W.; Qingjing, Ye.; Guozhi, Z.; Zhimiao, Li.; Zhuping, Y.; Yuejian, Y.; Qingsong, Z. and Hongjian, W. 2016. The SOD Gene Family in Tomato: Identification, Phylogenetic Relationships, and Expression Patterns. 7: 1279. doi: 10.3389/fpls.2016.01279
- Jones, J. B.; Lacy, G. H.; Bouzar, H.; Stall, R. E. and Schaad, N. W. 2004. Reclassification of the Xanthomonads Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(6): 755-762. doi: 10.1078/0723202042369884.
- Lattanzio, V.; Kroon, P. A.; Quideau, S.; Treutter, D. 2008. Plant phenolics Secondary metabolites with diverse functions. In *Recent Advances in Polyphenol Research*; Daayf, F.; Lattanzio, V. Eds.; Wiley-Blackwell Publishing: Oxford, UK. Volume 1, pp. 1–35.
- Lillo, C.; Lea, U. S. and Ruoff, P. 2008. Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ.* 31: 587–601.
- Liu, H. R. 2007. Whole grain phytochemicals and health. *J. Cereal Sci.* 46: 207-219.
- Maddox, C. E.; Laur, L. M. and Tian, L. 2010. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology.* 60(1): 53-58. doi: 10.1007/s00284-009-9501-0.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. y Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747.
- Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 17 (6): 271-278.
- Mazza, C. A.; Boccalandro, H. E.; Giordano, C. V.; Battista, D.; Scopel, A. L. and Ballaré, C. L. 2000. Functional significance and induction by solar radiation of ultra-violet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiol.* 122: 117–125.
- Mendoza, L.; Yáñez, K.; Vivanco, M.; Melo, R. y Cotoras M. 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 43:360-364. doi:10.1016/j.indcrop.2012.07.048
- Mercure, S. A.; Daoust, B. and Samson, G. 2004. Causal relationship between growth inhibition, accumulation of phenolic metabolites, and changes of UV-induced fluorescences in nitrogen-deficient barley plants. *Can. J. Bot.* 6: 815–821.
- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol J Environ Stud.* 15:523–53.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M. and Breusegem, F. V. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490–498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009.

- Muñoz, J. A. M.; Ramos-Escudero, D. F.; Alvarado-Ortiz, U. C. and Castañeda, C. B. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 73(3): 142-149.
- Nackz, M. y Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1523-1542.
- Nawrocka, J.; Malolepsza, U. 2013. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, 67: 149-156.
- Neilson, E. H.; Goodger, J. Q. D.; Woodrow, I. E. and Møller, B. L. 2013. Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science* 18: 250258. doi:10.1016/j.tplants.2013.01.001.
- Ortega-Martínez, L. D.; Sánchez-Olarte, J.; Díaz-Ruíz, R. y Ocampo-Mendoza, J. 2010. Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Ra Ximhai* 6: 365-372.
- Pereira, A. 2016. Plant abiotic stress challenges from the changing environment. *Front. Plant Sci.* 7:1123. Doi: 10.3389/fpls.2016.01123.
- Rivero, R. M.; Ruiz, J. M.; García, P. C.; López-Lefebvre, L. R.; Sánchez, E. y Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 160 :315-321.
- Robbins, J. R. 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (10): 2866–2887. doi: 10.1021/jf026182t.
- Rueda-Barrientos, M. C.; Martínez-Fernández, E.; Villegas-Torres, O. G.; Sainz-Aispuro, M. J.; Peña-Chora, G.; Hernández-Velazquez, V. M. y Hernández-Romano, J. 2017. Sensibilidad de la prueba de InmunoStrips® en la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate. *ActA Agrícola y pecuaria*. 3 (2): 50-57.
- Saleem, M. Y.; Akhtar, K. P.; Iqbal, Q.; Asghar, M. y Shoaib, M. 2015. Development of high yielding and blight resistant hybrids of tomato. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 52: 293-299.
- Scalbert, A. y Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. 130: 2073S-2085S.
- Scheible, W. R.; Morcuende, R.; Czechowski, T.; Fritz, C.; Osuna, D.; Palacios-Rojas, N.; Schindelasch, D.; Thimm, O.; Udvardi, M. K. and Stitt, M. 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136: 2483–2499.
- Schützendübel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53: 1351–1365.

- Sepúlveda-Jiménez G. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3): 354-356.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. Atlas Agroalimentario 2017. http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017.
- Shahidi, F.; y Nacz, M. 2004. Phenolic compounds in fruits and vegetables. In: Shahidi, F., and M. Nacz (eds). *Phenolics in Foods and Nutraceuticals*. CRC Press. pp: 131-239.
- Srinivasan, M.; Sudheer, A. R. and Menon, V. P. 2007. Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 40: 92-100.
- Stalikas, C. D. 2007. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 30: 3268-3295.
- Suzuki, N.; Koussevitzky, S.; Mittler, R. and Miller, G. 2012. ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* 35: 259–270. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x.
- Tattini, M.; Gravano, E.; Pinelli, P.; Mulinacci, N. and Romani, A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist* 148: 69-77.
- Valueva, T. A. and Mosolov, V. V. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Rusia. Biochem.* 69(11):1305-1309.
- Vigani, G.; Zocchi, G.; Bashir, K.; Phillipar, K. and Briat, J. F. 2013. Cellular iron homeostasis and metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* 4: 6–8.
- Vitaglione, P.; Napolitano, A. y Fogliano, V. 2008. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science and Technology.* 19: 451-463.
- Willcox, J. K.; Catignani, G. L. y Lazarus, S. 2003. Tomatoes and cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci.* 43(1): 1-8.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* 126: 485–493.
- Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol.* 5 (3): 218-223.

- Xu, G.; Ye, X.; Liu, D.; Ma, Y. and Chen, J. 2008. Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuyou) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21: 382–389. doi:10.1016/j.jfca.2008.03.003
- Yuliar, N. Y. A. and Toyota, K. 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia Solanacearum*. *Microbes. Environ.* 30(1):1-11. doi:10.1264/jsme2.ME14144.