



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

MECANISMOS DE RESISTENCIA PARA EL MANEJO DE *Monilinia fructicola* en *Prunus persica*.

ISABEL NATIVITAS LIMA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: **MECANISMOS DE RESISTENCIA PARA EL MANEJO DE *Monilinia fructicola* en *Prunus persica***, realizada por la alumna: Isabel Nativitas Lima bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

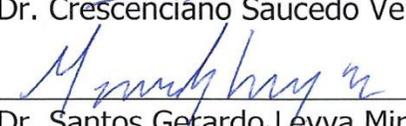
DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A) 
Dr. Guillermo Calderón Zavala

ASESOR (A) 
Dr. José Isabel Cortes Flores

ASESOR (A) 
Dr. Crescenciano Saucedo Veloz

ASESOR (A) 
Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2021

**MECANISMOS DE RESISTENCIA PARA EL MANEJO DE *Monilinia fructicola* EN
*Prunus persica***

Isabel Nativitas Lima, D. C.

Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

La pudrición café causada por *Monilinia* spp. es una de las enfermedades más destructivas en durazno. Las nuevas estrategias de manejo, incluyen la comprensión de los mecanismos de resistencia de la fruta preexistentes e inducibles. Por lo tanto, la presente investigación se llevó a cabo con los siguientes objetivos: 1) estudiar el impacto de los inductores: acibenzolar-S-Methyl (ASM), fosfito de potasio y silicato de potasio en combinación con fungicidas en el manejo de *Monilinia* spp., además de su efecto en la variación en la actividad enzimática, contenido de fenoles totales y nutrimental en durazno. 2) estudiar los mecanismos de resistencia preformados mediante la evaluación de la respiración, producción de etileno, actividad antioxidante enzimática y no enzimática en las diferentes etapas de desarrollo del fruto de nectarina y su efecto en la incidencia de *Monilinia fructicola*. Para el estudio de los mecanismos de resistencia preformados se realizaron muestreos en las diferentes etapas fenológicas del fruto de nectarina, y se evaluaron los cambios en la producción de etileno, respiración, estrés oxidativo, sistema antioxidante enzimático y no enzimático por medio de técnicas de espectrofotometría y HPLC. Los resultados indicaron cambios importantes en la actividad antioxidante en la etapa S4 de desarrollo del fruto y al emplear un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), se observó una fuerte relación negativa entre el

ácido ascórbico, criptoxantina, zeaxantina e incidencia de *Monilinia fructicola*. Para evaluar el efecto de los inductores se realizaron aplicaciones precosecha y se evaluó su efecto en la severidad de *Monilinia fructicola*, en la actividad de peroxidasa, polifenoloxidasa, catalasa y fenilalanina amonio liasa, así como el contenido de fenoles y análisis nutrimental en hojas, además en postcosecha se evaluó la efectividad de los tratamientos contra *Monilinia fructicola*. De acuerdo con los resultados se observó una disminución de la ABCPE en un 70 y 24% en el primer y segundo año de evaluación, respectivamente. Los inductores incrementaron el contenido de fenoles totales y la actividad de las enzimas peroxidasa, polifenoloxidasa y catalasa, dicho incremento se mantuvo en postcosecha. La aplicación de los inductores modificó los contenidos foliares de fósforo, potasio, cobre, azufre y silicio en el primer año de evaluación, para el segundo únicamente afectó al fósforo.

Palabras clave: pudrición café, preformados, inductores, fosfito de potasio.

RESISTANCE MECHANISMS FOR THE MANAGEMENT OF *Monilinia fructicola* IN *Prunus persica*

Isabel Nativitas Lima, D. C.

Colegio de Postgraduados, 2021

ABSTRACT

The brown rot caused by *Monilinia* spp. it is one of the most destructive diseases in peach. New management strategies include understanding the pre-existing and inducible fruit resistance mechanisms. Therefore, the present investigation was carried out with the following objectives: 1) to study the impact of inducers: acibenzolar-S-Methyl (ASM), potassium phosphite and potassium silicate in combination with fungicides in the management of *Monilinia* spp., in addition to its effect on the variation in the enzymatic activity, content of total phenols and nutritional in peach. 2) To study the preformed resistance mechanisms by evaluating respiration, ethylene production, enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity in the different development stages of the nectarine fruit and its effect on the incidence of *Monilinia fructicola*. For the study of the preformed resistance mechanisms, samplings were carried out in the different phenological stages of the nectarine fruit, and the changes in ethylene production, respiration, oxidative stress, enzymatic and non-enzymatic antioxidant system were evaluated by means of spectrophotometric techniques. and HPLC. The results indicated important changes in the antioxidant activity in the S4 stage of fruit development and when using a partial least squares (PLS) regression model, a strong negative relationship was observed between ascorbic acid, cryptoxanthin, zeaxanthin and the incidence of *Monilinia fructicola*. To

evaluate the effect of the inducers, pre-harvest applications were carried out and their effect on the severity of *Monilinia fructicola*, on the activity of peroxidase, polyphenoloxidase, catalase and phenylalanine ammonium lyase, as well as the content of phenols and nutritional analysis in leaves, was evaluated. In postharvest the effectiveness of the treatments against *Monilinia fructicola* was evaluated. According to the results, a decrease in ABCPE was observed by 70 and 24% in the first and second year of evaluation, respectively. The inducers increased the content of total phenols and the activity of the enzymes peroxidase, polyphenoloxidase and catalase, this increase was maintained in postharvest. The application of the inducers modified the foliar contents of phosphorus, potassium, copper, sulfur and silicon in the first year of evaluation, but for the second year of evaluation it only affected phosphorus.

Keywords: *Monilinia fructicola*, preformed, inducers, potassium phosphite.

DEDICATORIA

A **Dios** por haberme permitido llegar a este momento. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorar la vida cada día más.

Dedico muy especialmente este trabajo a mis papás; **José Conrado Nativitas de Cristóbal**, quién es mi mayor ejemplo de superación; y **Herlinda Lima Cervantes** por enseñarme el valor del compromiso y dedicación, gracias por darme el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer a las adversidades porque Dios está siempre conmigo. A ustedes quienes con su amor, apoyo y confianza me han permitido cumplir una meta más en mi vida profesional. Por enseñarme a luchar por mis sueños, pero sobre todo, por darme una hermosa familia y la herencia más grande que cualquier ser humano pueda recibir Educación.

A toda mi familia, que de una u otra forma fueron participes en la realización de este trabajo, especialmente a mis hermanos **Araceli, Jaime, Verónica, Reyes y Susana**, quienes me han apoyado incondicionalmente, durante todo este proceso.

A mi esposo, **Moisés Camacho Tapia**, a quién admiro y respeto con todo mi corazón.

A ustedes les dedico este trabajo, con todo mi cariño, respeto y admiración.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento para mis estudios de Doctorado en Ciencias.

Al **Colegio de Postgraduados**, en especial al **Posgrado de Fruticultura** por la oportunidad de continuar mi preparación.

Al **Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA)** por darme la oportunidad de realizar mi estancia de investigación.

A mi papá **José Conrado Nativitas**, por permitirme utilizar sus huertas de durazno para la realización de los experimentos.

A los **Doctores Guillermo Calderón, Gerardo Leyva, José Isabel Cortes y Crescenciano Saucedo**, por la confianza y apoyo brindado durante la realización de esta tesis doctoral.

A los **Doctores Teresa Colinas y Joel Pineda**, por permitirme trabajar en sus laboratorios.

A los **Doctores Jordi Giné y Rosario Torres**, por ser mis profesores tutores durante la realización de mi estancia en el IRTA.

A mi hermano **Reyes** por apoyarme siempre en la fase de campo.

A mis **amigos, profesores y compañeros** del colegio de posgraduados que hicieron de mis estudios doctorales una bonita experiencia.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Objetivo general	4
Hipótesis	4
Literatura Citada	4
REVISIÓN DE LITERATURA	6
Importancia del cultivo	6
Importancia y manejo de la pudrición café	7
Mecanismos de defensa de las plantas a patógenos.	9
Inductores de resistencia	16
Literatura citada	25
CAPÍTULO I. USO DE INDUCTORES DE RESISTENCIA Y FUNGICIDAS EN EL MANEJO DE <i>Monilinia fructicola</i> EN DURAZNO EN POSTCOSECHA	32
1.1. RESUMEN	32
1.2. INTRODUCCIÓN	33
1.3. MATERIALES Y MÉTODOS	34

1.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
1.5.	CONCLUSIONES	64
1.6.	LITERATURA CITADA	65
CAPÍTULO II. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DURANTE EL DESARROLLO DE NECTARINA Y SU EFECTO EN <i>Monilinia fructicola</i>.....		70
2.1.	RESUMEN.....	70
2.2.	INTRODUCCIÓN.....	71
2.3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	72
2.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
2.5.	CONCLUSIONES	92
2.6.	LITERATURA CITADA	92
CONCLUSIONES GENERALES		97

**LISTA DE CUADROS
REVISIÓN DE LITERATURA**

Cuadro 1. Inductores de resistencia que reportan control de enfermedades (del 2010 al 2013). 17

**CAPÍTULO I. USO DE INDUCTORES DE RESISTENCIA Y FUNGICIDAS EN EL
MANEJO DE *Monilinia fructicola* EN DURAZNO EN POSTCOSECHA**

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados en campo..... 35

Cuadro 2. Análisis de varianza de los parámetros epidemiológicos de *Monilinia fructicola*, fenoles totales y actividad enzimática en frutos de durazno en postcosecha en respuesta a los factores de inductores de resistencia, dosis de fungicida y años de evaluación. 47

Cuadro 3. Análisis de varianza de los elementos minerales foliares en respuesta a los factores de inductores de resistencia y años de evaluación. 58

**CAPÍTULO II. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DURANTE EL DESARROLLO DE
NECTARINA Y SU EFECTO EN *Monilinia fructicola***

Cuadro 1. Incidencia y área bajo la curva del progreso de la enfermedad de *Monilinia fructicola* en frutos de nectarina ‘Diamond Ray’ en diferentes etapas fenológicas de su desarrollo. ¡Error! Marcador no definido.

Cuadro 2. Cambios en la actividad de compuestos antioxidante y estrés oxidativo de frutos de nectarina ‘Diamond Ray’ cosechados en diferente estado fenológicos. 87

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1. Efecto en postcosecha de las interacciones de inductores de resistencia: acibenzolar-S-Metil (●), silicato de potasio (▼), fosfito de potasio (■), sin inductor (◆) y porcentaje de fungicidas en (A) el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y (B) severidad final de Monilinia fructicola en frutos de durazno. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 32). 48
- Figura 2. Efecto en postcosecha de las interacciones de inductores de resistencia acibenzolar-S-Metil (●), silicato de potasio (▼), fosfito de potasio (■), sin inductor (◆) y los años de evaluación en (A) el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y (B) severidad final de Monilinia fructicola en durazno. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 32). 49
- Figura 3. Efecto en postcosecha de las interacciones de (A) inductores de resistencia acibenzolar-S-Metil (●), silicato de potasio (▼), fosfito de potasio (■), sin inductor (◆) y dosis de fungicidas en la tasa de incremento de Monilinia fructicola en durazno. (B) Tasa de incremento en los dos años de evaluación. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 32). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p <0.05)..... 50
- Figura 4. Efecto de la interacción de los inductores de resistencia y los años de evaluación en el contenido de fenoles totales (mg g⁻¹ p.f.) en frutos de durazno en postcosecha. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 16). 52
- Figura 5. Efecto de la interacción de inductores de resistencia con el porcentaje de fungicida en la actividad de las enzimas polifenoloxidasas, peroxidasa y catalasa en los años 2017 (A, C y E) y 2018 (B, D y F) en frutos de durazno. Cada punto representa la media y las barras verticales indican

la desviación estándar de la media (n = 16). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p <0.05).....	54
Figura 6. Contenido de fenilalanina amonio liasa (PAL) en frutos de durazno durante los dos años de evaluación. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 32). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los años (p <0.05).	57

CAPÍTULO II

Figura 1. Cambios en la producción de etileno ($\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1} \text{C}_2\text{H}_4$), respiración ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{CO}_2$) y coeficiente de respiración (RQ) durante el desarrollo de frutos de nectarina 'Diamond Ray'. Cada punto representa la media y las líneas delgadas verticales indican la desviación estándar de la media (n = 4).....	81
Figura 2.(a) Cambios en los contenidos de pigmentos totales ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y (b) carotenoides durante el desarrollo de frutos de nectarina 'Diamond Ray'. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 4).....	85
Figura 3. Correlación de mínimos cuadrados parciales (PLS) que representa la contribución de cada factor fisiológico y bioquímico (letras verdes) a la incidencia de <i>Monilinia fructicola</i> (letras azules) de nectarina 'Diamond Ray' en diferentes etapas de crecimiento fenológico. El inserto representa la gráfica de importancia variable (VIP). El número de VIP > 0.8 (línea roja discontinua) indica que los predictores son importantes para determinar los dos factores utilizados en el modelo PLS.	91

LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ISR.....	Induced Systemic Resistance, Resistencia Sistémica Inducida
SAR.....	Systemic Acquired Resistance, Resistencia Sistémica Adquirida
PR Protein	Pathogenesis-related proteins, proteínas relacionadas con la patogénesis
POD.....	Peroxidase, Peroxidasa
PAL.....	Phenylalanine ammonia lyase, fenilalanina amonio liasa
Aw	water activity, actividad del agua
PRR.....	Pattern Recognition Receptors, Receptores de reconocimiento de patrones
PAMP/MAMP.....	Pathogen or Microbe associated molecular patterns, patrones específicos de patógenos o microorganismos
PTI.....	PAMP-Triggered Immunity, Inmunidad activada por patrones
ETI	Effector-Triggered Immunity, Inmunidad activada por efectores
Avr	Avirulencia
HR.....	Hypersensitivity response, respuesta de hipersensibilidad
ROS o ERO	Reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno
SA o SA	Salicylic Acid, ácido salicílico
ET	etileno
JA	ácido jasmónico
BA	ácido benzoico
ASA	ácido acetilsalicílico
MeSA	Methyl salicylate
AzA	Ácido azelaico
G3P	glicerol-3- fosfato
Pip	Ácido piperónico
DA	Deshidroabietinal
NO	Óxido nítrico
ICS	Isocorismato sintasa
SAMT	Salicylic Acid carboxyl Methyltransferase,

ácido salicílico carboxi-metiltransferasa

ASM	Acibenzolar-S-Methyl
Si	Silicio
ABCPE	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad
PPO, PFO	Polyphenol oxidase, Polifenoloxidasas
CAT	Catalase, Catalasa
g	gravedades
nm	nanometros
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
APX	Ascorbate peroxidase, ascorbate peroxidasa
TAC	capacidad antioxidante total
TPC	Contenido fenólico total
SOD	superóxido dismutasa
MDA	Malondialdehído
PLS	Partial Least square

INTRODUCCIÓN GENERAL

El durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch) es el tercer cultivo frutícola más importante a nivel mundial dentro de la familia Rosáceas después de la manzana (*Malus* spp.) y pera (*Pyrus* spp.). El mayor productor es China; sin embargo, es uno de los países que obtiene los menores rendimientos a nivel mundial. México se encuentra en el décimo sexto lugar en cuanto a producción, con un rendimiento promedio nacional de 6.3 t·ha⁻¹, entre los países con mejores rendimientos se encuentra Egipto, Francia, Grecia, Jordania, Chile y Suiza en el ciclo productivo 2019 (FAOSTAT, 2020). De acuerdo con el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2018) en México se tiene una superficie total de 28,842.42 hectáreas cultivadas, con un rendimiento promedio de 4.58 t·ha⁻¹ de temporal y 11.71 t·ha⁻¹ de riego.

Durante el proceso de producción del durazno se presentan diversos problemas como heladas tardías, escasa precipitación con distribución irregular, erosión o baja fertilidad del suelo, mal manejo de las plantaciones y presencia de plagas y enfermedades. La pudrición café causada por *Monilinia* spp. es una de las enfermedades más destructivas en durazno, principalmente en postcosecha y causa pérdidas anuales a nivel mundial de 1700 millones de euros (Martini y Mari, 2014). En condiciones favorables para el patógeno, la incidencia de la enfermedad alcanza el 80 %, lo que ocasiona grandes pérdidas, especialmente en huertas con variedades de durazno tardías (Gell *et al.*, 2008).

El control de *Monilinia* spp. se realiza principalmente con productos químicos que garantizan la inhibición del patógeno, sin embargo, su residualidad tiene efectos

negativos al ambiente y a la salud humana, además de que su uso constante y desmedido puede inducir resistencia a *Monilinia* spp. Ante esta problemática, se buscan alternativas de manejo que proporcionen un control adecuado y que sean amigables con el ambiente.

Las nuevas alternativas incluyen el estudio de los mecanismos de resistencia de las plantas frente a patógenos. Las plantas poseen mecanismos de resistencia tanto estructurales como bioquímicos, estos mecanismos se pueden encontrar de manera preformada o no preformada (inducible) (Pandey *et al.*, 2016).

Los mecanismos de resistencia preformadas en durazno, cambian durante las diferentes etapas de desarrollo del fruto, por lo tanto, es muy importante estudiarlas para comprender su interacción con *Monilinia*, debido a que los cambios en la fisiología y composición química del fruto, están sincronizados con los cambios en la susceptibilidad a la infección por este patógeno (De Cal *et al.*, 2013).

Por otro lado, los mecanismos de resistencia inducibles, implican la activación de diferentes vías de señalización, algunas de estas pueden proporcionar protección en el sitio de infección (local), mientras que otras proporcionan resistencia sistémica en toda la planta, incluso en tejido no infectado. Los mecanismos de señalización de defensa sistémica incluyen la resistencia sistémica inducida (ISR), que se activa en respuesta a la colonización de la raíz por organismos benéficos (Van Wees *et al.*, 2008), y la resistencia sistémica adquirida (SAR), la cual se activa en respuesta a la infección por patógenos (Spoel and Dong, 2012; Wendehenne *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2015). Estos mecanismos de defensa permanecen inactivos o latentes hasta que se activan después

de la exposición y/o el contacto con patógenos o agentes inductores (Gao *et al.*, 2015; Faize y Faize, 2018). La Inducción de SAR implica la generación de señales móviles que se translocan al tejido distal y prepara la planta contra futuras infecciones. Esto requiere una comunicación cruzada cuidadosa y equilibrada entre varias fitohormonas, metabolitos y proteínas (Pieterse *et al.*, 2012).

Existen varios inductores químicos de SAR, los cuales, se traslocan sistémicamente y activan vías de transducción de señales que generalmente conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno, biosíntesis de fitoalexinas, refuerzo de la pared celular de la planta asociada con compuestos fenilpropanoides, deposición de calosa, síntesis de enzimas de defensa y acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), que tienen propiedades antimicrobianas (Thakur y Sohal, 2013). Los inductores muestran resultados satisfactorios para el manejo de los patógenos en hortalizas, por lo que se están utilizando en frutales evidenciando un buen control (Bektas y Eulgem, 2015). Sin embargo, el uso de inductores no es suficiente para el manejo de enfermedades, por lo que se puede combinar con fungicidas para obtener un efecto sinérgico y de esta manera obtener mejores resultados (Walters *et al.*, 2013; Romanazzi *et al.*, 2016).

Algunos de los inductores utilizados son acibenzolar-S-Methyl, fosfito de potasio y silicato de potasio, los cuales disminuyen significativamente algunas enfermedades, debido a que activan enzimas como peroxidasa (POD), quitinasa (CHT) y la fenilalanina amonio liasa (PAL) (Datnoff *et al.*, 2007; Walters *et al.*, 2013; Hailey y Percival, 2014).

Objetivo general

Estudiar los mecanismos de resistencia preformados durante las diferentes etapas de desarrollo del fruto del durazno y evaluar los mecanismos de resistencia inducibles mediante la aplicación en precosecha de inductores de resistencia en combinación con fungicidas, además evaluar su efecto en la incidencia de *Monilinia fructicola* en postcosecha, así como su efecto en el estatus nutrimental del árbol.

Hipótesis

Los frutos de durazno durante su desarrollo presentan diferentes mecanismos de resistencia preformados que determinan el grado de susceptibilidad a *Monilinia fructicola*, además los mecanismos de resistencia no preformados pueden activarse mediante la aplicación de inductores de resistencia y en combinación con fungicidas proporciona un buen control de *Monilinia fructicola*.

Literatura Citada

- Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT) <http://faostat.fao.org> (Consultada octubre, 2020).
- Bektas, Y., Eulgem, T. 2015. Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 5, 804.
- Datnoff L. E; F. A. Rodrigues, K. W. Seebold. 2007. "Silicon and plant disease" In: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. St Paul, M. N, USA: APS Press, 233–46.
- De Cal, A., Sandin-Espana, P., Martinez, F., Egüen, B., Chien-Ming, C., Lee, M. H., and Prusky, D. 2013. Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of *Monilinia fructicola* on peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 418-423.
- Faize, L., Faize, M. 2018. Functional Analogues of Salicylic acid and their use in Crop Protection. *Agronomy*, 8(1), 5.
- Gao, Q. M., Zhu, S., Kachroo, P., & Kachroo, A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 6, 228.

- Gell, I., De Cal, A., Torres, R., Usall, J., and Melgarejo, P. 2008. Relationship between the incidence of latent infections caused by *Monilinia* spp. and the incidence of brown rot of peach fruit: factors affecting latent infection. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 487–498.
- Hailey, L. E., y Percival, G. C. 2014. Comparative Assessment of Phosphite Formulations for Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Control. *Arboriculture & Urban Forestry*, 40(4).
- Martini, C., Mari, M. *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (Monilinia rot, brown rot). In *Postharvest Decay: Control Strategies*; Academic Press Elsevier: London, UK, 2014; pp. 233–265.
- Pandey, D., Rajendran, S. R. C. K., Gaur, M., Sajeesh, P. K., and Kumar, A. 2016. Plant defense signaling and responses against necrotrophic fungal pathogens. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(4), 1159-1174.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S. C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489-521.
- Romanazzi, G., Sanzani, S. M., Bi, Y., Tian, S., Martínez, P. G., Alkan, N. 2016. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 82-94
- SIAP. 2018. Cierre de producción agrícola 2018 por cultivo. <http://www.siap.gob.mx> Consultada en marzo de 2018.
- Spoel, S. H., & Dong, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89.
- Thakur, M., and Sohal, B. S. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochem.* 2013:1-10.
- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., and Pieterse, C. M. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 443-448.
- Walters, D. R., Ratsep, J., Havis, N. D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263-1280.
- Wendehenne, D., Gao, Q. M., Kachroo, A., and Kachroo, P. 2014. Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 127-134.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del cultivo

El durazno pertenece a la familia Rosaceae y es una de las especies frutales de mayor demanda que se cultivan en las zonas templadas del mundo. China es el mayor productor a nivel mundial; sin embargo, es uno de los países que obtiene los menores rendimientos a nivel mundial. México se encuentra en el décimo sexto lugar en cuanto a producción, con un rendimiento promedio nacional de $4.9 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, entre los países con mejores rendimientos se encuentra Egipto, Francia, Grecia, Jordania, Chile y Suiza en el ciclo productivo 2019 (FAOSTAT, 2020).

En México de acuerdo con datos del Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2018) se tiene una superficie total de 28,842.42 hectáreas con una producción de 160,663.01 toneladas; para el 2018 los estados de Chihuahua, Aguascalientes y Estado de México fueron los que obtuvieron los mejores rendimientos, sin embargo, a nivel nacional el rendimiento promedio es de $4.90 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$.

En las últimas dos décadas el rendimiento promedio del durazno se ha mantenido constante, mientras que la demanda, casi se ha duplicado; por lo que resulta indispensable elevar el rendimiento y mejorar la calidad de los frutos. El precio del producto en el mercado nacional es aproximadamente el doble del que se registra en los Estados Unidos y Europa. En México el precio al mayoreo oscila de los 13 a los 30 pesos en Centrales de Abasto (Secretaría de Economía, 2017).

Importancia y manejo de la pudrición café

El agente causal de la pudrición café es *Monilinia* spp. que pertenece al grupo de hongos necrotróficos (Ascomycota) del orden de Helotiales (Leotiales). El género teleomorfo es *Sclerotinia* spp. (posición en la clasificación: Sclerotiniaceae, Helotiales, Leotiomyetidae, Leotiomyetes, Pezizomycotina, Ascomycota). Las especies de *Monilinia* se encuentran entre los principales organismos causales de pudrición café en varios cultivos de árboles frutales incluyendo frutales de hueso como duraznos, albaricoque, nectarinas, cerezas y ciruelas, así como frutales de pepita como peras, manzana y membrillos (Obi *et al.*, 2018). De las 35 especies del género *Monilinia*, cuatro son las principales especies que son patógenas para los frutales de pepita y hueso: *M. fructicola* (G. Winter) Honey, *Monilinia laxa* (Aderhold & Ruhland) Honey, *Monilinia fructigena* (Aderhold & Ruhland) Honey y *Monilinia polystroma* (G. Leeuwen) (van Leeuwen *et al.*, 2002).

Monilinia spp. es un patógeno policíclico debido a que producen numerosos ciclos secundarios a través del crecimiento anual del cultivo. El hongo permanece años en la plantación y durante el invierno sobrevive en diferentes estructuras como frutos momificados, pedúnculos y canchros en ramas, lo cual representa la fuente primaria del inóculo. Cuando las condiciones ambientales son favorables, las esporas pueden infectar flores, brotes y ramas jóvenes para generar una fuente secundaria de inóculo (Kreidl *et al.*, 2015). De esta manera durante el periodo de madurez del fruto se pueden encontrar esporas de *Monilinia* spp. en cualquier lugar; por lo tanto, es casi seguro que ocurra una infección si el clima tiene periodos prolongados de humedad o si el fruto tiene algún daño físico (Xu *et al.*, 2007). El período de incidencia va desde la floración hasta la

postcosecha y de acuerdo con Casals *et al.* (2010), más del 80 % de los conidios viables de *M. fructicola* y *M. fructigena* pueden germinar a 25 ° C y 0.99 del agua (a_w) en 2 horas en medio de cultivo. Según Martini y Mari (2014), el valor anual mundial de las pérdidas de *Monilinia* spp. es de 1.7 mil millones de euros. En condiciones de laboratorio, la pudrición café puede resultar en pérdidas mayores al 60% de duraznos después de 5 días de infección a temperatura ambiente. Los principales factores que causan las pérdidas por *Monilinia* spp. son el periodo de incidencia que va desde la floración hasta postcosecha, los factores climáticos, aparición de cepas resistentes a fungicidas y la escasa disponibilidad de variedades resistentes (Oliveira *et al.*, 2016).

Para un manejo efectivo de *Monilinia* spp., se debe considerar la reducción del porcentaje de infección latente, la cual es una situación patológica en donde el fruto puede estar infectado, pero permanecer asintomático y solo desarrollar síntomas visibles durante el periodo de madurez y/o después de la cosecha. Esto se debe a que durante el periodo de maduración la susceptibilidad a la infección por *Monilinia* spp. es alta (Obi *et al.*, 2018).

La reducción de la infección latente consiste en disminuir el inóculo primario del patógeno, lo cual se puede lograr con un método de control cultural mediante la eliminación de todas las partes infectadas y toda la fruta no cosechada para evitar que se conviertan en fuentes de inóculo, minimizando así el inóculo de hibernación, esto con el fin de romper el ciclo de vida de *Monilinia* spp. (Gell *et al.*, 2009).

Otro método de control además del cultural, consiste en un manejo con productos químicos. Los primeros fungicidas utilizados para el manejo de enfermedades fueron a

base de cobre y azufre, los cuales aún se siguen utilizando, posteriormente aparecieron los que se caracterizan por tener varios sitios de acción (benzimidazoles, dicarboximidas, etc.). A partir de los años 60's y 70's surgieron los fungicidas que actúan sobre un sitio o unos pocos sitios específicos en el metabolismo de los hongos, y con estos últimos surgieron los problemas de resistencia. Hasta la década de los 70's sólo habían ocurrido casos esporádicos de resistencia; sin embargo, en la última década, un gran número de estudios reportan resistencia de los hongos a diversos fungicidas, tal es el caso de resistencia a propiconazole y metil benzimidazol carbamato (Carbamatos) por *Monilinia fructicola* (Lamichhane *et al.*, 2015).

Dentro de los programas de manejo convencional y manejo integrado, los fungicidas, ciproconazol, iprodiona y tiofanato metílico son los más utilizados para el control de *Monilinia* spp. (Egüen *et al.*, 2015). Sin embargo, el aumento en la demanda de frutos con baja residualidad pone en duda el uso continuo de fungicidas convencionales, por lo tanto, se buscan estrategias de control alternativas con efecto duradero, que tengan mayor aceptabilidad por parte del consumidor y, al mismo tiempo, reducir los efectos nocivos al ambiente.

Mecanismos de defensa de las plantas a patógenos.

El manejo de enfermedades mediante el uso de productos químicos es cuestionable debido a todos los efectos negativos a la salud humana y al ambiente, sobre todo cuando se hace un uso indiscriminado de los fungicidas y en general de los agroquímicos, es cuando tenemos diversos problemas como la aparición de cepas resistentes y, por lo tanto, menor eficiencia de los fungicidas. Las nuevas técnicas de

manejo de las enfermedades se centran en buscar alternativas a los productos químicos; una de estas alternativas es la activación de mecanismos de defensa de la planta.

Los mecanismos de defensa de la planta se activan cuando el tejido vegetal tiene contacto con un patógeno. En el primer contacto patógeno-hospedante se inicia una serie de procesos complejos en las interacciones fisiológicas, los cuales originan respuestas. Las respuestas involucran cambios celulares, histológicos, bioquímicos y moleculares con el fin de limitar la proliferación del patógeno o la expresión de síntomas de la enfermedad. Los mecanismos de defensa a nivel local se componen de defensas pasivas que incluyen la cutícula, pared celular, y metabolitos antimicrobianos. Si se rompen estas defensas pasivas, se despliegan las defensas mediadas por el sistema inmune innato de la planta, las cuales incluyen resistencia no hospedante a patógenos, resistencia basal a patógenos virulentos y resistencia específica de la planta a aislados de patógenos avirulentos (gen a gen) (Lee *et al.*, 2017; Shine *et al.*, 2019).

Una capa de este sistema está regulada por receptores de reconocimiento de patrones (PRR, Pattern Recognition Receptors), que se encuentran en la membrana plasmática. Los PRR reconocen moléculas que contienen patrones específicos de patógenos o microorganismos (PAMP/MAMP); los cuales despliegan la inmunidad activada por PAMP/MAMP conocida como inmunidad activada por patrones (PTI, PAMP-Triggered Immunity), sin embargo, existen patógenos que despliegan proteínas efectoras capaces de suprimir la PTI. En estas interacciones, la planta muestra un bajo nivel de resistencia denominado resistencia basal. Para combatir estos patógenos, las plantas utilizan la segunda capa del sistema inmune innato, conocida como inmunidad activada por efectores (ETI, Effector-Triggered Immunity) (Klessig *et al.*, 2018).

La resistencia específica de la raza, o inmunidad activada por efectores (ETI) se induce cuando las proteínas Avr específicas de la cepa del patógeno se asocian directa/indirectamente con proteínas afines resistentes (R) a las plantas. La ETI se asocia frecuentemente con el desarrollo de respuesta de hipersensibilidad (HR) en el tejido inoculado. Varios días o semanas después de estos eventos, PTI y ETI pueden inducir respuestas de defensa en partes superiores no inoculadas de la planta, incluida la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), ácido salicílico (SA), y el desarrollo de resistencia sistémica adquirida (SAR) (Mishina y Zeier 2007).

PTI y ETI están asociados con la activación de varias respuestas en el tejido primario infectado, como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , activación de proteínas quinasas (MAPK), síntesis de fitoalexinas, reprogramación transcripcional (mayor expresión de genes PR asociados a la defensa) y la acumulación de ácido salicílico (SA) (Stael *et al.*, 2015; Klessig *et al.*, 2018). Además de los mecanismos a nivel local, la planta también activa mecanismos de respuestas de defensa sistémica en las partes superiores no infectadas.

Hay dos tipos de mecanismos de defensa sistémica en plantas: resistencia sistémica adquirida (SAR), que se activa en respuesta a la infección por patógenos (Gao *et al.*, 2015) y resistencia sistémica inducida (ISR), que se activa en respuesta a la colonización de la raíz por microorganismos benéficos (Van Wees *et al.*, 2008). Ambos mecanismos pueden inducir defensas que confieren protección duradera contra un amplio espectro de microorganismos y estos mecanismos son regulados por fitohormonas, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET).

Las hormonas producidas por las plantas, para regular los mecanismos de resistencia, varían de acuerdo con el tipo de alimentación del patógeno. Para el caso de patógenos biotróficos la inducción de los mecanismos de defensa esta mediada por el ácido salicílico (SA, Salicylic Acid), y por lo tanto las plantas infectadas acumulan un nivel alto de SA en los tejidos locales y distales (Cui *et al.*, 2017); sin embargo, en algunos casos también es asociado a la inducción de defensa contra patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005). Las hormonas involucradas mayormente en los mecanismos de defensa contra patógenos necrotróficos son el etileno (ET) y el ácido jasmónico (JA), las cuales regulan de manera cooperativa la inmunidad. Los mutantes que son defectuosos en la biosíntesis o la señalización de estas hormonas son susceptibles a los patógenos necrotróficos (AbuQamar *et al.*, 2016). Las interacciones entre la señalización SA y ET/JA a menudo son antagónicas. Sin embargo, también existen interacciones sinérgicas (Gautam y Nandi, 2018), por lo tanto, el resultado de la activación de los mecanismos de defensa sistémica de la planta depende de la comunicación cruzada entre las vías de señalización activadas por las fitohormonas (Singh *et al.*, 2019).

De los dos tipos de inducción de resistencia sistémica, la SAR tiene mayor importancia debido a sus aplicaciones potenciales en la protección sostenible de cultivos a largo plazo. La inducción de SAR implica la generación de señales móviles en el sitio de la infección primaria, que se trasladan al tejido distal y preparan a la planta contra futuras infecciones. Esto requiere una comunicación cruzada, cuidadosa y equilibrada entre varias fitohormonas, metabolitos y proteínas (Shine *et al.*, 2018).

Resistencia sistémica adquirida (SAR, Systemic Acquired Resistance)

Los primeros estudios sobre la inducción de la resistencia sistémica adquirida en las plantas fueron realizados por Kenneth Chester en el año 1933, quien concluyó que las plantas también desarrollan una mayor resistencia a la reinfección y que esta inmunidad adquirida probablemente jugó un papel importante en el control de los brotes de enfermedades en la naturaleza. Casi 30 años después, Ross (1961) realizó un trabajo en el que observó que cuando las plantas de tabaco variedad Samsun recibieron una inoculación con el virus del mosaico del tabaco (TMV) en tres hojas inferiores y después de 7 días se expusieron las dos hojas superiores al virus, las lesiones formadas después de la infección secundaria fueron mucho más pequeñas que las formadas en la inoculación primaria (inicial). A este fenómeno lo llamó resistencia sistémica adquirida (SAR) y a partir de entonces se empezaron a realizar diferentes estudios en tabaco para conocer este fenómeno. Algunos investigadores determinaron que en las variedades de tabaco inoculadas con TMV se encontraban acumuladas varias proteínas en las hojas del sitio de infección y posteriormente se encontraron en las hojas distales (Gianinazzi y Kassanis 1974); estas proteínas, se denominaron proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Posteriormente, Raymond White descubrió que la resistencia al TMV mediante la acumulación de proteínas PR podrían inducirse con aplicaciones de ácido benzoico (BA), ácido salicílico (SA) o el derivado de SA, ácido acetilsalicílico (ASA), mejor conocido como aspirina (Klessig *et al.*, 2018).

La SAR es un mecanismo de defensa que se observa después de la infección primaria por patógenos virales, bacterianos y fúngicos o después de la aplicación de inductores químicos en las plantas (Fu y Dong, 2013). La inducción de la SAR requiere

una señalización cuidadosa y equilibrada entre varias fitohormonas, metabolitos y proteínas. Estas señales de la SAR se translocan acropetalmente a través del floema y esto puede ocurrir vía apoplasto (espacio fuera de la membrana plasmática) o simplasto (red de citoplasma interconectado por aberturas especializadas llamadas plasmodesmos). Existen diferentes sustancias asociadas a SAR como el ácido salicílico (SA) y su derivado metilado MeSA, ácido azelaico (AzA), glicerol-3-fosfato (G3P), ácido pipercolónico (Pip), deshidroabietinal (DA), y los radicales libres, óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Wang *et al.*, 2014). Una o más de estas sustancias pueden conducir a la activación de defensa y el efecto puede durar semanas o meses, lo cual, protege a la planta de infecciones futuras (Jung *et al.*, 2009).

El ácido salicílico es una de las hormonas vegetales que juega un papel importante en la SAR, el cual se sintetiza a partir del metabolito primario corismato, derivado de la ruta del ácido shikimico. La síntesis de SA se lleva a cabo a través de diferentes vías: la vía de la fenilalanina en donde participa la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) mediante la descarboxilación del ácido transcinámico al ácido benzoico, seguido de la hidroxilación a SA en el citoplasma. Alternativamente, el ácido cinámico puede hidroxilarse a ácido o-cumarico y luego descarboxilarse a SA, en esta vía del isocorismato, la síntesis de SA se llevaba a cabo con la enzima isocorismato sintasa (ICS), en el cloroplasto. Se describe una tercera vía que involucra glucósidos cianogénicos, como la prunasina y el mandelonitrilo, los cuales están involucrados en la síntesis de SA en el durazno (Diaz-Vivanco *et al.*, 2017).

Primero se sintetiza el SA en el cloroplasto y después se transporta al citosol a través de la proteína EDS5, donde se inactivará a través de la glicosilación o metilación.

La glicosilación de SA genera 2-O- β -D glucósido (SAG), que se transporta a la vacuola y se hidroliza para liberar SA después del ataque de patógenos. La metilación de SA genera metil SA (MeSA), que se supone es la señal de SAR móvil que viaja desde los tejidos infectados a los distales, donde activa la resistencia luego de su reconversión a SA (Park *et al.*, 2007). Tras la infección por patógenos, los niveles de SA aumentan dramáticamente en las hojas infectadas, sin embargo, se convierte en MeSA biológicamente inactivo por la ácido salicílico carboxi-metiltransferasa (SAMT). Una vez que la concentración de SA se vuelve lo suficientemente alta, se une en el sitio activo del ácido salicílico la proteína de unión 2 (SABP2) e impide su capacidad para convertir MeSA de nuevo en SA. La metilación de SA provoca un cambio en el potencial redox de la pared celular del cloroplasto, facilitando su translocación al citoplasma del tejido distal no infectado. Dado que los niveles de SA en el tejido distal son demasiado bajos para ser inhibidos por la SABP2, el MeSA transportado se convierte en SA activo, que luego induce respuestas de defensa sistémicas (Yamasaki *et al.*, 2013).

El SA es un potente inductor de la resistencia sistémica de las plantas; sin embargo, la mayoría del SA sintetizado es convertido y guardado en derivados biológicamente inactivos por glicosilación, metilación y la conjugación de aminoácidos, por lo tanto, su eficacia se ve reducida. Además, la fitotoxicidad del SA impide su aplicación como compuesto para la protección de las plantas. Por esta razón, se han explorado varios análogos funcionales del SA con actividades estables y efectivas (Conrath *et al.*, 2015). La mayoría de los compuestos sintéticos dirigidos a las vías de SA demostraron su efectividad como inductores de defensa de las plantas y se han clasificado estos compuestos de acuerdo con sus estructuras: compuestos de salicilato

y benzoato; derivados del ácido nicotínico; heterociclos de pirazol, tiazol y tiadiazol; derivados de pirimidina; y compuestos neonicotinoides (Faize y Faize, 2018).

Inductores de resistencia

Los términos "inductor de resistencia" o "elicitor" se usan para moléculas que pueden proteger a las plantas de enfermedades a través de la inducción de sus mecanismos de defensa. Los inductores sintéticos son pequeñas moléculas que inducen respuesta de inmunidad en las plantas, los cuales son estructuralmente diferentes de los inductores de defensa naturales de las plantas. Los inductores sintéticos activan reacciones de defensa al imitar las interacciones de los inductores naturales o las moléculas de señalización de las defensas con sus respectivos receptores o al interferir con otros componentes de señales de defensa. El primer activador de resistencia química, Probenazole, fue registrado en Japón como Oryzmate en 1975, y desde entonces se desarrollaron muchos otros activadores químicos y biológicos (Walters *et al.*, 2013).

El uso de inductores de resistencia para manipular la SAR de manera efectiva en especies de cultivos puede proporcionar a los productores una estrategia más amigable con el medio ambiente para prevenir la pérdida de cultivos y reducir la dependencia de fungicidas sintéticos (Conrath *et al.* 2015). Se han identificado varios compuestos sintéticos que inducen SAR (Cuadro 1). Cuando se aplican a altas concentraciones los análogos sintéticos o funcionales de SA pueden inducir directamente respuestas de defensa a un amplio espectro de patógenos. Por el contrario, las bajas concentraciones de estos compuestos estimulan la inmunidad, ya que inducen poca o ninguna respuesta

de la planta hasta la infección por patógenos, momento en el cual las respuestas de defensa se desencadenan de manera más rápida (Klessig *et al.*, 2018).

Cuadro 1. Inductores de resistencia que reportan control de enfermedades (del 2010 al 2013).

Tipo de elicitador/inductor de resistencia	Cultivo	Patógeno	
Acibenzolar-S-methyl (ASM)	Calabacita	<i>Tricothecium roseum</i> (post-harvest) <i>Colletotrichum lagenarium</i>	
	Haba	<i>Uromyces viciae-fabae</i> <i>Orobanche crenata</i> (parasitic plant)	
	Col	<i>Peronospora parasitica</i>	
	Tomate	<i>Ralstonia solanacearum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> <i>Xanthomonas</i> spp.	
	Chayote	<i>Phytophthora capsici</i>	
	Cúrcuma	<i>Pythium aphanidermatum</i>	
	Mango	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (post-harvest)	
	Melón	<i>Alternaria alternata</i> and <i>Fusarium</i> spp.	
	Arroz	<i>Xanthomonas oryzae</i> <i>Magnaporthe grisea</i>	
	Maíz	<i>Bipolaris maydis</i>	
	Chícharo	<i>Uromyces pisi</i>	
	Manzana	<i>Penicillium expansum</i> (post-harvest)	
	β-Aminobutyric acid (BABA)	Manzana	<i>Penicillium expansum</i> (post-harvest)
		Chícharo	<i>Uromyces pisi</i>
Col		<i>Peronospora parasitica</i>	
Tomato		<i>Phytophthora infestans</i>	
Lechuga		<i>Bremia lactucae</i>	
Probenazole	Colza	<i>Leptosphaeria maculans</i>	
	Maíz	<i>Bipolaris maydis</i>	
Saccharin	Frijol	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	
Fosfito de potasio	Uva	<i>Plasmopara viticola</i>	
	Arabidopsis	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	
Tiamina	Pearl millet	<i>Sclerospora graminicola</i>	
Silicio	Rosa	<i>Podosphaera pannosa</i>	
	Biochar	Pimienta	<i>Leveillula taurica</i>
Biochar	Tomate	<i>Botrytis cinerea</i>	
	Fresa	<i>Colletotrichum acutatum</i>	

Fuente: Walters *et al.* (2013)

Algunos de los problemas que se deben considerar al utilizar los inductores son: una posible reducción en la aptitud de la planta porque se requiere un elevado nivel energético para la activación de las respuestas de defensa y su variación en los niveles

de eficiencia que van del 20 al 85 % debido a que depende del cultivar y la dosis del inductor (Gozzo y Faoro 2013).

Acibenzolar-S-Methyl

El éster S-metílico del ácido benzo-1,2,3-tiadiazol-7-carbotiónico (BTH) o ASM (acibenzolar-S-metil) fue el primer derivado de tiadiazol comercializado. Fue registrado con el nombre comercial de BION® (Syngenta, Bâle, Suiza) en Europa en 1989 y Actigard® (Syngenta, Bâle, Suiza) en los Estados Unidos en 1990. El ASM es efectivo contra un amplio espectro de patógenos y se tienen estudios en más de 120 patosistemas, incluyendo manzana, pera, durazno, uva, fresa y melón (Wei *et al.*, 2018).

El ASM es un análogo funcional del SA, es insensible a la luz e induce resistencia contra una amplia gama de patógenos a través de activación de SAR. Los mecanismos de SAR inducida por ASM incluyen la estimulación del metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ren *et al.*, 2012), la regulación de la vía fenilpropanoide (Liu *et al.*, 2014), producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Tian *et al.*, 2016) y modificación de rutas del etileno (Li *et al.*, 2015).

El ASM activa las vías de señalización dependientes de SA y puede activar los mismos genes PR inducidos por SA; sin embargo, en un experimento se encontró que este compuesto induce SAR en plantas transgénicas nahG, que no acumulan SA, por lo tanto, la acumulación de SA no se requiere para activar la SAR inducida por BTH. El BTH se convierte en acibenzolar por SABP2 y este producto es crítico para la inducción de SAR. Cuando se aplicó BTH en plantas de tabaco con el gen SABP2 silenciado, no se pudo inducir la expresión de proteínas PR1 y SAR. Por el contrario, cuando las mismas

plantas fueron tratadas con acibenzolar, la SAR fue completamente inducida (Tripathi *et al.*, 2010).

Lin *et al.* (2011) encontraron que aplicaciones de ASM en mango reducen la infección por *Colletotrichum gloeosporioides*. Esta resistencia inducida por ASM fue acompañada de una mayor expresión génica y un incremento en la actividad de peroxidasa y polifenoloxidasas, la regulación positiva de estos genes se relacionó con la acumulación de compuestos fenólicos totales; también se observó que la efectividad de ASM dependía de la variedad de mango.

El tratamiento con BTH en precosecha disminuyó significativamente la podredumbre por *Alternaria* sp. y *Penicillium expansum* en peras durante el almacenamiento (Cao *et al.*, 2007). Los mismos autores informaron que las actividades de las proteínas PR como POD, CHT y GLU se incrementaron significativamente en las peras tratadas con BTH; también se observaron resultados similares en duraznos, en donde al hacer aplicaciones de ASM por inmersión en postcosecha se redujo la incidencia en un 50% y la severidad en un 64 % de *P. expansum* en comparación con la fruta no tratada (Liu *et al.*, 2005).

En fresa se observó que el ASM y el quitosano redujeron el moho gris y la podredumbre por *Rhizopus* spp. aplicados en precosecha y postcosecha, debido a que afectan de diferentes maneras las redes celulares asociadas con las defensas de las plantas. Los cloroplastos juegan un papel importante en la modulación de las respuestas de defensa, que comunican activamente estas señales a través de cambios en el estado redox (Landi *et al.*, 2017).

Fosfito de potasio

Los fosfitos (Phi) son sales inorgánicas y estériles originadas de la neutralización del ácido fosforoso por una base (Cohen y Coffey, 1986). El estudio con fosfitos en el control de enfermedades comenzó en Australia en 1983, con la pudrición de la raíz del aguacate (*Phytophthora cinnamoni*). Posteriormente se incrementó el interés por el uso de los fosfitos, debido a que tiene rápida absorción por las plantas, un alto grado de solubilidad y alta capacidad de moverse desde las hojas hacia las raíces a través del floema, proporcionando control para algunas enfermedades radiculares e incrementado el efecto de ciertos fungicidas. Por lo tanto, el fosfito representa un insumo agrícola eficiente para proteger los cultivos contra organismos patógenos mediante la inducción de mecanismos de defensa, actuando como un inductor de resistencia vegetal de importancia para los nuevos enfoques de manejo de enfermedades (Alexandersson *et al.*, 2016).

El fosfito tiene un modo de acción complejo, que incluye la inhibición directa del crecimiento de patógenos y la estimulación de las defensas de la planta. Eshraghi *et al.* (2011) demostró que el fosfito induce en *Arabidopsis* una respuesta rápida contra la infección por *Phytophthora cinnamomi*, debido a que se activaron los genes de defensa de las vías SA y JA/ET, lo que sugiere una activación de una amplia gama de defensas de la planta. Las respuestas de defensa desencadenadas por Phi incluyen la acumulación de fitoalexinas y lignificación de la pared celular, así como la producción de enzimas líticas por la planta. El efecto de Phi en el control de patógenos depende del tiempo de aplicación, el cultivo, la ubicación y la incidencia de la enfermedad (Cicore *et al.*, 2012).

Aplicaciones de fosfito de potasio ($2 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) en plántulas de manzana redujeron significativamente la severidad de la roña hasta en un 62% y promovieron la acumulación de ácido salicílico, ácido protocatechuico y epicatequina en hojas, especialmente después de la inoculación con *V. inaequalis* (Felipini *et al.*, 2016).

El fosfito de potasio y ASM inyectados al tronco en árboles de manzana contra *Erwinia amylovora* como parte de un manejo integrado indujeron significativamente genes de proteínas PR-1, PR-2 y PR-8 en hojas de manzana. Por lo tanto, este fue el primer estudio que demostró la supresión significativa del tizón de fuego a través de la activación de resistencia (SAR) en condiciones de campo con la aplicación de fosfitos (Aćimović *et al.*, 2015).

La eficacia de los fosfitos depende la formulación que se utilice; en un trabajo realizado por Moreira *et al.* (2008) se observó un control significativo de la pudrición café en durazno con el fosfito de potasio a diferencia del fosfito de calcio que no mostró un control significativo de la enfermedad. En otro estudio se encontró que el fosfito de cobre fue la formulación con la mayor reducción de la severidad de *Venturia inaequalis* en hojas y frutos de manzana en comparación con otras formulaciones (Harley y Percival, 2014). La combinación de fosfito con una dosis reducida de myclobutanil mejoró significativamente la eficiencia en el control de roña en hojas y frutos de pera, en comparación con la aplicación de cada producto por separado (Percival y Noviss, 2010).

Algunas investigaciones señalan que la eficiencia del control de enfermedades mediante el uso de fosfitos es menos eficaz en comparación con el uso de los fungicidas, por lo tanto, no estos últimos no se pueden sustituir por completo, sin embargo, se podría integrar como parte de un programa de manejo integrado con el fin de disminuir el uso

de fungicidas y reducir la posibilidad de generar resistencia de los patógenos (Liljeroth *et al.*, 2016). Si la cantidad de fosfito aplicada y los niveles de fósforo de la planta son apropiados, el fosfito puede desencadenar efectos benéficos como un bioestimulante positivo o inductor de mecanismos de defensa contra diversos patógenos, principalmente hongos y oomicetos. Sin embargo, si se aplica a altas concentraciones y el contenido de fósforo de la planta es deficiente, el fosfito puede acumularse y causar efectos perjudiciales (Loera-Quezada *et al.* 2015).

Silicio

El silicio (Si) es el segundo elemento más abundante en la litosfera de la Tierra, y es tan importante como el fósforo y el magnesio en la biota. El silicio constituye entre 0.1% y 10% del peso seco de plantas superiores y su acumulación puede variar significativamente entre especies. Es importante destacar que las plantas con deficiencia de Si son frágiles y susceptibles a las infecciones por hongos (Ma y Yamaji, 2006). El silicio reduce la intensidad de múltiples enfermedades de las plantas causadas por patógenos biotróficos, hemibiotróficos y necrotrofos en muchos cultivos de gran importancia económica (Rodrigues y Datnoff, 2015).

El modo de acción del silicio en el control de enfermedades aún no es completamente entendido; sin embargo, se sabe que la barrera mecánica formada a partir de la polimerización de Si (ópalos de sílice o fitolitos) debajo de la cutícula y en las paredes celulares fue la primera hipótesis propuesta para explicar cómo el Si reduce o impide la penetración de hongos. Otras investigaciones sugieren que el Si además de formar una barrera física también puede activar mecanismos de resistencia en la planta ante el ataque de patógenos. Chérif *et al.* (1994) en Canadá fueron los primeros en

demostrar que las proteínas relacionadas con la patogénesis (peroxidasa, polifenoloxidasa y quitinasa) fueron significativamente estimuladas por el Si en pepino (*Cucumis sativus*) infectadas con especies de *Pythium*.

Se encontró que el Si puede estar influyendo en el equilibrio hormonal endógeno defensivo de la planta, por lo tanto, las aplicaciones de Si inducen niveles más altos de ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Rodrigues y Datnoff, 2015).

Las aplicaciones de silicio aumentaron significativamente la actividad de la fenilalanina amonio liasa, la cual es la enzima clave en la ruta del fenilpropanoide que es responsable de la producción de diferentes tipos de compuestos fenólicos con propiedades antimicrobianas. La mayor actividad de esta enzima se relacionó con un aumento en las concentraciones de fenoles, así como el incremento de la actividad de las enzimas relacionadas con la defensa, como la peroxidasa, polifenoloxidasa, glucanasa y quitinasa (Schurt *et al.*, 2014).

La combinación de oligoquitosano y silicio tuvo un 50 % de reducción en la incidencia de *Monilinia fructicola* en postcosecha en frutos de manzana, el mecanismo de acción del silicio puede ser dual, involucrando actividad antifúngica directa e inducción de respuestas de defensa en el fruto (Yang *et al.*, 2010). El metasilicato de sodio aplicado en dosis de 6 y 8 g·L⁻¹ redujeron satisfactoriamente la incidencia *Monilinia fructicola* en campo en comparación con el control, debido a que se aumentó la síntesis total de polifenoles (Pavanello *et al.*, 2016).

Polanco *et al.* (2014) evaluaron el efecto de las aplicaciones foliares de silicato de potasio (KSi), tanto solas como en combinación con fungicida, en el control de

antracnosis y, posteriormente, el rendimiento del frijol. Los resultados de este estudio sugieren la posibilidad de utilizar una aplicación foliar de KSi en asociación con un fungicida para reducir la gravedad de la antracnosis en las plantas de frijol y, posteriormente, lograr mayores ganancias en el rendimiento debido al crecimiento mejorado de la planta. El uso de silicio más dosis reducidas de fungicidas son tan efectivos como dosis completas de fungicidas solo. Estos resultados sugieren que el número de aplicaciones y la cantidad de fungicida pueden ser reducidas. El uso de silicio en el control de enfermedades de las plantas sería muy adecuado para su inclusión en una estrategia integrada de manejo de enfermedades y disminuir el uso de fungicidas al tiempo que mejora la resistencia de la planta a los patógenos.

Las aplicaciones exógenas de inductores de resistencia de plantas son capaces de activar las defensas de las plantas, lo cual, es interesante para implementar nuevas prácticas dentro de un manejo integrados de enfermedades. Los inductores muestran resultados alentadores para su uso como alternativas a los fungicidas tradicionales; sin embargo, su integración plena en prácticas agrícolas requiere de investigación para la optimización de sus aplicaciones en campo (Oliveira *et al.*, 2016).

Durante la última década, varios fungicidas que a menudo tenían un amplio espectro de control de enfermedades es postcosecha se retiraron del mercado debido a: (i) la selección de aislamientos fúngicos resistentes; (ii) toxicidad para los humanos y el medio ambiente; (iii) el riesgo de residuos de pesticidas en los productos (Romanazzi *et al.*, 2016). Por lo tanto, existe un interés en encontrar alternativas baratas, seguras y ecológicas a los fungicidas sintéticos para el manejo postcosecha de productos frescos. La inducción de resistencia en plantas por medios biológicos, químicos o físicos se

considera una estrategia sostenible para prolongar la vida de frutas y verduras después de la cosecha. Este enfoque ha tenido mayor importancia durante los últimos años y podemos ver una alta tendencia en los artículos que tratan sobre la resistencia inducida, de unos pocos registrados hace 30 años a más de 800 registrados anualmente en el periodo 2013-2015 (Gapper *et al.*, 2014). Por lo tanto, se tiene más conocimiento sobre las respuestas del patógeno a los inductores de resistencia, sin embargo, aún faltan más investigación para poder conocer las respuestas de cada patosistema.

El uso de los inductores implica un desgaste energético por parte de la planta y la teoría principal señala que la energía y recursos que se desvían a la síntesis de compuestos defensivos, no se pueden usar para el metabolismo primario, provocando la reducción del crecimiento. Esta teoría es apoyada por los resultados negativos observados al aplicar diferentes inductores a dosis altas o repetidamente (Llorens *et al.*, 2017). Entonces, el uso de los inductores como parte de un programa de manejo integrado se deben de considerar las dosis y el número de aplicaciones que sean convenientes para el cultivo en cuestión.

Literatura citada

- AbuQamar, S. F., Moustafa, K., y Tran, L. S. P. 2016. 'Omics' and plant responses to *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1658.
- Aćimović, S. G., Zeng, Q., McGhee, G. C., Sundin, G. W., y Wise, J. C. 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 16.
- Alexandersson, E., Mulugeta, T., Lankinen, Å., Liljeroth, E., y Andreasson, E. 2016. Plant resistance inducers against pathogens in Solanaceae species—from molecular mechanisms to field application. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1673.

- Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT) <http://faostat.fao.org> (Consultada octubre, 2020).
- Cao, J. y Jiang, W. 2007. Induction of resistance in Yali pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) fruit against postharvest diseases by acibenzolar-S-methyl sprays on trees during fruit growth. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 181-186.
- Casals, C., Viñas, I., Torres, R., Griera, C., y Usall, J. 2010. Effect of temperature and water activity on in vitro germination of *Monilinia* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 47-54.
- Chérif, M., Asselin, A. y Bélanger, R. R. 1994. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology*, 84(3), 236-242.
- Chester, K. S. 1933. The problem of acquired physiological immunity in plants. *The Quarterly Review of Biology*, 8(3), 275-324.
- Cicore, P. L., Suarez, P. A., Andreu, A. B. 2011. Phosphites effect on late blight control and physiological parameters in Commercial potato (*Solanum tuberosum* L.) in Argentina. *Global Science Book; Pest Technology*; 6; 1; 8-2011; 27-31
- Cohen, Y., Coffey, M. D. 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 24(1), 311-338.
- Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J., Jaskiewicz, M. R. 2015. Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53.
- Cui, H., Tsuda, K., Parker, J. E. 2015. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 487-511.
- Diaz-Vivancos, P., Bernal-Vicente, A., Cantabella, D., Petri, C., Hernández, J. A. 2017. Metabolomics and biochemical approaches link salicylic acid biosynthesis to cyanogenesis in peach plants. *Plant and Cell Physiology*, 58(12), 2057-2066.
- Egüen, B., Melgarejo, P., De Cal, A. 2015. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodione, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. *European Journal of Plant Pathology*, 141(4), 789-801.
- Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G. S. O'Brien, P. A. 2011. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 60(6), 1086-1095.
- Faize, L., Faize, M. 2018. Functional Analogues of Salicylic acid and their use in Crop Protection. *Agronomy*, 8(1), 5.

- Felipini, R. B., Boneti, J. I., Katsurayama, Y., Neto, A. C. R., Veleirinho, B., Maraschin, M., Di Piero, R. M. 2016. Apple scab control and activation of plant defence responses using potassium phosphite and chitosan. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 929-939.
- Fu, Z. Q., Dong, X. 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 839-863.
- Gao, Q. M., Zhu, S., Kachroo, P., Kachroo, A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 6, 228.
- Gapper, N. E., Giovannoni, J. J., Watkins, C. B. 2014. Understanding development and ripening of fruit crops in an 'omics' era. *Horticulture Research*, 1, 14034.
- Gautam, J. K., Nandi, A. K. 2018. APD1, the unique member of Arabidopsis AP2 family influences systemic acquired resistance and ethylene-jasmonic acid signaling. *Plant Physiology and Biochemistry*, 133, 92-99.
- Gell, I., De Cal, A., Torres, R., Usall, J., Melgarejo, P. 2009. Conidial density of *Monilinia* spp. on peach fruit surfaces in relation to the incidences of latent infections and brown rot. *European Journal of Plant Pathology*, 123(4), 415-424.
- Gianinazzi, S., y Kassanis, B. 1974. Virus resistance induced in plants by polyacrylic acid. *Journal of General Virology*, 23(1), 1-9.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227.
- Gozzo, F., y Faoro, F. 2013. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(51), 12473-12491.
- Hailey, L. E., y Percival, G. C. 2014. Comparative Assessment of Phosphite Formulations for Apple Scab (*Venturia inaequalis*) Control. *Arboriculture & Urban Forestry*, 40(4).
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., Greenberg, J. T. 2009. Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324(5923), 89-91.
- Klessig, D. F., Choi, H. W., Dempsey, D. M. A. 2018. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(9), 871-888.
- Kreidl, S., Edwards, J., Villalta, O. N. 2015. Assessment of pathogenicity and infection requirements of *Monilinia* species causing brown rot of stone fruit in Australian orchards. *Australasian Plant Pathology*, 44(4), 419-430.
- Lamichhane, J. R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P., Messéan, A. 2016. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. *Plant Disease*, 100(1), 10-24.

- Landi, L., De Miccolis Angelini, R. M., Pollastro, S., Feliziani, E., Faretra, F., Romanazzi, G. 2017. Global transcriptome analysis and identification of differentially expressed genes in strawberry after preharvest application of benzothiadiazole and chitosan. *Frontiers in Plant Science*, 8, 235.
- Lee, H. A., Lee, H. Y., Seo, E., Lee, J., Kim, S. B., Oh, S., Choi, D. 2017. Current understandings of plant nonhost resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(1), 5-15.
- Li, X., Bi, Y., Wang, J., Dong, B., Li, H., Gong, D., Zhao, Y., Tang, Y. M., Yu, X. Y., Shang, Q. 2015. BTH treatment caused physiological, biochemical and proteomic changes of muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit during ripening. *Journal of Proteomics*, 120, 179-193.
- Liljeroth, E., Bengtsson, T., Wiik, L., Andreasson, E. 2010. Induced resistance in potato to *Phytophthora infestans*—effects of BABA in greenhouse and field tests with different potato varieties. *European Journal of Plant Pathology*, 127(2), 171-183.
- Liljeroth, E., Lankinen, Å., Wiik, L., Burra, D. D., Alexandersson, E., y Andreasson, E. (2016). Potassium phosphite combined with reduced doses of fungicides provides efficient protection against potato late blight in large-scale field trials. *Crop Protection*, 86, 42-55.
- Lin, J., Gong, D., Zhu, S., Zhang, L., Zhang, L. 2011. Expression of PPO and POD genes and contents of polyphenolic compounds in harvested mango fruits in relation to Benzothiadiazole-induced defense against anthracnose. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 85-89.
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y., y Luo, Y. 2005. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, 35(3), 263-269.
- Liu, L., Zhang, J., Adrian, J., Gissot, L., Coupland, G., Yu, D., Turck, F. 2014. Elevated levels of MYB30 in the phloem accelerate flowering in *Arabidopsis* through the regulation of FLOWERING LOCUS T. *PLoS One*, 9(2), e89799.
- Llorens, E., García-Agustín, P., Lapeña, L. 2017. Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. *Scientia Agricola*, 74(1), 90-100.
- Loera-Quezada, M. M., Leyva-González, M. A., López-Arredondo, D. Herrera-Estrella, L. 2015. Phosphite cannot be used as a phosphorus source but is non-toxic for microalgae. *Plant Science*, 231, 124-130.
- Ma, J. F., y Yamaji, N. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science*, 11(8), 392-397.

- Martini, C., y Mari, M. 2014. *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (Monilinia rot, brown rot). In Postharvest Decay (pp. 233-265). Academic Press. Elsevier, Eastbourne, UK.
- Moreira, L. M., y May-de Mio, L. L. 2009. Controle da podridão parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. *Ciência e Agrotecnologia*, 33(2), 405-411.
- Obi, V. I., Barriuso, J. J., y Gogorcena, Y. 2018. Peach brown rot: still in search of an ideal management option. *Agriculture*, 8(8), 125.
- Oliveira Lino, L., Pacheco, I., Mercier, V., Faoro, F., Bassi, D., Bornard, I., Quilot-Turion, B. 2016. Brown rot strikes *Prunus* fruit: an ancient fight almost always lost. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(20), 4029-4047.
- Oliveira, M. D. M., Varanda, C. M. R., y Félix, M. R. F. 2016. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters*, 15, 152-158.
- Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D. F. 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318(5847), 113-116.
- Pavanello, E. P., Brackmann, A., Costa, I. F. D. D., Both, V., Ludwig, V. 2016. Use of sodium metasilicate for management of peach brown rot. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46(3), 245-253.
- Percival, G. C., y Noviss, K. 2010. Evaluation of potassium phosphite and myclobutanil combinations for pear scab (*Venturia pirina*) suppression. *Journal of Arboriculture*, 36(2), 86.
- Polanco, L. R., Rodrigues, F. A., Moreira, E. N., Duarte, H. S. S., Cacique, I. S., Valente, L. A., Vieira, R. F., Vale, F. X. R. 2014. Management of anthracnose in common bean by foliar sprays of potassium silicate, sodium molybdate, and fungicide. *Plant Disease*, 98(1), 84-89.
- Ren, Y., Wang, Y., Bi, Y., Ge, Y., Wang, Y., Fan, C., Li, D., Deng, H. 2012. Postharvest BTH treatment induced disease resistance and enhanced reactive oxygen species metabolism in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. *European Food Research and Technology*, 234(6), 963-971.
- Rodrigues F. A., Resende R. S., Dallagnol L. J., Datnoff L. E. 2015. Silicon potentiates host defense mechanisms against infection by plant pathogens. In: *Silicon and Plant Disease*. Rodrigues F. A., and L. E. Datnoff (eds.). Springer International Publishing, Switzerland, pp. 109–138.
- Romanazzi, G., Sanzani, S. M., Bi, Y., Tian, S., Martínez, P. G., Alkan, N. 2016. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 82-94.

- Ross, A. F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14(3), 340-358.
- Schurt, D. A., Cruz, M. F., Nascimento, K. J., Filippi, M. C., Rodrigues, F. A. 2014. Silicon potentiates the activities of defense enzymes in the leaf sheaths of rice plants infected by *Rhizoctonia solani*. *Tropical Plant Pathology*, 39(6), 457-463.
- Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P., Kachroo, A. 2019. Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science*, 279, 81-86.
- SIAP. 2018. Cierre de producción agrícola 2018 por cultivo. <http://www.siap.gob.mx> Consultada en marzo de 2018.
- Singh, V., Singh, D., Gautam, J. K., Nandi, A. K. 2019. RSI1/FLD is a positive regulator for defense against necrotrophic pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 107, 40-45.
- Stael, S., Kmiecik, P., Willems, P., Van Der Kelen, K., Coll, N. S., Teige, M., y Van Breusegem, F. 2015. Plant innate immunity—sunny side up?. *Trends in Plant Science*, 20(1), 3-11.
- Tian, S., Torres, R., Ballester, A. R., Li, B., Vilanova, L., González-Candelas, L. 2016. Molecular aspects in pathogen-fruit interactions: virulence and resistance. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 11-21.
- Tripathi, D., Jiang, Y. L., y Kumar, D. 2010. SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Letters*, 584(15), 3458-3463.
- Van Leeuwen, G. C., Baayen, R. P., Jeger, M. J. 2002. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycological Research*, 106(4), 444-451.
- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., Pieterse, C. M. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 443-448.
- Walters, D. R., Ratsep, J. Havis, N. D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263-1280.
- Wang, C., El-Shetehy, M., Shine, M. B., Yu, K., Navarre, D., Wendehenne, D., Kachroo A., Kachroo, P. 2014. Free radicals mediate systemic acquired resistance. *Cell Reports*, 7(2), 348-355.
- Wei, M., Ge, Y., Li, C., Han, X., Qin, S., Chen, Y., Tang, Q., Li, J. 2019. G6PDH regulated NADPH production and reactive oxygen species metabolism to enhance disease resistance against blue mold in apple fruit by acibenzolar-S-methyl. *Postharvest Biology and Technology*, 148, 228-235.

- Xu, X. M., Bertone, C., Berrie, A. 2007. Effects of wounding, fruit age and wetness duration on the development of cherry brown rot in the UK. *Plant Pathology*, 56(1), 114-119.
- Yamasaki, K., Motomura, Y., Yagi, Y., Nomura, H., Kikuchi, S., Nakai, M., Shiina, T. 2013. Chloroplast envelope localization of EDS5, an essential factor for salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(4), e23603.
- Yang, L., Zhao, P., Wang, L., Filippus, I., Meng, X. 2010. Synergistic effect of oligochitosan and silicon on inhibition of *Monilinia fructicola* infections. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(4), 630-634.

CAPÍTULO I. USO DE INDUCTORES DE RESISTENCIA Y FUNGICIDAS EN EL MANEJO DE *Monilinia fructicola* EN DURAZNO EN POSTCOSECHA

1.1. RESUMEN

La pudrición café causada por *Monilinia* spp. es una de las enfermedades más destructivas en durazno. La integración de inductores de resistencia en combinación con fungicidas podría ser una opción para reducir las pérdidas en postcosecha por este patógeno. El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de cuatro niveles del factor inductor de resistencia: acibenzolar-S-Metil, fosfito de potasio, silicato de potasio y sin inductor (agua potable) en combinación con tres niveles del factor fungicidas: sin fungicida, dosis reducida y dosis completa recomendada comercialmente. Los tratamientos se aplicaron durante el desarrollo del fruto en los ciclos productivos 2017 y 2018. El diseño experimental fue en bloques completos al azar. En postcosecha se inocularon frutos con *Monilinia fructicola* y midió el diámetro de la lesión para evaluar área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y determinar la tasa de incremento. Se evaluó el contenido de fenoles totales y la actividad de peroxidasa, polifenoloxidasas, catalasa y fenilalanina amonio liasa. Se evaluó el estatus nutrimental foliar. Se observó un porcentaje de eficiencia en la reducción del ABCPE de 47% con la interacción fosfito de potasio y dosis completa de fungicida con respecto al testigo. Se incrementó el contenido de fenoles y la actividad de las enzimas. La aplicación de los inductores incrementó el contenido de calcio. La interacción de los factores inductor y año modificó los contenidos de fósforo, magnesio y azufre.

Palabras clave: *Monilinia fructicola*, inductores, fosfito de potasio, epidemia, actividad enzimática.

1.2. INTRODUCCIÓN

La pudrición café causada por *Monilinia* spp. es una de las enfermedades más destructivas en durazno. En condiciones favorables para el patógeno, la incidencia de la enfermedad alcanza el 80 % especialmente en huertos con variedades tardías (Egüen *et al.*, 2015); con pérdidas anuales a nivel mundial de 1.7 mil millones de euros (Martini y Mari, 2014). Los principales factores que causan las pérdidas por *Monilinia* spp. son la susceptibilidad a la infección que va desde la floración hasta postcosecha, los factores climáticos, aparición de cepas resistentes a fungicidas y la escasa disponibilidad de variedades resistentes (Oliveira *et al.*, 2016).

El control de *Monilinia* spp. se realiza principalmente con productos químicos que garantizan la inhibición del patógeno; sin embargo, su uso constante y desmedido puede inducir resistencia de las distintas cepas de *Monilinia* spp. Por lo tanto, se buscan alternativas de manejo que proporcionen un control adecuado y que sean amigables con el ambiente. Una de estas alternativas es activar los mecanismos de defensa de la planta conocido como resistencia sistémica adquirida (SAR), lo cual se puede lograr mediante la aplicación de inductores o elicitores. Los inductores, activan vías de transducción de señales que generalmente conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno, biosíntesis de fitoalexinas, refuerzo de la pared celular de la planta asociada con compuestos fenilpropanoides, deposición de calosa, síntesis de enzimas de defensa (peroxidasa, polifenoloxidasas, catalasa, superóxido dismutasa, fenilalanina amonio liasa, etc) y acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), que tienen propiedades antimicrobianas (Thakur y Sohal, 2013).

Diversas investigaciones indican que cuando se combinan los inductores con fungicidas se obtiene un mejor control de las enfermedades que cuando se utilizan cada uno por separado (Walters *et al.*, 2013; Romanazzi *et al.*, 2016). Un aspecto importante para considerar es el efecto que pueden tener los inductores en el estado nutrimental debido a que implica un desgaste metabólico al activar los mecanismos de defensas. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de tres inductores de resistencia en combinación con fungicidas en la severidad de *Monilinia* spp., el contenido de fenoles totales, actividad de las enzimas polifenoloxidasas (PPO), peroxidasa (POD), catalasa (CAT) y fenilalanina amonio liasa (PAL) y estatus nutrimental en durazno.

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental

El experimento en campo se llevó a cabo en la comunidad de Tezontepec, Municipio de Tepeyahualco, Puebla, localizada en la parte noreste del Estado. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 19° 23' 06" y 19° 42' 42" de latitud norte y los meridianos 97° 21' 54" y 97° 21' 18" de longitud occidental a 2450 msnm. El clima del sitio es semiseco templado con una precipitación media anual de 392 mm, humedad relativa de 70.21 % y temperatura media anual de 14 °C (CONAGUA, 2014). El suelo en la región es Regosol eútrico (INEGI, 2000).

Factores en estudio y aplicación de tratamientos

Se estudió el efecto de dos factores: inductores de resistencia y dosis de fungicidas. Los cuatro niveles del factor inductor de resistencia fueron: Acibenzolar-S-Metil (ACTIGARD® 50 GS), Fosfito Potásico (HORTIKEM PHOS K®), Silicato de Potasio

(Silisec-K®) y sin inductor (agua potable). Los tres primeros aplicados a dosis de 75 mg·L⁻¹, 3.5 ml·L⁻¹ y 3 ml·L⁻¹, respectivamente. Los tres niveles del factor fungicidas fueron: sin fungicida, dosis reducida y dosis completa recomendada comercialmente. Los fungicidas utilizados fueron captan (CAPTAN 50 WP ®), clorotalonil (BRAVO® 720) y tiofanato metílico (CERCOBIN®); se utilizaron los mismos fungicidas en todos los tratamientos. La combinación de ambos factores dio el total de 12 tratamientos (Cuadro 1). La primera aplicación fue con captan, la segunda con clorotalonil, y la última con tiofanato metílico. Todos los tratamientos se aplicaron a los 40, 80 y 110 días después de la floración.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados en campo.

Tratamiento	Inductor	Fungicida
1	Silicato de potasio	Sin fungicida
2	Silicato de potasio	Dosis reducida (75% de la dosis recomendada comercialmente)
3	Silicato de potasio	Dosis completa (100% de la dosis comercial)
4	Acibenzolar-S-Metil	Sin fungicida
5	Acibenzolar-S-Metil	Dosis reducida (75% de la dosis recomendada comercialmente)
6	Acibenzolar-S-Metil	Dosis completa (100% de la dosis comercial)
7	Fosfito de potasio	Sin fungicida
8	Fosfito de potasio	Dosis reducida (75% de la dosis recomendada comercialmente)
9	Fosfito de potasio	Dosis completa (100% de la dosis comercial)
10	Sin inductor	Sin fungicida
11	Sin inductor	Dosis reducida (75% de la dosis recomendada comercialmente)
12	Sin inductor	Dosis completa (100% de la dosis comercial)

Las aplicaciones de los tratamientos se realizaron a las primeras horas del día, con una aspersora manual Jacto® de 20 L previamente calibrada. Todas las mezclas llevaban adherente Inex-A®.

Diseño experimental

El diseño experimental fue en bloques al azar con cuatro repeticiones. Los bloques se orientaron perpendicularmente al viento predominante. La unidad experimental fue de seis árboles, se dejaron dos hileras entre bloque y una entre tratamientos.

Manejo del cultivo

Para todos los tratamientos se realizó una fertilización por árbol como a continuación se indica: en febrero se aplicaron 22 g de nitrógeno, 10 g de fósforo, 64 g de potasio, 48 g de calcio y 8 g de magnesio y en septiembre se aplicaron 44 g de nitrógeno. Las otras prácticas de manejo del cultivo se llevaron a cabo según el manejo convencional.

La temperatura y humedad relativa se registraron cada 5 minutos en una microestación meteorológica HOBO H21-USB (Onset Computer Corporation, Bourne, USA), instalada en el centro de la parcela experimental. La temperatura media anual y humedad relativa fue de 14 °C y 73.3% en el 2017 y de 14.6 °C y 74.1% para el 2018.

Aislamiento y caracterización de *Monilinia* spp.

En primer lugar, se recolectaron frutos en campo con síntomas típicos de *Monilinia* spp., los cuales se desinfectaron por inmersión con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) por 2 min. Posteriormente se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril; fragmentos (5 x 5 mm) de frutos con aproximadamente 20% de tejido sintomático y 80% de tejido sano se sembraron en cajas Petri con Agar-Durazno (200 gr durazno, 20 gr Agar en 1000 mL de agua destilada). Se incubaron a temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$),

y se purificaron mediante la técnica de cultivo monospórico con el fin de realizar pruebas de patogenicidad e identificación molecular.

A partir de cajas Petri con crecimiento miceliar, se realizaron preparaciones semipermanentes para determinar las características morfológicas como: tamaño de los conidios (largo, ancho) y apariencia de la colonia.

Para la caracterización molecular se realizó extracción de DNA a partir de aislados de *Monilinia* con siete días de crecimiento micelial. De cada aislado se raspó la superficie usando una espátula de acero inoxidable estéril, el micelio se depositó en un mortero estéril, se le agregó nitrógeno líquido y se maceró con un pistilo, el macerado se depositó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL con 500 μ L de buffer extracción (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, 2% SDS, 0.2 mg/mL de proteinasa K), se mezcló con vórtex y se incubó por una hora a 38 °C. A cada tubo se le añadió 70 μ L de NaCl 5 M, 30 μ L de CTAB 10% y se mezcló por vórtex por 10 s, después se incubó a 65 °C durante una hora. Se agregó 700 μ L de Cloroformo-alcohol isoamilico (24:1v/v) se pasaron por vórtex por 10 s y se centrifugó (5810 R Eppendorf® EE.UU.) a 13 000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de microcentrifuga de 1.5 mL, se agregaron 640 μ L de isopropanol y 60 μ L de acetato de sodio 3M. Los tubos se mezclaron por inversión de cuatro a cinco veces y se almacenaron a -20 °C durante 10 minutos, luego se centrifugó a 13 000 g durante 10 minutos, para sedimentar el DNA. Se agregó a cada tubo 500 μ L de etanol al 70 %, se centrifugó a 13 000 g por 5 minutos y se desechó de nuevo el sobrenadante. En papel absorbente se colocaron los tubos para secar el etanol, posteriormente cuando la pastilla estuvo seca se agregó 100 μ L de agua estéril libre de DNAsa y RNAsa (Promega). La calidad y concentración del ADN se cuantificó mediante

un espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific®, EE.UU.). Finalmente, el DNA se almacenó a -20°C para su uso posterior.

Para la PCR se amplificó el espacio transcrito 2 con el uso de los primers ITS 1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) y 4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (White *et al.*, 1990) y mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 50 µL, buffer de PCR 1x, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.8 µM de cada primer, 0.04 U DNA polimerasa (Promega, EE.UU.) y 4 ng de DNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C-1000 (Bio-Rad, EE.UU.), con una desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; y una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % con buffer de corrida TAE 1X. Se usaron 5 µL del producto de PCR y 3 µL de buffer de carga, para llevar a electroforesis a 90 volts. El gel se analizó con luz ultravioleta en un transiluminador M-26X usando un sistema de imágenes GelDoc-It™ 300 (UVP, EE.UU.).

Los fragmentos amplificados con los primers ITS 1/ITS 4, fueron purificados mediante el protocolo de DNA clean & concentrator™-5 (Zymo Research, EE. UU.). Dichos fragmentos de DNA purificados se mandaron a secuenciar a Corea a la empresa MacroGen®. Las secuencias obtenidas se alinearon con la base de datos en NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), posteriormente se registraron en la misma base de datos para obtener el número de acceso.

Patogenicidad de *Monilinia* spp. en frutos de durazno

El inóculo de *Monilinia* se incrementó en medio de cultivo durazno-agar y se desarrolló por un período de siete días a 28 °C en condiciones de oscuridad en una incubadora (Thermo scientific® EE.UU.). Se preparó una suspensión conidial raspando el crecimiento micelial de las cajas Petri con *Monilinia* para obtener los conidios, los cuales fueron ajustados a una concentración de 1×10^5 conidios mL^{-1} mediante el uso de una cámara Neubauer. Duraznos de la variedad Atlax, previamente desinfestados con hipoclorito de sodio al 2% fueron inoculados con la concentración previamente elaborada de conidios. Una vez inoculados los duraznos, éstos fueron depositados en cámaras húmedas y mantenidos a una temperatura a 28 °C. La patogenicidad de los aislados pudo ser confirmada una vez que se presentaron los síntomas característicos de *Monilinia* spp. en frutos.

Evaluación del efecto de los tratamientos en postcosecha

Se colectaron 20 frutos en madurez fisiológica (por tratamiento) de los árboles tratados, dos días después de la última aplicación de los tratamientos en campo. Los frutos estaban libres de daño físico e infecciones, se desinfestaron sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 2% (v/v).

Se preparó una suspensión de esporas de *M. fructicola* inundando las cajas Petri de cultivo monosporico de 14 días con agua destilada estéril que contenía Tween-20 al 0.01% a concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} . Los frutos previamente recolectados en campo se desinfestaron sumergiéndolos durante 2 min en una solución de hipoclorito de

sodio al 2% (v/v), posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel secante estéril a temperatura ambiente.

Para inocular el patógeno sobre los frutos, se utilizó una aguja de disección esterilizada y se hicieron dos heridas de 2 mm de profundidad y sobre dichas heridas se depositaron 10 μL de la suspensión conidial (1×10^5 conidios mL^{-1}) del patógeno. Los frutos se colocaron en cámara húmeda a temperatura de 26 ± 2 °C, se midió el diámetro de la lesión cada 12, 24, 36 Y 48 horas después de la inoculación con un vernier digital marca Truper ®.

Con los datos obtenidos de severidad se describió el desarrollo de *Monilinia fructicola* en los frutos en postcosecha a través del tiempo; por dos métodos: ajuste de modelos epidemiológicos (Logístico, Monomolecular, Exponencial, Gompertz) (Madden *et al.*, 2007); y cálculo de área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), ambos análisis se llevaron a cabo en SAS (Statistical Analysis System) Software Versión 9.0. El modelo que mejor describió el desarrollo de *Monilinia fructicola* fue el Gompertz: $y = \exp(-Be^{rGt})$ donde y = intensidad de la enfermedad; B es una constante de integración igual a $-\ln(y_0)$; y_0 es una constante de integración y representa la intensidad de la enfermedad a $t = 0$ (t = tiempo) y rG es la tasa de incremento.

Con este modelo se obtuvieron los datos de los parámetros descriptivos: la intensidad inicial de *Monilinia* al tiempo 0 y la tasa de incremento del daño de *Monilinia* en mm por hora en los frutos inoculados, lo cual permitió diferenciar el desarrollo de *Monilinia* en cada uno de los tratamientos.

El ABCPE se calculó por el método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1991) utilizando la siguiente ecuación: $ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{Y_{i+1} + Y_i}{2} \right) (X_{i+1} - X_i)$ donde n es el número de mediciones de la enfermedad en el tiempo, $(Y_{i+1} + Y_i)/2$ es el punto medio entre Y_i y Y_{i+1} que representa la cantidad de enfermedad en un intervalo de tiempo, correspondiente a la altura de cada rectángulo, y $X_{i+1} - X_i$ representa el tiempo entre dos evaluaciones de la enfermedad e indica la anchura de cada trapecio.

Análisis bioquímico de los frutos

Se recolectaron 48 frutos por tratamiento a los 8 días después de la última aplicación de los tratamientos. Las muestras se lavaron con acetona hasta obtener polvos de acetona y el filtrado se guardó en refrigeración (entre 2 y 5°C) bajo condiciones de oscuridad total para el análisis de fenoles.

Fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por el método Folin-Ciocalteu modificado por Waterman y Mole (1994). Se utilizó 0.5 mL del sobrenadante de acetona obtenido del procedimiento del polvo de acetona y se agregó 7.5 mL de agua destilada y 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu posteriormente se mezcló durante 8 minutos y se adicionó 1.5 mL de carbonato de sodio al 20 %. Se agitó y se dejó reposar durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de fenoles totales a 760 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10 Thermo Scientific®, EE.UU.). La cuantificación se realizó estableciendo una curva patrón de ácido tánico, la cual mostró un ajuste con una $r^2=0.9992$, la concentración de fenoles totales se registró como $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.

Actividad de peroxidasa (POD), polifenoloxidasa (PFO), catalasa (CAT) y fenilalanina amonio liasa (PAL)

Todas las enzimas se extrajeron a partir de 0.1 g de polvo de acetona. Para evaluar la actividad de la peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7), se homogeneizó el polvo de acetona en 5 ml de Tris-HCl frío (pH 7.1) que contenía 1 % de polivinilpirrolidona (20 000), se homogeneizó por 50 s y se centrifugó por 20 min a 8500 x g a 4°C (Alia-Tejacal *et al.*, 2002). El sobrenadante se utilizó para el ensayo de la POD, el cual se realizó de acuerdo con Flurkey y Jen (1978), con las siguientes modificaciones: se tomaron 0.035 mL del sobrenadante y se mezclaron con 2.3 ml de amortiguador Tris-HCl (pH 7.1), 0.025 mL de guayacol (0.1M) y 0.01ml de peróxido de hidrógeno al 0.25%, para hacer un total de 3 mL. El cambio de absorbancia a 470 nm (mismo espectrofotómetro) se evaluó a los 30, 60, 120 s. La actividad enzimática se reportó como U mg⁻¹ de proteína, donde U = unidad de actividad enzimática la cual es igual a la formación de 1 mmol min⁻¹ de tetraguayacol.

La actividad de la polifenoloxidasa (PPO, EC 1.14.18.1) se evaluó mediante el método propuesto por Laminkara (1995) con modificaciones, se tomó el mismo sobrenadante y la mezcla de reacción consistió de 2.8 ml de catecol (60 mM) y 0.02 ml del sobrenadante, se determinó el cambio de absorbancia en 60 s a 420 nm. La actividad enzimática se reportó como unidades por miligramo de proteína (U mg⁻¹) de proteína, donde U=Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 μmol de o-benzoquinona/min.

La actividad de la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se evaluó con el método descrito por Blackwell *et al.* (1990), con modificaciones. La enzima se extrajo a partir del polvo de

acetona, el cual se mezcló con 5 mL de Tris-HCl (0.1 M) frío (pH 8.5) que contenía 1 % de polivinilpirrolidona. Se homogeneizó por 50 s y se centrifugó por 20 min a 10 000 x g a 4°C. La mezcla de la reacción consistió en 2.5 ml de Tris-HCl (pH 8.5 10 mM), 0.1 ml de H₂O₂, (88%), y 0.4 ml de sobrenadante para hacer un volumen final de 3 ml. El cambio de absorbancia se evaluó en 3 minutos a 240 nm en un espectrofotómetro. La actividad enzimática se reportó como U mg⁻¹ de proteína, donde U= Unidad de actividad enzimática la cual representa la descomposición de 1 μmol·min⁻¹ de H₂O₂.

La extracción de la PAL (PAL, EC 4.3.1.24) se realizó de acuerdo a lo descrito por Martínez-Tellez y Lafuente (1997) y la actividad enzimática se evaluó según Arz y Grambow (1995) con modificaciones. La mezcla de reacción contenía 1.8 mL⁻¹ borato de sodio 0.1 M (pH 8.8), 0.9 mL⁻¹ extracto final, preincubado a 40 °C por 5 min, 0.3 mL⁻¹ L-fenilalanina 100 mM, y se midió la absorbancia a 290 nm. Simultáneamente se efectuó el ensayo de una repetición de la muestra con 2.1 mL borato de sodio 0.1 M (pH 8.8) y 0.9 mL extracto final. Se evaluó el cambio de absorbancia en 2 h a 290 nm a 40 °C. La actividad enzimática se reporta como U mg⁻¹ proteína, donde U= incremento (absorbancia) a 290 nm h⁻¹.

Todas las pruebas se realizaron a temperatura ambiente, entre 20-22°C. La actividad enzimática de la POD, PFO, CAT y PAL se expresó como U mg⁻¹ de proteína, donde una unidad se manifestó como el incremento de la velocidad de la absorbancia por masa de proteína por minuto, que para fines prácticos se mencionó como unidades de POD, PFO, CAT y PAL.

La concentración de proteína se determinó de acuerdo con el método descrito por Bradford (1976). Se empleó albúmina de suero bovino (BSA; Sigma Chemical Co.) como estándar de calibración y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm.

La actividad de POD y PFO se realizaron en muestras por cuadruplicado, para el caso de CAT y PAL por duplicado. Se realizó un análisis de varianza para comparar el efecto de los inductores en la actividad de POD, PFO, CAT y PAL, con una significancia de $\alpha=0.05$. Cuando el análisis fue estadísticamente significativo, se realizó la prueba LSD para la comparación de medias ($\alpha=0.05$), en ambos casos se utilizó el programa SAS (Statistical Analysis System) Software Versión 9.0.

Efecto de los inductores en el estatus nutrimental

Para la evaluación del estatus nutrimental únicamente se realizaron muestreos en los tratamientos con los inductores sin considerar los que incluían fungicidas. Se recolectaron 50 hojas sanas y completamente desarrolladas de la parte media de las ramas de los cuatro puntos cardinales de cada unidad experimental. Las muestras se trasladaron en bolsas de papel y se secaron en estufa de aire forzado a una temperatura de 70 °C por 72 horas.

En la hoja se determinó la concentración de N por micro-Kjeldahl, y de P, K, Ca, Mg y Cu, por digestión húmeda con mezcla ácida ($\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$). Para el caso de S y Si, se utilizó una digestión con HNO_3 y HClO_4 . La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro de emisión atómica de inducción acoplada con plasma (Modelo

Liberty Serie II Secuencial, Marca Varian®, Alemania) (Alcántar y Sandoval, 1999). El análisis de los elementos se realizó en muestras por cuadruplicado.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza con una significancia de $P \leq 0.05$ y cuando la interacción de los factores fue significativa, se realizó la prueba LSD para la comparación de medias ($\alpha=0.05$). En ambos casos se utilizó el programa SAS (Statistical Analysis System) Software Versión 9.0.

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación del aislado de *Monilinia* spp.

Se observaron conidios en cadena, característicos de *Monilinia* que al ser medidos tuvieron un tamaño de 8.54 - 14.81 μm x 6.81 - 8.69 μm , coincidiendo con *M. fructicola* (Hu *et al.*, 2011). Se obtuvieron secuencias de la región 5.8 S del RNA ribosomal, con un tamaño de 512 pb, las secuencias obtenidas fueron registradas en la base de datos en NCBI y se obtuvo el número de acceso: MW033930.

Al analizarlo con la herramienta BLASTn del NCBI, se encontró 100% de similitud con *Monilinia fructicola* (número de acceso: MK566185), lo cual coincide con la caracterización morfológica.

Efecto de los tratamientos en la inhibición de *Monilinia fructicola*

La interacción de los inductores con los fungicidas generó diferencias estadísticas significativas en el ABCPE, severidad final y tasa de incremento (Cuadro 2). La combinación de la dosis completa de los fungicidas con el fosfito de potasio disminuyó el

ABCPE, tasa de incremento y severidad final. La mayor ABCPE se presentó en la combinación sin inductor y sin fungicida (testigo) en los dos años de evaluación (Figura 1A).

Se observó un porcentaje de eficiencia en la reducción del ABCPE de 47% con la interacción fosfito de potasio y dosis completa de fungicida con respecto al testigo; cuando se aplicaron cada uno por separado la reducción fue del 13 y 15.5%, con fosfito y dosis completa, respectivamente (Figura 1A).

La combinación de fosfito de potasio con dosis reducida de fungicida también disminuyó los parámetros epidemiológicos tal y como lo reportaron Percival y Noviss (2010), quienes concluyeron que la combinación de fosfito con una dosis reducida de myclobutanil mejoró significativamente la eficiencia en el control de roña en hojas y frutos de pera, en comparación con la aplicación de cada producto por separado.

Cuadro 2. Análisis de varianza de los parámetros epidemiológicos de *Monilinia fructicola*, fenoles totales y actividad enzimática en frutos de durazno en postcosecha en respuesta a los factores de inductores de resistencia, dosis de fungicida y años de evaluación.

Fuente de variación	gl	ABCPE	Severidad final	Tasa de incremento	Fenoles totales	Polifenoloxidasa	Peroxidasa	Catalasa	PAL
Inductor	3	**	**	**	**	**	**	**	ns
Dosis de fungicida	2	**	**	**	ns	ns	ns	ns	ns
Inductor x dosis de fungicida	6	**	**	**	ns	**	**	**	ns
Año	1	**	**	**	**	**	**	ns	*
Inductor x año	3	**	**	ns	**	**	**	ns	ns
Dosis de fungicida x año	2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Inductor x dosis de fungicida x año	6	ns	ns	ns	ns	*	*	*	ns

*, ** diferencias significativas con $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente; ns = no significativo con $P = 0.05$; gl = grados de libertad. ABCPE = área bajo la curva del progreso de la enfermedad. PAL = fenilalanina amonio liasa.

La severidad final se redujo en un 36.6% con la combinación fosfito de potasio más dosis completa de fungicida (Figura 1B) con respecto a la combinación sin inductor y sin fungicida. La combinación acibenzolar con dosis completa de fungicida fue la segunda combinación que redujo en mayor porcentaje la severidad final.

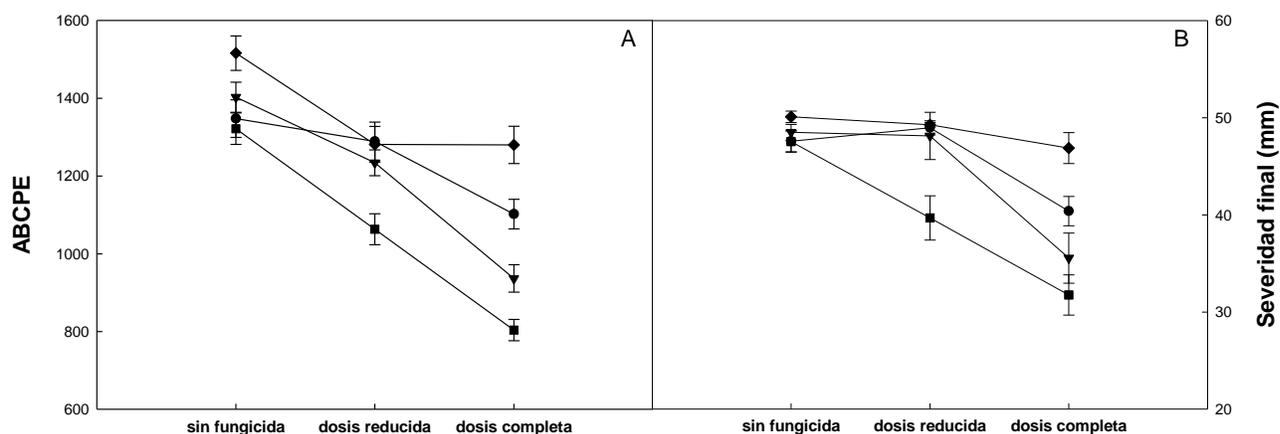


Figura 1. Efecto en postcosecha de las interacciones de inductores de resistencia: acibenzolar-S-Metil (●), silicato de potasio (▼), fosfito de potasio (■), sin inductor (◆) y porcentaje de fungicidas en (A) el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y (B) severidad final de *Monilinia fructicola* en frutos de durazno. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 32).

De acuerdo con el análisis de varianza la interacción de los factores inductor de resistencia y año de evaluación fue significativa para el ABCPE y severidad final (Cuadro 2). En el segundo año de evaluación se observó un incremento del ABCPE con todos los inductores (Figura 2A), la misma tendencia se observó con la severidad final (Figura 2B). Esto se puede deber a que la respuesta de los inductores está influenciada por muchos factores tales como genotipo de la planta, las etapas fenológicas y las condiciones ambientales (Lovatt, 2013). Sin embargo, a pesar de que el efecto de los inductores se

vio afectado por el año, las interacciones en donde se incluyeron los inductores fueron las que presentaron la mayor disminución de los parámetros epidemiológicos.

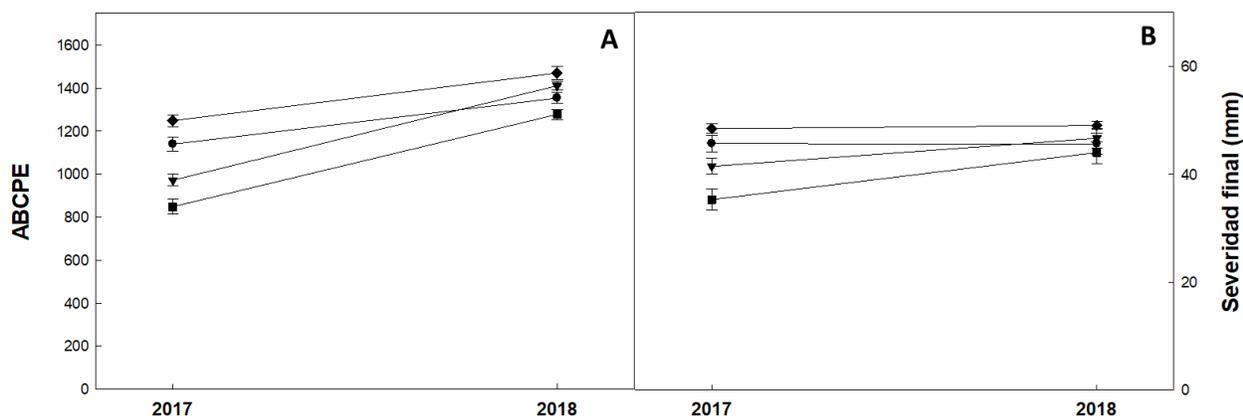


Figura 2. Efecto en postcosecha de las interacciones de inductores de resistencia acibenzolar-S-Metil (●), silicato de potasio (▼), fosfito de potasio (■), sin inductor (◆) y los años de evaluación en (A) el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y (B) severidad final de *Monilinia fructicola* en durazno. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 32).

La tasa de incremento de *Monilinia fructicola* disminuyó en un 28 % con la combinación fosfito de potasio y dosis completa de fungicidas (Figura 3A) con respecto al testigo. La menor tasa de incremento se presentó en el año 2017 (Figura 3B). Este efecto se puede deber a que el fungicida reduce la concentración de esporas que son fuente de inóculo primario, permitiendo que el tiempo para el inicio de la enfermedad sea desplazado por una baja concentración de esporas de *Monilinia fructicola*; mientras tanto el efecto de los inductores se expresa en los frutos, el cual actúa directamente en la tasa de incremento.

Algunas investigaciones indican, que los fosfitos representan un insumo agrícola eficiente para proteger los cultivos contra organismos patógenos, debido a que tienen un doble modo de acción, el cual incluye la inhibición directa del crecimiento de patógeno y la estimulación de las defensas de la planta (Alexandersson *et al.*, 2016).

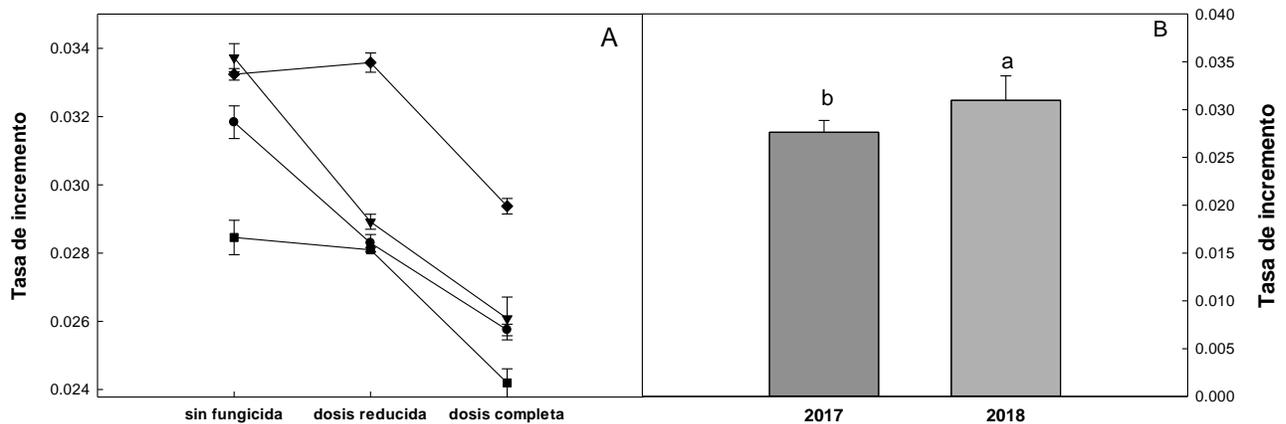


Figura 3. Efecto en postcosecha de las interacciones de (A) inductores de resistencia acibenzolar-S-Metil (●), silicato de potasio (▼), fosfito de potasio (■), sin inductor (◆) y dosis de fungicidas en la tasa de incremento (mm por hora) de *Monilinia fructicola* en durazno 'Atlax'. (B) Tasa de incremento en los dos años de evaluación. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 32). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p <0.05).

En la literatura se reporta que el fosfito de potasio se probó en frutales como manzana, como parte de un manejo integrado de *Erwinia amylovora*, se observó que induce la expresión de genes PR-1, PR-2 y PR-8 en hojas de manzana, lo cual demostró que su aplicación en condiciones de campo suprime el tizón de fuego mediante la activación de la SAR (Aćimović *et al.*, 2015).

La aplicación únicamente de fosfito de potasio disminuyó el ABCPE y tasa de incremento. Estos resultados sugieren que el fosfito de potasio se podría utilizar solo o en combinación con fungicidas dentro de un programa de manejo de *Monilinia fructicola*. Sin embargo, la plena integración de los inductores de resistencia en prácticas agrícolas requiere de más investigación para la optimización de sus aplicaciones en campo (Oliveira *et al.*, 2016).

Efecto en el contenido de fenoles

De acuerdo con el análisis de varianza no hubo diferencias significativas en la interacción inductores con dosis de fungicida (Cuadro 2). Sin embargo, el factor inductor si presentó diferencias significativas ($p < 0.001$) para el contenido total de compuestos fenólicos en los dos años de evaluación. Los valores más bajos del contenido de fenoles totales se observaron sin la aplicación de inductores.

Los inductores silicato de potasio y fosfito de potasio fueron los tratamientos que presentaron los contenidos más altos de fenoles. El contenido de fenoles totales se incrementó un 158 y 117% el contenido de fenoles con la aplicación del silicato y fosfito, respectivamente, con respecto al tratamiento sin inductor en el año 2018 (Figura 4). El análisis de varianza indica una interacción significativa ($p < 0.001$) para los factores inductor y año. Se observó un incremento en el año 2018 del contenido de fenoles con respecto al año 2017.

Estos resultados concuerdan con Felipini *et al.* (2016), quienes al hacer aplicaciones de fosfito de potasio ($2 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) en plántulas de manzana redujeron significativamente la severidad de la roña hasta en un 62% y promovieron la acumulación

de compuestos fenólicos como ácido salicílico, ácido protocatechuico y epicatequina en hojas. Asimismo, Tesfay et al. (2011), encontraron que aplicaciones postcosecha de silicato de potasio en aguacate, incrementó la concentración total de fenoles e incremento en la actividad de las enzimas polifenoloxidasas y catalasa.

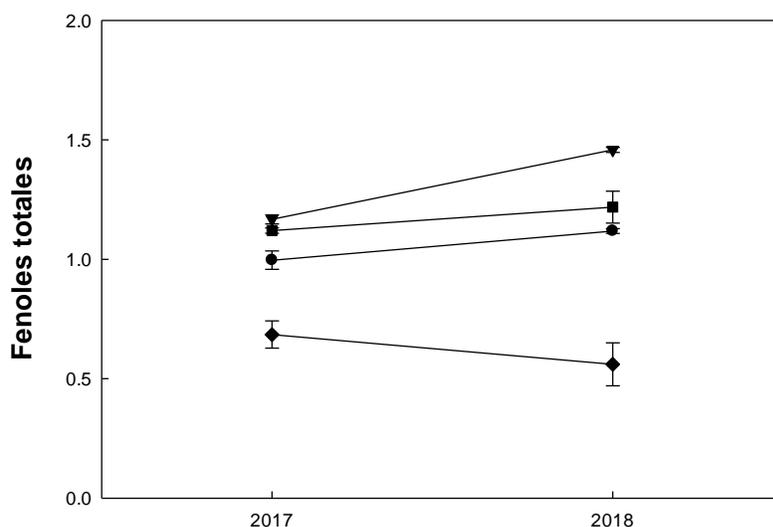


Figura 4. Efecto de la interacción de los inductores de resistencia acibenzolar-S-Metil (●), silicato de potasio (▼), fosfito de potasio (■), sin inductor (◆) y los años de evaluación en el contenido de fenoles totales (mg g⁻¹ p.f.) en frutos de durazno en postcosecha. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 16).

La acumulación de compuestos fenólicos está asociada con la resistencia a enfermedades en diferentes patosistemas y los altos niveles de compuestos fenólicos en un sitio de infección pueden restringir o disminuir el crecimiento de patógenos, tal y como se observó en esta investigación. Los compuestos fenólicos representan una de las clases más importantes de metabolitos secundarios, se encuentran presentes en flores,

hojas y frutos; juegan el papel principal en los mecanismos defensivos contra los patógenos (Tocci *et al.*, 2018).

Efecto en la actividad de la peroxidasa, polifenoloxidasas, catalasa y fenilalanina amonio liasa

La actividad de la polifenoloxidasas (PPO) se acrecentó en un 167% con la aplicación de silicato de potasio en el primer año de evaluación (Figura 5A). En el segundo año de evaluación la combinación fosfito de potasio con dosis reducida presentó la mayor actividad de la PPO (Figura 5B). Cabe resaltar que las interacciones de los inductores con los fungicidas incrementaron la actividad de esta enzima en comparación con los tratamientos en los que sólo se aplicó el fungicida.

La combinación de los inductores con los fungicidas presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.001$) en la actividad de la peroxidasa (POD). El fosfito de potasio incrementó la POD en un 144% en el primer año de evaluación, con respecto a la interacción sin inductor y sin fungicida (Figura 5C). En el segundo año de evaluación, el inductor fosfito presentó la mayor actividad de la POD, y todos los tratamientos que contenían inductores fueron superiores al testigo, con la excepción del silicato de potasio con dosis reducida (Figura 5D).

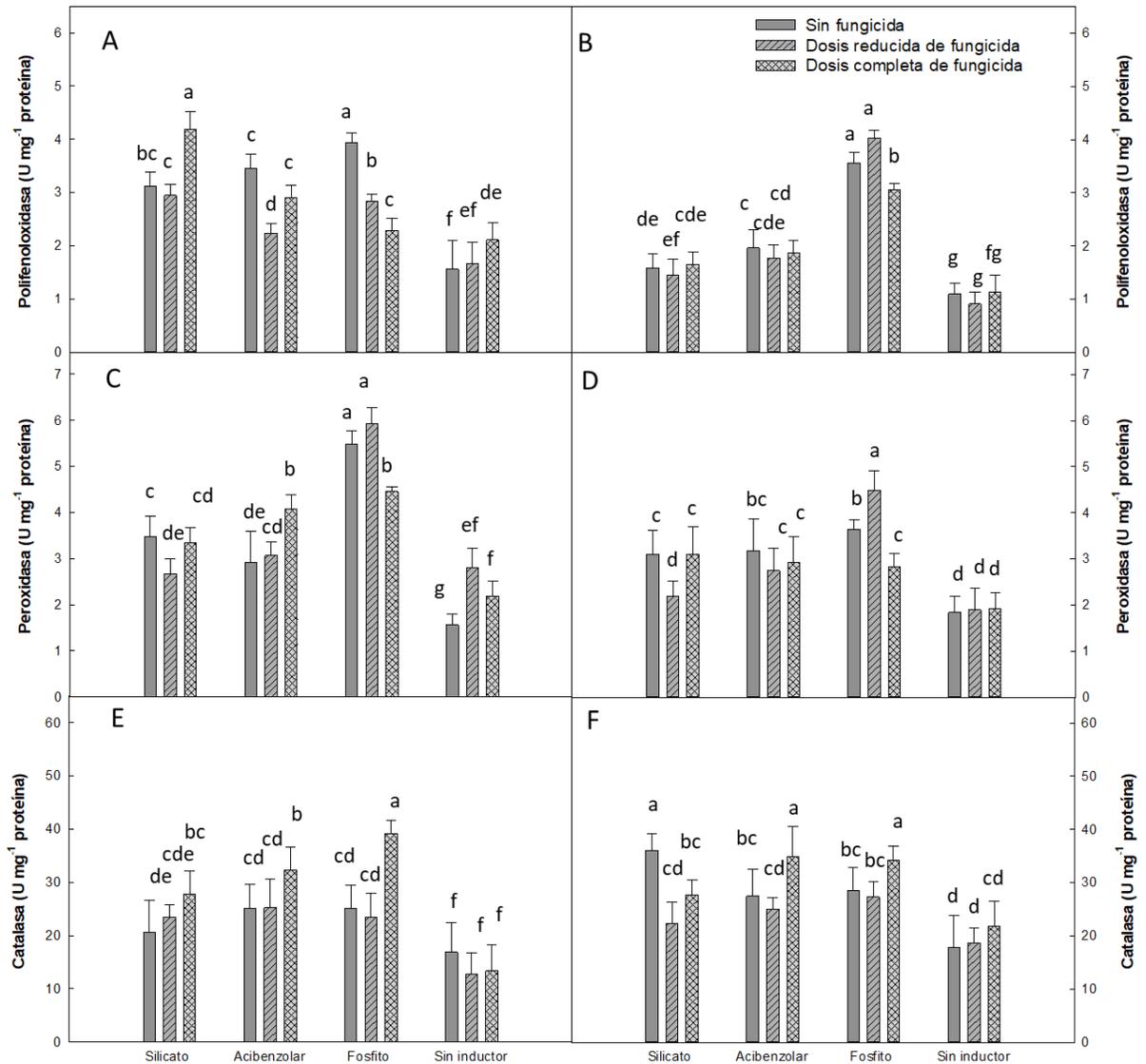


Figura 5. Efecto de la interacción de inductores de resistencia con el porcentaje de fungicida en la actividad de las enzimas polifenoloxidasa, peroxidasa y catalasa en los años 2017 (A, C y E) y 2018 (B, D y F) en frutos de durazno. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 16). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0.05).

De acuerdo al análisis de varianza la interacción de los factores inductor y año fue significativa. Se observó una disminución de la actividad de la enzima polifenoloxidasas en el año 2018 con respecto al 2017 con todos los inductores. Dicho decremento en la actividad es más notorio con los inductores silicato de potasio y acibenzolar en el año 2018. Para el caso de la enzima peroxidasa también se observó una disminución de la actividad con la interacción fosfito de potasio y el año 2018. Cabe señalar que la actividad de las enzimas PPO y POD fue menor cuando no se aplicó inductor para los dos años de evaluación.

La polifenoloxidasas y la peroxidasa son enzimas involucradas en la oxidación de fenoles. La PPO cataliza la oxidación de polifenoles en quinonas (compuestos antimicrobianos) y participa en la lignificación de las células vegetales durante el ataque de patógenos (Oliveira *et al.*, 2011). La POD está fuertemente asociada con el fortalecimiento de las paredes celulares de las plantas al catalizar la biosíntesis de lignina (Van Loon *et al.*, 2006), además participa en el sistema de defensa al neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteger a las células del estrés oxidativo.

La POD y PPO se encuentran relacionadas con la disminución de diferentes enfermedades, tal es el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* en mango, en donde después de hacer aplicaciones de ASM se incrementó la actividad de estas enzimas, y por consiguiente se redujo la severidad de esta enfermedad (Lin *et al.*, 2011), tal y como ocurrió con la severidad de *Monilinia fructicola* en durazno evaluada en postcosecha en el presente estudio.

La interacción de inductor y fungicida presentó diferencias estadísticas significativas en la actividad de la CAT en los dos años de evaluación. Se observó que en el primer año de evaluación la combinación fosfito de potasio con dosis completa de fungicida incrementó un 132 % la actividad de la CAT (Figura 5E). En el segundo año de evaluación la combinación de fosfito de potasio con dosis completa de fungicidas, acibenzolar con dosis completa y silicato de potasio sin fungicida fueron los tratamientos con mayor actividad de CAT (Figura 5F).

La CAT participa durante la resistencia local y sistémica adquirida regulando la actividad de las especies reactivas de oxígeno, especialmente H_2O_2 , con el fin de modular su participación como mensajero secundario o para eliminar las moléculas cuando se encuentran en concentraciones altas, las cuales pueden causar estrés oxidativo (Asghari y Soleimaniaghdam, 2010).

En esta investigación, la actividad de la enzima PAL no presentó diferencias estadísticas significativas con los inductores, fungicidas o su interacción (Cuadro 2), en desacuerdo con lo encontrado por Li et al. (2016), quienes después de inducir resistencia con óxido nítrico en durazno, observaron un incremento en la expresión del gen PAL. Esto puede deberse a que la síntesis del ácido salicílico (SA), molécula clave en la inducción de la SAR, no sólo se realiza a través de la vía de la PAL, sino también existen otras dos rutas involucradas en su síntesis, la ruta del isocorismato y otra que involucra glucósidos cianogénicos, como la prunasina y el mandelonitrilo (Diaz-Vivanco *et al.*, 2017).

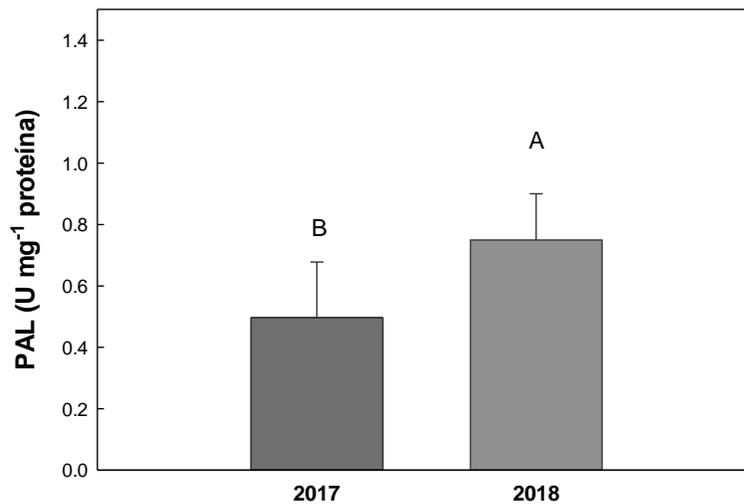


Figura 6. Contenido de fenilalanina amonio liasa (PAL) en frutos de durazno durante los dos años de evaluación. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 32). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los años ($p < 0.05$).

Las aplicaciones con silicato de potasio incrementaron la actividad enzimática, estos resultados confirman que el silicio puede activar mecanismo de defensa, tal y como lo señalan Schurt *et al.* (2014), quienes al hacer aplicaciones de silicio observaron que se incrementó significativamente la actividad de las enzimas relacionadas con la defensa.

Los resultados obtenidos en el incremento de PPO, POD y CAT concuerdan con investigaciones que demuestran que la inducción de la resistencia de la planta a patógenos puede ser atribuido a la activación coordinada de enzimas relacionadas a la defensa (Cao *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2016; Jiao *et al.*, 2018).

En todas las enzimas evaluadas se observó que no solo se aumenta su actividad con la aplicación de los inductores sino también cuando se combina con los fungicidas.

Esto se debe a que las aplicaciones de algunos fungicidas también incrementan la actividad de estas enzimas, tal y como lo señalan Serrano-Cervantes *et al.* (2016), quienes concluyeron que la aplicación de fungicidas en ausencia de patógenos incrementa la actividad de enzimas como POD, CAT, SOD y fenoles, lo cual, ayuda a explicar los resultados obtenidos.

Estatus nutrimental del durazno

En este estudio, se evaluó la influencia de los factores inductores de resistencia, año y su interacción en la concentración nutrimental en árboles de durazno. Algunos elementos minerales presentaron diferencias estadísticas significativas en los factores estudiados inductor, año y su interacción (Cuadro 3).

De acuerdo al análisis de varianza se observaron diferencias estadísticas significativas en el factor año del nitrógeno y potasio ($p < 0.001$), sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas en el factor inductor y la interacción inductor y año.

Cuadro 3. Análisis de varianza de los elementos minerales foliares en respuesta a los factores de inductores de resistencia y años de evaluación.

Fuente de variación	gl	Elementos			
		N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)
Inductor	3	ns	ns	ns	**
Año	1	**	**	**	ns
Inductor x año	3	ns	**	ns	ns
CV		12.08	7.4	13.3	8.7
		Mg (mg·kg ⁻¹)	Cu (mg·kg ⁻¹)	S (mg·kg ⁻¹)	Si (mg·kg ⁻¹)
Inductor	3	*	ns	ns	ns
Año	1	**	ns	**	ns
Inductor x año	3	**	ns	**	ns
CV		7.2	29.8	32.1	22.7

*, ** diferencias significativas con $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente; ns = no significativo con $P = 0.05$; gl = grados de libertad. CV = coeficiente de variación.

La mayor concentración de nitrógeno se presentó en el año 2017 y hubo un decremento en el año 2018 (Figura 7A). Ninguno de los árboles en este experimento exhibió una deficiencia de N ($\% N < 2.5$, Childers *et al.*, 1995). La variación en los resultados de un año con respecto al otro, se puede deber a un efecto de dilución de N en el tejido foliar, debido a que, en el año 2018, la producción se disminuyó en un 60 % (datos no mostrados) y por lo tanto el crecimiento vegetativo fue mayor.

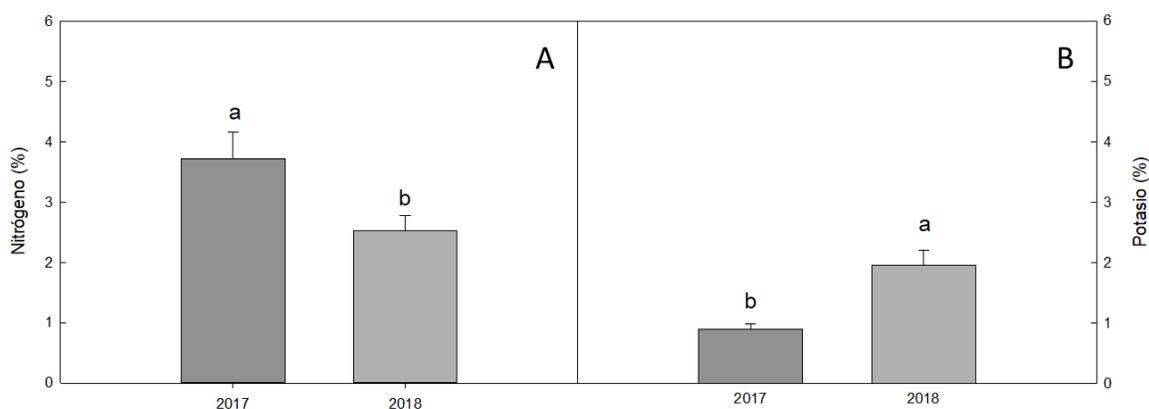


Figura 7. Concentración foliar de nitrógeno (A) y potasio (B) de árboles de duraznos tratados con inductores de resistencia durante dos años de evaluación. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media ($n = 16$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los años ($p < 0.05$).

Por el contrario, el potasio presentó las concentraciones foliares más altas en el año 2018 en comparación con el año 2017 (Figura 7B). Estos resultados se pueden deber a que los niveles de potasio están altamente influenciados por la cosecha y en este caso la cosecha fue mayor en el ciclo 2017. Cabe señalar que los niveles de potasio en el 2017 fueron de 1 %, los cuales están por debajo de lo recomendado (1.25-3 %) de acuerdo con Childers *et al.* (1995). Sin embargo, la concentración para el 2018 fue de 1.96 %, valor que se encuentran dentro del rango adecuado.

El calcio presentó diferencias estadísticas significativas en el factor inductor, sin embargo, en el factor año y su interacción con el inductor no presentó diferencias estadísticas significativas (Cuadro 3). El acibenzolar fue el inductor con la mayor concentración de calcio en comparación con el testigo, 1.35 y 1.16 % respectivamente (Figura 8). Estos resultados sugieren que el acibenzolar incrementó los contenidos de calcio en un 16 % con respecto al testigo. De acuerdo con Johnson (1993) el contenido de calcio óptimo es de 1.3 – 2.68 %; el acibenzolar fue el único tratamiento dentro del nivel óptimo.

Además de su papel estructural del calcio, la función principal del calcio radica en su capacidad para servir como mensajero secundario en una gran variedad de procesos, dentro de los cuales se encuentra la respuesta al estrés biótico y abiótico (Blume *et al.*, 2000; Lecourieux *et al.*, 2005). El calcio está involucrado en la señalización de la inmunidad activada por PAMP (PTI) e inmunidad activada por efectores (ETI). Estos procesos desencadenan una cascada de eventos que involucran la entrada de Ca^{2+} en el citosol, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la señalización de MAPK y la expresión de genes de defensa (Dodds y Rathjen, 2010; Grant *et al.*, 2000; Thor, 2019).

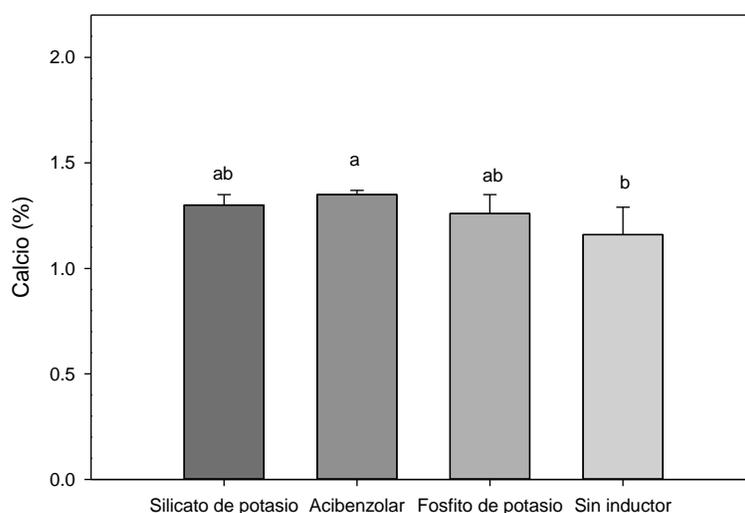


Figura 8. Concentración foliar de calcio de árboles de duraznos tratados con inductores de resistencia durante dos años de evaluación. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 8). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los años ($p < 0.05$).

El fósforo, magnesio y azufre presentaron diferencias estadísticas significativas en la interacción inductor y año (Cuadro 3). El mayor contenido de fósforo (0.24 %) se presentó en la interacción sin inductor y año 2018 (Figura 9A), sin embargo, las concentraciones en todas las combinaciones se encontraron dentro del rango óptimo de la concentración foliar de fósforo (0.12-0.3 %) (Lippert y Campbell, 2000). La disminución del fósforo con el uso de los inductores puede estar relacionada con el desgaste energético de la planta. Algunos autores señalan que el principal inconveniente del uso comercial de los inductores son los costos asociados a la activación de los mecanismos de defensa. La teoría principal sugiere que la energía y recursos que se desvían a la síntesis de compuestos defensivos, no se pueden usar en el metabolismo primario, provocando la reducción del crecimiento (Heil y Baldwin, 2002). Cabe señalar, que las

interacciones de los inductores y el ciclo 2017, presentaron valores más bajos con respecto a las interacciones en el ciclo 2018. La interacción fosfito de potasio y ciclo 2017 presentó los valores más altos en ese año.

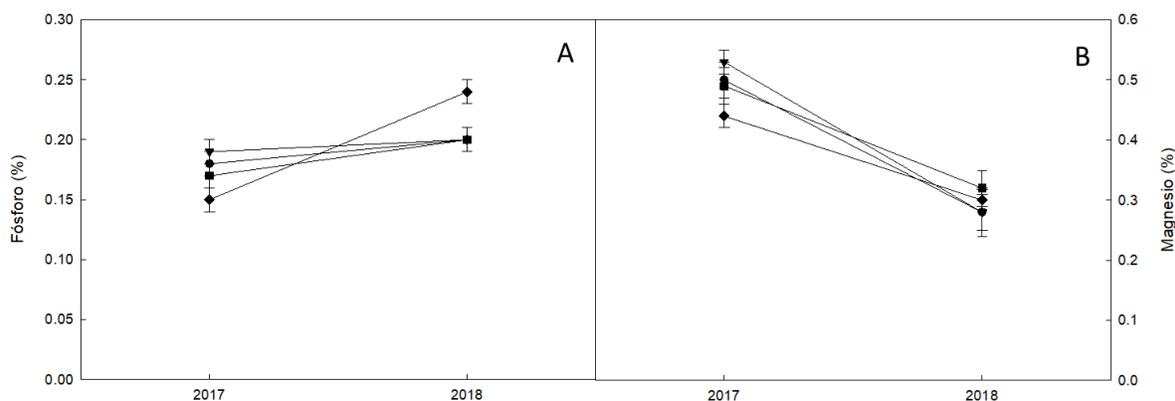


Figura 9. Efecto de la interacción de los inductores de resistencia acibenzolar-S-Metil (●), silicato de potasio (▼), fosfito de potasio (■), sin inductor (◆) y los años de evaluación en la concentración foliar de fósforo (A) y magnesio (B) en árboles de durazno. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 8).

La interacción silicato de potasio y año 2017 presentó las mayores concentraciones foliares de magnesio (Figura 9B) y azufre (Figura 10), 0.53 % y 1791.99 mg·kg⁻¹, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Mehrabanjoubani *et al.* (2015) quienes observaron que al aplicar Si, se incrementó el contenido de Mg²⁺ en canola. En naranja se observó que el silicato de potasio y el ácido salicílico mejoró la productividad, la calidad de la fruta y el estado nutricional (El-Giousy, 2016). Es importante señalar, que tanto el magnesio como el azufre disminuyeron su concentración en el ciclo 2018.

Muchos investigadores encontraron que el silicio participa en la actividad de algunas enzimas, capacidad antioxidante, relaciones hídricas de la planta, fotosíntesis, absorción de nutrientes, movilidad de iones dentro de los tejidos vegetales, equilibrio hormonal y expresión génica (Zhu y Gong, 2014; Savvas y Ntatsi, 2015).

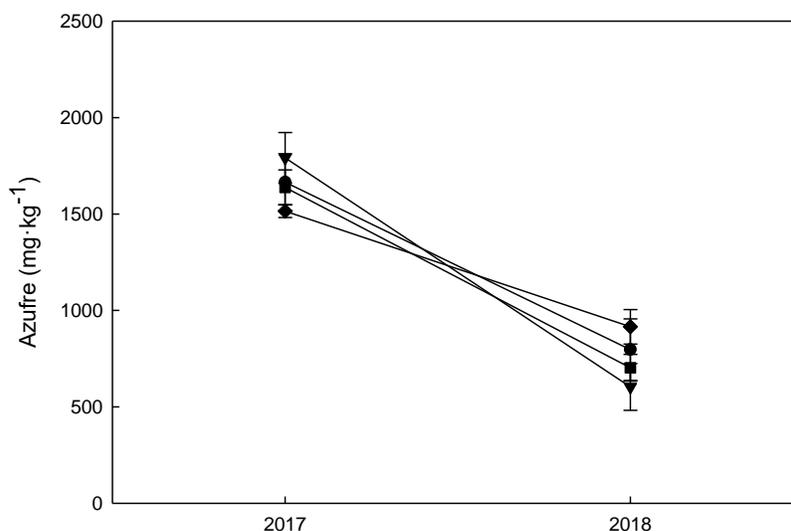


Figura 10. Efecto de la interacción de los inductores de resistencia acibenzolar-S-Metil (●), silicato de potasio (▼), fosfito de potasio (■), sin inductor (◆) y los años de evaluación en la concentración foliar de azufre en árboles de durazno. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media (n = 8).

El silicio no presentó diferencias significativas en ninguno de los factores de estudio (Cuadro 3). Por lo tanto, la aplicación de silicato de potasio no incrementó la concentración de silicio en los árboles tratados con este inductor. El silicio es un elemento no esencial para la nutrición de las plantas en el sentido de los criterios clásicos postulados por Arnon y Stout (Epstein, 1994); sin embargo, se conocen los beneficios de la aplicación de silicio en el crecimiento de los cultivos y los usos potenciales del Si como fertilizante (especialmente en monocotiledóneas), bioestimulante (especialmente en

dicotiledóneas) o protector de plantas (tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas) (Ma y Yamaji, 2008; Epstein, 2009; Guntzer *et al.*, 2012; Zhu y Gong, 2014). Por lo tanto, el efecto del silicio en esta investigación está más relacionado a su uso como bioestimulante en durazno.

Debido a que la inducción de la resistencia es una respuesta compleja de la planta, es probable que su expresión en condiciones de campo se vea influenciada por múltiples factores, incluidos el ambiente, genotipo, nutrición del cultivo y el grado en que las plantas ya están inducidas (Walters *et al.*, 2013).

1.5. CONCLUSIONES

La combinación de los inductores con los fungicidas proporciona un buen control de *Monilinia fructicola*, ya que hubo una reducción de los parámetros epidemiológicos que describieron el desarrollo de *Monilinia* en el fruto de durazno, en comparación de usar los inductores y fungicidas por separado. Se observó un porcentaje de eficiencia en la reducción del ABCPE de 47% con la interacción fosfito de potasio y dosis completa de fungicidas con respecto al testigo.

La aplicación de los inductores incrementó el contenido de fenoles totales en fruto de durazno, así como la actividad de las enzimas peroxidasa, polifenoloxidasa y catalasa relacionadas con la patogénesis de *Monilinia*; este incremento se mantuvo hasta los ocho días después de la última aplicación de los inductores.

El uso de los inductores incrementó el contenido de Ca. El fósforo, magnesio y azufre presentaron cambios en la concentración con la interacción de los factores inductores y año. Por lo que sería conveniente realizar evaluaciones del estatus

nutrimental durante más ciclos para realizar ajustes en la fertilización cuando así se requiera, debido a que la inducción de resistencia implica un desgaste energético y por lo tanto mayor demanda de nutrimental.

1.6. LITERATURA CITADA

- Aćimović, S. G., Zeng, Q., McGhee, G. C., Sundin, G. W., y Wise, J. C. 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 16.
- Alcántar G., G., y M. Sandoval V. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo. México. Chapingo, México. 156 p
- Alexandersson, E., Mulugeta, T., Lankinen, Å., Liljeroth, E., y Andreasson, E. 2016. Plant resistance inducers against pathogens in Solanaceae species—from molecular mechanisms to field application. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1673.
- Arz, C. M., and J. H. Grambow. 1995. Elicitor and suppressor effects on phospholipase C in isolated plasma membranes correlate with alterations in phenylalanine ammonialyase activity of wheat leaves. *Journal of Plant Physiology*. 146: 64-70.
- Blackwell R. D., Murray J. S., Lea P. J. 1990. Enzymes of photorespiratory carbon pathway. In: *Methods in Plant Biochemistry*. P. J. Lea (ed.). Academic Press, London, England. pp:129-144.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., and Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12, 1425–1440. doi: 10.1105/tpc.12.8.1425
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Campbell, C. L., L. V. Madden. 1991. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley and Sons Inc. New York. 532p.
- Cao, J., Yan, J., Zhao, Y., y Jiang, W. 2013. Effects of postharvest salicylic acid dipping on *Alternaria* rot and disease resistance of jujube fruit during storage. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 93(13), 3252–3258.
- Childers, N. F., R. J. Morris and S. G. Sibbett. 1995. *Modern Fruit Science*. Soil management for peach, apple, plum and pear. pp. 71 - 89; 216 - 218; 247 – 252; 283 - 286. Tenth Edition. Horticultural Publications, Gainesville, Florida U. S. A.

CONAGUA (Comisión Nacional del Agua) http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=178:puebla&catid=14&Itemid=2 Consultada en febrero de 2018.

- Diaz-Vivancos, P., Bernal-Vicente, A., Cantabella, D., Petri, C., Hernández, J. A. 2017. Metabolomics and biochemical approaches link salicylic acid biosynthesis to cyanogenesis in peach plants. *Plant and Cell Physiology*, v. 58, n. 12, p. 2057-2066.
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548. doi:10.1038/nrg2812
- Egüen, B., Melgarejo, P., y De Cal, A. 2015. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodione, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. *European Journal of Plant Pathology*, 141(4), 789-801.
- El-Gioushy, S. F. (2016). Productivity, fruit quality and nutritional status of Washington navel orange trees as influenced by foliar application with salicylic acid and potassium silicate combinations. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 8(2), 98-107.
- Epstein, E., 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 91, 11–17.
- Epstein, E., 2009. Silicon: its manifold roles in plants. *Ann. Appl. Biol.* 155, 155–160.
- Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G. S. y O'Brien, P. A. 2011. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 60(6), 1086-1095.
- Faize, L. y Faize, M. 2018. Functional Analogues of Salicylic acid and their use in Crop Protection. *Agronomy*, 8(1), 5.
- Felipini, R. B., Boneti, J. I., Katsurayama, Y., Neto, A. C. R., Veleirinho, B., Maraschin, M., y Di Piero, R. M. 2016. Apple scab control and activation of plant defence responses using potassium phosphite and chitosan. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 929-939.
- Flurkey W. H. and J. J. Jen 1978 Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Sciences* 43:1828-1831.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., and Mansfield, J. (2000). The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 23, 441–450. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00804.x

- Guntzer, F., Keller, C., Meunier, J.-D., 2012. Benefits of plant silicon for crops: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 201–213.
- Heil M, Baldwin IT. 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* 7, 61–67.
- Hu, M. J., Cox, K. D., Schnabel, G., and Luo, C. X. 2011. *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *PLoS One*, 6(9), e24990.
- Jiao, W.; Li, X.; Wang, X.; Cao, J.; Jiang, W. 2018. Chlorogenic acid induces resistance against *Penicillium expansum* in peach fruit by activating the salicylic acid signaling pathway. *Food chemistry*, v. 260, p. 274-282.
- Lamikanra, O. 1995. Enzymatic browning of Muscadine grapes products, pp. 166-177. In: Lee, C.L., and Whitaker J.R. (eds.). *Enzymatic Browning and its Preventions*. Ed.ACS. Washington, D.C., USA.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., et al. (2005). Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* 38, 527–538. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.036
- Li, G.; Zhu, S.; Wu, W.; Zhang, C.; Peng, Y.; Wang, Q.; Shi, J. 2017. Exogenous nitric oxide induces disease resistance against *Monilinia fructicola* through activating the phenylpropanoid pathway in peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 97, n. 9, p. 3030-3038.
- Lin, J., Gong, D., Zhu, S., Zhang, L., y Zhang, L. 2011. Expression of PPO and POD genes and contents of polyphenolic compounds in harvested mango fruits in relation to Benzothiadiazole-induced defense against anthracnose. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 85-89.
- Lippert, R. M., C. R. Campbell. 2000. Reference Sufficiency Ranges for Plant Analysis in The Southern Region of The United States, Southern Cooperative Series Bulletin #394, North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services Agronomic Division, URL: www.ncagr.gov/agronomi/saaesd/scsb394.pdf
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y., y Luo, Y. 2005. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, 35(3), 263-269.
- Ma, J.F., Yamaji, N., 2008. Functions and transport of silicon in plants. *Cell. Mol. LifeSci.* 65, 3049–3057.
- Madden, L. V., G. Hughes, F. van den Bosch. 2007. *The Study of Plant Disease Epidemics*. The American Phytopathological Society (APS). Press, St. Paul, MN. 432p.

- Martinez-Tellez M. A. and M. T. Lafuente 1997. Effect of high temperature conditioning of ethylene, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase activities in flavedoof chilled fortune mandarin fruit. *Journal of Plant Physiology* 150:674-678.
- Martini, C., y Mari, M. 2014. *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (Monilinia rot, brown rot). In *Postharvest Decay* (pp. 233-265). Academic Press. Elsevier, Eastbourne, UK.
- Mehrabanjoubani, P., Abdolzadeh, A., Sadeghipour, H. R., & Aghdasi, M. (2015). Silicon affects transcellular and apoplastic uptake of some nutrients in plants. *Pedosphere*, 25(2), 192-201.
- Oliveira L, L., Pacheco, I., Mercier, V., Faoro, F., Bassi, D., Bornard, I., y Quilot-Turion, B. 2016. Brown rot strikes Prunus fruit: an ancient fight almost always lost. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(20), 4029-4047.
- Pavanello, E. P., Brackmann, A., Costa, I. F. D. D., Both, V. y Ludwig, V. 2016. Use of sodium metasilicate for management of peach brown rot. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46(3), 245-253.
- Percival, G. C., y Noviss, K. 2010. Evaluation of potassium phosphite and myclobutanil combinations for pear scab (*Venturia pirina*) suppression. *Journal of Arboriculture*, 36(2), 86.
- Pinto, K. M. S., do Nascimento, L. C., de Souza Gomes, E. C., da Silva, H. F., y dos Reis Miranda, J. 2012. Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspects. *European journal of Plant Pathology*, 134(4), 745-754.
- Romanazzi, G., Sanzani, S. M., Bi, Y., Tian, S., Martínez, P. G. y Alkan, N. 2016. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 82-94.
- Savvas, D., Ntatsi, G. (2015). Biostimulant activity of silicon in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 66-81.
- Schurt, D. A., Cruz, M. F., Nascimento, K. J., Filippi, M. C., and Rodrigues, F. A. 2014. Silicon potentiates the activities of defense enzymes in the leaf sheaths of rice plants infected by *Rhizoctonia solani*. *Tropical Plant Pathology*, 39(6), 457-463.
- Serrano-Cervantes, R., Lozoya-Saldaña, H., Colinas y León, M. T. B., y Leyva-Mir, S. G. 2016. Algunas alteraciones enzimáticas en papa causadas por fungicidas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(1), 25-31.
- Thakur, M., and Sohal, B. S. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochem.* 2013:1-10.
- Thor, K. (2019). Calcium—nutrient and messenger. *Frontiers in plant science*, 10, 440.

- Tocci, N., Weil, T., Perenzoni, D., Narduzzi, L., Madriñán, S., Crockett, S. 2018. Phenolic profile, chemical relationship and antifungal activity of Andean *Hypericum* species. *Industrial Crops and Products*, v. 112, p. 32–37.
- Walters, D. R., Ratsep, J. y Havis, N. D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263-1280.
- Yang, L., Zhao, P., Wang, L., Filippus, I., y Meng, X. 2010. Synergistic effect of oligochitosan and silicon on inhibition of *Monilinia fructicola* infections. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(4), 630-634.
- Zhu, Y., Gong, H., 2014. Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 455–472.
- Zhu, Y., Gong, H., 2014. Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 455–472.
- Zhu, Y., Yu, J., Brecht, J. K., Jiang, T., and Zheng, X. 2015. Pre-harvest application of oxalic acid increases quality and resistance to *Penicillium expansum* in kiwifruit during postharvest storage. *Food Chemistry*, 190, 537–543.
- Waterman P G, S Mole (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. 1st ed. Osney Mead, Oxford, England. 238 p.

CAPÍTULO II. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DURANTE EL DESARROLLO DE NECTARINA Y SU EFECTO EN *Monilinia fructicola*

2.1. RESUMEN

Los frutos del género *Prunus* son susceptibles a *Monilinia* spp. en cualquier etapa fenológica; sin embargo, en la etapa de endurecimiento del endocarpio esa susceptibilidad suele ser menor. El objetivo de esta investigación fue estudiar la respiración, producción de etileno, actividad antioxidante enzimática y no enzimática en las diferentes etapas de desarrollo del fruto de nectarina y su efecto en la incidencia de *Monilinia fructicola*. Se realizaron muestreos en las diferentes etapas fenológicas del fruto de nectarina, para evaluar cambios en la producción de etileno, respiración, capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, ácido ascórbico, estrés oxidativo, así como la actividad enzimática de ascorbato peroxidasa, peroxidasa, polifenoloxidasas, catalasa, superóxido dismutasa, mediante las técnicas de espectrofotometría y HPLC. Con el fin de cuantificar la incidencia de *Monilinia fructicola* se realizaron inoculaciones en las diferentes etapas fenológicas. De acuerdo con los resultados, se presentaron cambios en la actividad antioxidante y al emplear un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), se observó una fuerte relación negativa entre el ácido ascórbico, criptoxantina, zeaxantina e incidencia de *Monilinia fructicola*. Asimismo, en la etapa de maduración (S4), la actividad enzimática de ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa (POD) se ve reducida y se observa incremento en la incidencia de la pudrición café.

Palabras clave: ácido ascórbico, pudrición café, sistema de defensa, tolerancia.

2.2. INTRODUCCIÓN

Monilinia spp. causa la pudrición café en *Prunus*, *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia*, y otros géneros (Willetts y Bullock, 2019). Los frutos del género *Prunus* son infectados por *Monilinia* spp. en cualquier etapa fenológica; sin embargo, son menos susceptible en la fase de endurecimiento del endocarpio debido a que múltiples factores químicos y físicos asociados a los mecanismos de resistencia, determinan el éxito o fracaso de la infección (Villarino *et al.*, 2011). La defensa química consiste en muchos compuestos naturales que podrían inducir sistemas (compuestos preformados) para prevenir ataques patogénicos (Obi *et al.*, 2018).

El desarrollo y maduración de los frutos climatéricos son procesos oxidativos que producen especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Pandey *et al.*, 2013). Para prevenir la acumulación de ROS hasta el nivel tóxico, las plantas desarrollan enzimas y químicos antioxidantes no enzimáticos como una fuerza defensiva contra el exceso de ROS (Sgherri *et al.*, 2003).

Curiosamente, aunque se pensaba que ROS actuaba como un componente tóxico en los huéspedes contra los patógenos de las plantas, no se produce en cantidades suficientes para superar estos patógenos (Marroquin-Guzman *et al.*, 2017; Samalova *et al.*, 2014) y, en cambio, está emergiendo como componente de señalización de la respuesta de defensa de la planta.

Es importante señalar que para que actúen las ROS en la célula como factores dañinos, protectores o de señalización, éstas dependen del equilibrio entre los sistemas de generación y desintoxicación en el sitio (Camejo *et al.*, 2016). Para evitar la

acumulación de ROS al nivel tóxico, las plantas tienen un sistema antioxidante que se clasifica en enzimático y no enzimático. En el primer grupo encontramos enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, las cuales, eliminan ROS, como O_2 y H_2O_2 . En el segundo grupo se encuentran el ácido ascórbico, compuestos fenólicos, carotenoides, entre otros (Asada, 1999).

Entre los antioxidantes, la vitamina C (ácido L-ascórbico) es un compuesto antioxidante multifuncional significativo y un sustrato importante para la desintoxicación de ROS involucradas en la tolerancia al estrés (Akram *et al.*, 2017). Además, algunos informes indican el papel positivo del ácido ascórbico (AsA) y otros antioxidantes en la regulación de la protección de las plantas contra las enfermedades (Gallie, 2013); en durazno se encontró una correlación negativa entre la severidad de *Monilinia fructicola* y ácido ascórbico en diferentes variedades de durazno (Obi *et al.*, 2020).

Las nuevas estrategias de manejo de *Monilinia* spp., incluyen la comprensión de los factores de virulencia del patógeno y los mecanismos de resistencia de la fruta. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue estudiar la respiración, producción de etileno, actividad antioxidante enzimática y no enzimática en las diferentes etapas de desarrollo del fruto de nectarina y su efecto en la incidencia de *Monilinia fructicola*.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y colecta de frutos

Se colectaron muestras de frutos libres de lesiones físicas y pudrición café en diferentes estados fenológicos de nectarina 'Diamond Ray' (*Prunus persica* var. nectarina) de una huerta localizada en Lleida, España. Los muestreos se basaron en

días después de la plena floración (DDPF), considerando la plena floración como la etapa cuando al menos el 50% de las flores estaban abiertas. Después de cada cosecha, los frutos fueron transportados inmediatamente a las instalaciones de IRTA (Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (en catalán: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) en condiciones climatizadas (20 °C). Al llegar al laboratorio, las frutas se separaron en tres lotes diferentes dependiendo de si se usaron para: i) análisis fisiológico, ii) análisis bioquímico y iii) evaluación de la incidencia de la pudrición café.

Producción de etileno y etileno

Se realizaron muestreos en cuatro etapas fenológicas del desarrollo del fruto S1 (39 DDPF), S2 (66 DDPF), S3 (94 DDPF) y S4 (121 DDPF). Se utilizaron cuatro repeticiones y cada una de éstas se conformó de cinco frutos, los cuales se depositaron en recipientes sellados de 2 L, en una cámara climatizada a 20 °C. Luego de dos horas, muestras de gas (1 mL) se tomaron del espacio de cabeza y se inyectaron en un cromatógrafo de gases equipado con un detector FID (Agilent Technologies 6890, Wilmington, Alemania) y una columna de alúmina F1 80/100 (2 m x 1/8 x 2.1 mm, Teknokroma, Barcelona, España) como describieron anteriormente Giné-Bordonaba *et al.* (2014). Los resultados se expresaron en $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

La respiración fue determinada de los mismos recipientes usados para la evaluación de etileno. Después de 2 horas de incubación a 20 °C, la composición del gas del espacio de cabeza se cuantificó utilizando un analizador de gases portátil (CheckPoint O₂/CO₂, PBI Dansensor, Ringsted, Denmark). Los resultados fueron expresados como $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Incidencia de pudrición café

Se realizaron muestreos en cuatro etapas fenológicas del desarrollo del fruto S1 (39 DDPF), S2 (66 DDPF), S3 (94 DDPF) y S4 (121 DDPF), 50 frutos sin signos visibles de infección por *M. fructicola* fueron colectados y trasladados al laboratorio. La evaluación de la incidencia a la pudrición café se realizó con 4 réplicas de 10 frutos cada una, evaluando así 40 frutos por cada etapa fenológica y el resto de los frutos se utilizaron como control. Los duraznos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.5 % (v/v) durante 2 minutos. Una vez secos los frutos, se inocularon por inmersión durante 60 segundos en una solución con *Monilinia fructicola* a una concentración de 10^5 conidios mL^{-1} .

Los frutos que se utilizaron como control se sumergieron en agua estéril. Los frutos se colocaron en cajas de plástico, que contenían agua en el fondo con una malla para evitar el contacto directo con la muestra, se taparon y se mantuvieron en una cámara durante 10 días a 20 ° C.

Después de 5, 7 y 10 días de almacenamiento, se registró el porcentaje de la incidencia de *Monilinia fructicola* considerando el número de frutos con el primer síntoma visual de mancha café con respecto al total de frutos para cada etapa fenológica. Con los datos de incidencia, se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) con el método de integración trapezoidal (Campbell and Madden, 1991); que como parámetro integrativo del desarrollo de la enfermedad permite una mejor comprensión de su comportamiento en las diferentes etapas fenológicas del durazno.

Análisis bioquímico

El análisis bioquímico se realizó con 4 repeticiones de 5 frutos cada una, 20 frutos por cada estado fenológico (39, 66, 94 y 121 DDPF). Para las mediciones bioquímicas, se tomó muestra de los frutos y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido a -80 °C hasta su análisis.

Sistema antioxidante no enzimático

Capacidad antioxidante total (TAC) y contenido fenólico total (TPC). La capacidad antioxidante y la concentración de fenoles totales de las muestras se cuantificaron a partir de material fresco congelado, mezclando 1.5 g de muestra con 5 mL de metanol al 79.5 % (v/v) y 0.5 % (v/v) de HCl en agua grado HPLC. La extracción de la muestra se mantuvo en un cuarto oscuro a 25 °C con agitación constante durante 2 h y mezclando las muestras cada 15 min. Luego, las muestras se centrifugaron a 24,000 × g durante 5 minutos a 20 ° C. Los sobrenadantes de cada muestra fueron recuperados y utilizados para la determinación espectrofotométrica (Giné-Bordonaba y Terry, 2016).

Finalmente, las muestras se filtraron a través de una unidad de filtro accionada por jeringa de 0.2 µm (Millipore Corporation, MA) y se analizó el extracto transparente. A partir del mismo extracto, se midieron los compuestos fenólicos totales (mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g⁻¹ FW) mediante el método Folin-Ciocalteu a 765 nm y la capacidad antioxidante total (mg Fe²⁺por g⁻¹ FW) medida por el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) se midió a 593 nm como se describe en trabajos recientes de Giné-Bordonaba y Terry (2016).

Determinación de ácido ascórbico. La extracción del ácido ascórbico total (AsA) se realizó disolviendo 300 mg de muestras en 4 mL de una solución acuosa que contenía ácido metafosfórico al 3 % y ácido acético al 8% (p/v). Las muestras se agitaron en vórtex durante 1 minuto y se centrifugaron adicionalmente a 43,000 x g durante 22 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes de cada muestra se filtraron a través de un filtro de 0.45 µm para cromatografía líquida (HPLC) (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.) como lo describen Collazo *et al.* (2018). Las concentraciones se calcularon utilizando curvas estándar generadas inyectando soluciones estándar de concentraciones conocidas de AsA y DHAsA. Los contenidos de AsA y DHAsA se expresaron en mg kg⁻¹ de peso seco.

Cuantificación de carotenoides y clorofilas. Se extrajeron los carotenoides de muestras liofilizadas de frutos de nectarina (150 mg) mediante la adición de 800 µl de buffer de extracción que contenía acetona–ethyl acetato (6:4, v/v), se mezcló en vórtex durante 60 s, posteriormente se adicionó la misma cantidad de agua grado HPLC y se mezcló por inversión tres veces. Los tubos se centrifugaron por 5 min a 21 000 g a 4 °C y se transfirió el supernadante a un tubo nuevo, este proceso se repitió dos veces. Se añadió cantaxantina (0.04 µg) como patrón interno. Los carotenoides se separaron en una columna C30 YMC (250 × 4,6 mm, 3 µm; Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.) Mediante el uso de HPLC Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies France) que estaba equipado con un detector de matriz de fotodiodos. Se generaron cromatogramas a 454 nm.

El disolvente A consistió en 100 % metanol. El disolvente B consistió en 100% de metil terc-butil éter, con el siguiente gradiente: 0 min, 95% A / 5% B; 12 min, 75% de A / 25% de B; 30 min, 35% de A / 65% de B; 35 min, 0% de A / 100% de B; 45 min, 95% de

A / 5% de B; a un flujo de 1 mL/min. Para la cuantificación, se obtuvieron curvas de calibración trazando cuatro concentraciones diferentes de patrones de carotenoides de acuerdo con las relaciones de área de pico usado.

Actividad de enzimas antioxidantes

Peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (PPO). Peroxidasa total (POD, EC 1.11.1.7) y polifenoloxidasas (PPO, EC 1.14.18.1) se extrajeron de 5 g de pulpa fresca congelada según lo descrito por Giné-Bordonaba *et al.* (2017) La actividad de POD se midió como la densidad óptica a 470 nm después de la reacción del extracto con 10 mmol L⁻¹ de guaiacol y 10 mmol L⁻¹ H₂O₂, de acuerdo con el método descrito por Lurie *et al.* (1997). La actividad PPO se determinó a 400 nm en una mezcla de reacción que contenía 0.1 mol de L⁻¹ de tampón fosfato de potasio (pH 6) y 65 mmol L⁻¹ de pirocatecol junto con el extracto enzimático correspondiente como se describe por Vilaplana *et al.* (2006).

Superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Para la extracción de superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) y catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), se homogeneizaron 5 g de pulpa fresca congelada en 15 mL de tampón de fosfato de potasio 0.1 mol L⁻¹ (pH 7.8), 2 mmol L⁻¹ ditioneitol (DTT), 50 g L⁻¹ de PVP, 0.1 mmol L⁻¹ de EDTA y 1.25 mmol L⁻¹ de polietilenglicol. El homogeneizado se filtró, centrifugó y purificó como se describe por Giné-Bordonaba *et al.* (2017). A su vez, la actividad SOD se determinó midiendo su capacidad para inhibir la reducción fotoquímica de nitrobluetetrazolium (NBT) a 560 nm siguiendo el método de Gianopolitis y Ries (1977).

L-ascorbato peroxidasa (APX). Para la extracción de L-ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11), se homogeneizaron 2.5 g de pulpa fresca congelada en 7.5 mL de

0.1 mol L⁻¹ tampón base fosfato (pH 7.5) que contenía 0.8 mmol L⁻¹ HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, se filtró a través de dos columnas de Miracloth y centrifugado a 10 000 x g durante 15 min a 4 °C. La actividad APX se determinó a 290 nm durante 10 minutos monitoreando la descomposición del ascorbato dependiente de H₂O₂ en una mezcla que contiene 20 µL del sobrenadante recuperado y 280 µL de una solución de reacción (0.22 mmol L⁻¹ de ácido ascórbico, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ H₂O₂) (Nakano y Asada, 1981).

El contenido de proteínas de todos los extractos se determinó por el método de Bradford (1976) a 595 nm utilizando un kit de análisis de proteínas (Bio-Rad, München, Alemania). El reactivo proteico se mezcló con el tampón fosfato correspondiente a cada enzima evaluada (pH 6, 7 o 7,8) utilizado para cada extracción enzimática. Se utilizó como estándar albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). La actividad de la enzima se expresó en unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína (U mg⁻¹). Para SOD, 1 U representa la cantidad de enzima requerida para inhibir la reducción de NBT en un 50% de la cantidad inicial. Para el resto de las enzimas analizadas, 1 U representa la cantidad de enzima responsable de un cambio en 1 unidad de absorbancia por minuto.

Evaluación del estrés oxidativo

Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y contenido de malondialdehído (MDA). El malondialdehído (MDA) se cuantificó como un índice de peroxidación lipídica utilizando el ensayo de sustratos reactivos de ácido tiobarbitúrico (TBARS) como describen Giné-Bordonaba *et al.* 2017. El tejido se homogeneizó en 4 mL de 1 g L⁻¹ de solución de ácido tricloroacético (TCA). El homogeneizado se centrifugó a

15000 g durante 20 minutos y se añadieron 0.5 mL del sobrenadante a 1.5 ml de 5 g L⁻¹ de ácido tiobarbitúrico (TBA; Fluka Analytical, Steinheim, Alemania) en 200 g L⁻¹ TCA. Se añadió una segunda alícuota (0.5 mL) del sobrenadante a una mezcla que contenía solo 200 g L⁻¹ TCA como control. La mezcla se incubó a 90 °C durante 20 minutos posteriormente se detuvo la reacción colocando los tubos de reacción en un baño de agua con hielo. Luego se centrifugaron las muestras a 23 300 g durante 10 minutos a 4 °C, y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm y se restó el valor para la absorción no específica a 600 nm. La cantidad de complejo MDA-TBA (pigmento rojo) se calculó utilizando el coeficiente de extinción 155 mmol L⁻¹ cm⁻¹ y los resultados se expresaron como nmol g⁻¹ h⁻¹.

Para determinar los niveles de H₂O₂, se homogeneizaron muestras de 5 g de tejido en 20 ml de 50 g L⁻¹ de ácido tricloroacético (TCA; Panreac, Barcelona, España), se filtraron a través de dos capas de Miracloth y se centrifugaron a 20,000 g durante 15 min. a 4 °C. El contenido de H₂O₂ se determinó utilizando el ensayo colorimétrico Bioxytech H₂O₂-560 de OXIS International Inc (Portland, OR EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de H₂O₂ se expresó como μmol kg⁻¹ de peso fresco (FW), cada valor representa la media de cuatro determinaciones.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El experimento se realizó en un diseño completamente al azar. Los datos se analizaron estadísticamente con el software JMP® versión 13.1.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los datos expresados. Cuando el análisis indicó diferencias significativas, se realizó la prueba HSD de Tukey

en el nivel $p < 0.05$ para la comparación de medias. También se realizó un análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS), utilizando el mismo software descrito anteriormente, para encontrar los rasgos fisiológicos y bioquímicos (factores X) que explican la mayor parte de la variación en la incidencia de la pudrición café (respuesta Y) considerando las diferentes etapas fenológicas de desarrollo de la nectarina. La matriz de datos correspondiente incluía 16 muestras (los valores por cuadruplicado de cada muestra en las etapas S1, S2, S3 y S4) y 15 variables (etileno, respiración, RQ, AsA, DHAsA, AA Total, TPC, AC, APX, POD, PPO, SOD, CAT, MDA y H_2O_2). Para realizar el análisis quimiométrico se centraron y escalaron automáticamente los datos, esto con el fin de proporcionar pesos similares para todas las variables. Se utilizó algoritmo de mínimos cuadrados parciales iterativos no lineales (NIPALS) con 2 factores para estimar los parámetros del modelo.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de Etileno y respiración durante el desarrollo del fruto

La producción más alta de etileno se presentó en las etapas S1 y S4, posteriormente se redujo considerablemente en la etapa S2 y en la etapa S3 se observó nuevamente un incremento; ésta misma tendencia se observó en la respiración (Figura 1).

Algunas de las principales funciones del etileno se encuentran en procesos como maduración, senescencia, germinación y floración; sin embargo, también se ha encontrado un papel importante como un modulador de la red de señalización inmune de la planta (van Loon *et al.*, 2006). Se considera que el ácido jasmónico y el etileno

desempeñan papeles fundamentales en la regulación de la respuesta de la planta hacia la infección por hongos necrotróficos (Glazebrook, 2005; Pandey *et al.*, 2016). En el caso del patosistema durazno-*Monilinia* spp., Baró-Montel *et al.* (2019) encontraron que a los 49 DDPF se redujo la producción de etileno, a niveles poco detectables, sin embargo, a los 126 DDPF se incrementó su producción junto con la severidad de *Monilinia* spp.; sus resultados sugieren que en etapas tempranas *Monilinia* spp. suprime la biosíntesis de etileno para modificar las defensas de la fruta e infectar con éxito por el contrario en las etapas finales de desarrollo induce el incremento de etileno para poder beneficiarse del ablandamiento de la pared celular. Por lo tanto, concluyeron que el etileno es un factor clave para determinar la resistencia o susceptibilidad por parte del durazno a la pudrición café, en las diferentes etapas de desarrollo.

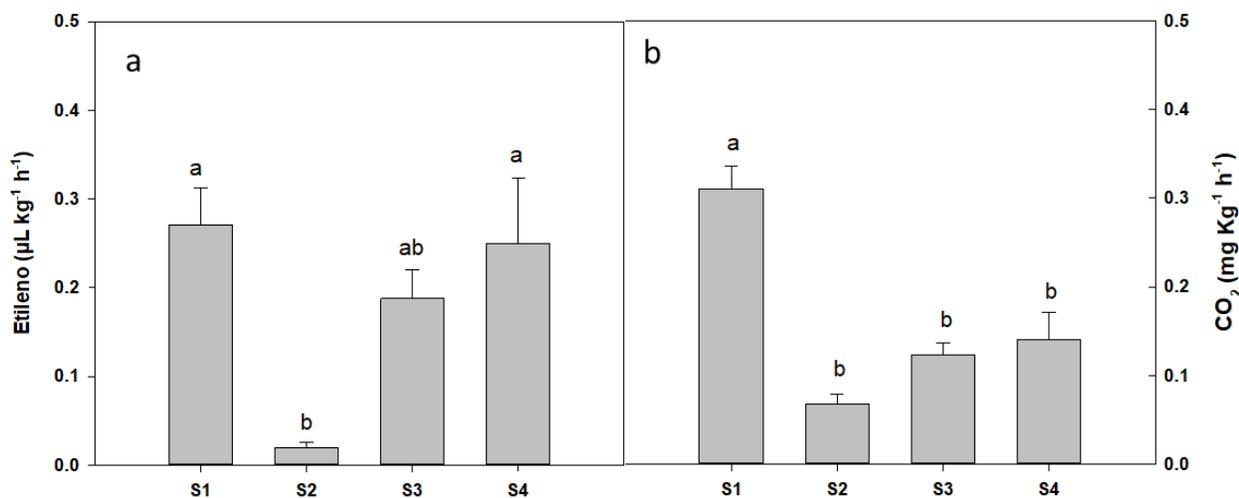


Figura 1. Cambios en la producción de etileno ($\mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$), respiración ($\text{mg Kg}^{-1} \text{h}^{-1} \text{CO}_2$) durante el desarrollo de frutos de nectarina 'Diamond Ray'. Cada punto representa la media y las líneas delgadas verticales indican la desviación estándar de la media ($n = 4$).

Incidencia de *Monilinia fructicola*

A los cinco días después de la inoculación con *Monilinia fructicola* se observaron diferencias estadísticas significativas, los porcentajes más bajos de incidencia fueron de las etapas fenológicas S1 al S3. Después de diez días de inoculación no se observaron diferencias estadísticas significativas del porcentaje de incidencia entre las etapas fenológicas, sin embargo, la menor área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) se observó en la etapa fenológica S3 y la mayor en la S4. Lo cual indica que el progreso de *Monilinia fructicola* en las primeras etapas de desarrollo se ven limitadas por múltiples mecanismos que dificultan el proceso de infección, en comparación con la etapa S4 (Figura 2). Estos resultados concuerdan con diversos autores que indican que en la etapa de endurecimiento de endocarpio se observan los menores porcentajes de incidencia de la enfermedad (Guidarelli *et al.*, 2014; Keske *et al.*, 2011).

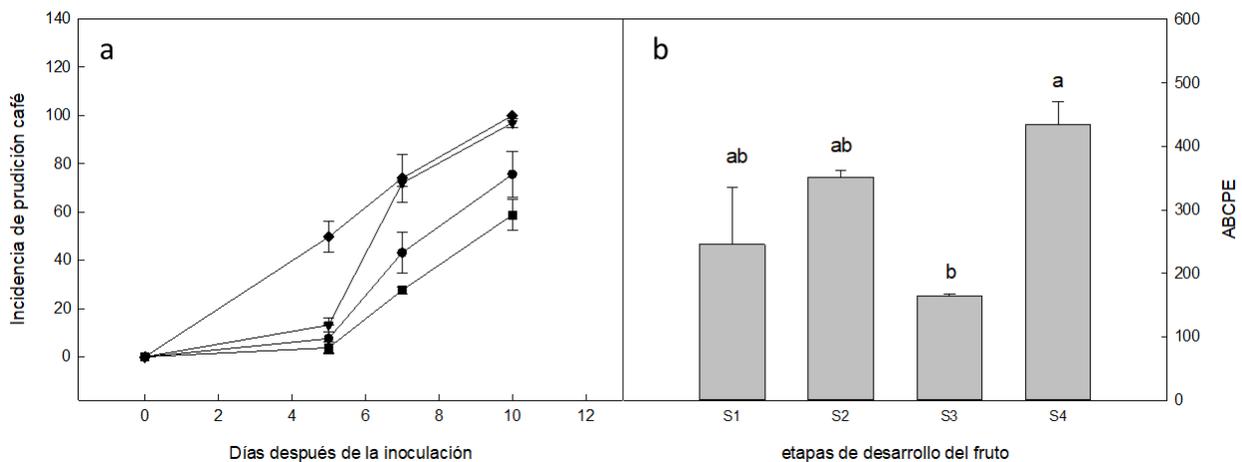


Figura 2. (a) Incidencia y (b) área bajo la curva del progreso de la enfermedad de *Monilinia fructicola* en frutos de nectarina 'Diamond Ray' en diferentes etapas fenológicas de su desarrollo. Etapa S1 (●) etapa S2 (▼), etapa S3 (■), etapa S4 (◆). Las medias con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales (LSD $\alpha=0.05$). ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

Sistema antioxidante no enzimático

De acuerdo con los resultados mostrados en el cuadro 1, la capacidad antioxidante total (TAC) y contenido fenólico total (TPC), presentaron diferencias estadísticas significativas entre las etapas fenológicas. La concentración más alta se observó en la etapa S1 y la más baja en la etapa S4. Se observó una disminución muy notable del 64.6 % y 63.13 %, de TAC y TPC respectivamente en el estado S4 con respecto al S2. En la etapa fenológica S2, los compuestos fenólicos se acumulan en el epicarpio del durazno, la catequina y ácido clorogénico son los más abundantes (Andreotti *et al.*, 2008). En estudios previos, la presencia de estos compuestos se asoció a la reducción de la susceptibilidad a *Monilinia* spp. (Villarino *et al.*, 2011), tal es el caso de la variedad resistente como Bolinha, que contiene una mayor concentración de compuestos fenólicos con respecto a las variedades susceptibles a la pudrición café (Bostock *et al.*, 1999).

En este estudio, el contenido total de vitamina C (AA Total), se expresó como la suma de los contenidos de ácido ascórbico (AsA) y ácido dehidroascórbico (DHAsA). Los niveles más bajos de DHAsA y ácido ascórbico total se observaron en la etapa S4. Algunos autores demostraron que son varios los antioxidantes involucrados en la resistencia contra *Monilinia fructicola* en lugar de un compuesto fenólico específico, por ejemplo, antioxidantes como el glutatión y el ácido lipoico atenúan significativamente la producción de cutinasa (Wang *et al.*, 2002). Por lo tanto, se podría sugerir que una combinación de diferentes compuestos antioxidantes no enzimáticos puede conferir inmunidad parcial en las primeras etapas de desarrollo del fruto, en lugar de un solo compuesto antioxidante no enzimático.

Clorofilas y carotenoides

Los resultados indican que los niveles más altos de clorofila se presentaron en la etapa S1 y S2, los cuales fueron estadísticamente más altos en comparación con las otras etapas; y carotenoides los niveles más altos se presentaron en la etapa S1 (Figura 3a), y posteriormente descendieron sus contenidos, esto se debe a que los frutos de la nectarina, en las etapas iniciales de desarrollo presentan un metabolismo parcialmente fotosintético. En las etapas iniciales se tienen concentraciones muy altas de carotenoides totales, sin embargo, el color de la pulpa de las frutas jóvenes es verde debido a la presencia de clorofila. En frutos de cultivares de pulpa amarilla, la clorofila se descompone en la etapa tardía del desarrollo del fruto, el color verde desaparece y el color amarillo se hace visible (Ma *et al.*, 2014).

Los resultados concuerdan con los reportados por Chen *et al.* (2018), quienes observaron un mayor contenido de clorofila y carotenoides en las etapas iniciales, además observaron que los cloroplastos en la piel de la fruta cambiaron a cromoplastos a medida que cambió el color de la fruta. La conversión de cloroplasto a cromoplasto causó cambios ultraestructurales debido a la aparición de un plástidio elíptico con tilacoides estromales paralelos desordenados y tilacoides granulares alterados, también observaron que los cloroplastos se transformaron en cromoplastos a 68 DDPF, esto coincide en la etapa de desarrollo S2. Ma *et al.* (2014) observaron una disminución de carotenoides en la etapa S2 y un posterior incremento de estos compuestos, esta misma tendencia se observó en estos resultados aunque no se observaron diferencias estadísticas significativas entre las etapas S2, S3 y S4 (Figura 3a).

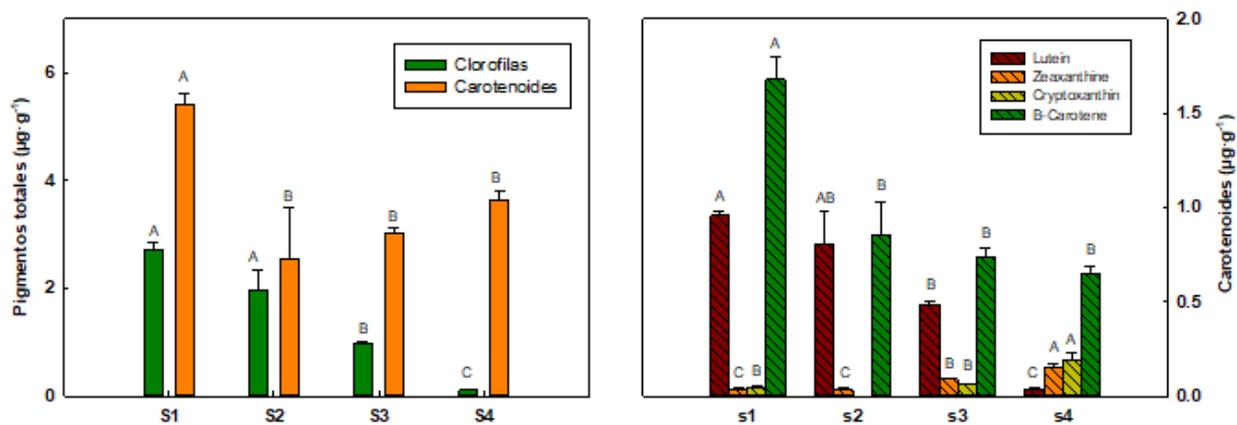


Figura 3.(a) Cambios en los contenidos de pigmentos totales ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y (b) carotenoides durante el desarrollo de frutos de nectarina ‘Diamond Ray’. Cada punto representa la media y las barras verticales indican la desviación estándar de la media ($n = 4$).

Los carotenoides son divididos en dos grupos: carotenos y xantofilas. De acuerdo con los resultados se observó que los principales carotenoides presentes durante el desarrollo del fruto fueron carotenos (β -caroteno) y xantofilas (luteína, criptoxantina y zeaxantina) estos resultados concuerdan con los reportados por Cao *et al.* (2017), quienes encontraron que los principales pigmentos presentes en cultivares de pulpa amarilla y blanca fueron los mismos reportados en esta investigación. La mayor cantidad de β -Caroteno y luteína, se encontró en la etapa S1 (Figura 3b) y posteriormente se observó una disminución, caso contrario sucedió con criptoxantina y zeaxantina, estos compuestos se incrementaron en la etapa S4, la cual presentó los contenidos estadísticamente más altos.

Los carotenoides en los órganos no fotosintéticos, tienen diferentes funciones importantes y con recientes investigaciones se han encontrado más funciones, algunas de ellas son: actúan como fotoprotectores, antioxidantes, atrayentes de color y

precursores de las hormonas vegetales (ABA) (Maoka, 2020). Por lo tanto, la disminución en estos compuestos afecta la capacidad antioxidante y otros metabolismos en los frutos de nectarina.

Sistema antioxidante enzimático

En esta investigación, el sistema antioxidante enzimático presentó diferencias significativas entre las diferentes etapas fenológicas en las enzimas peroxidasa (POD), polifenoloxidasas (PPO) y ascorbato peroxidasa (APX); pero no se observaron diferencias estadísticas significativas en las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). La mayor actividad de la peroxidasa se presentó en la etapa S2 y la más baja en la S4, una tendencia similar se observó con la enzima polifenoloxidasas (Cuadro 1). Por lo tanto, la actividad de la POD y PPO pueden tener un impacto en la patogénesis de *Monilinia* spp. En relación con esto hay estudios que indican la influencia de la actividad enzimática con la patogénesis, como es el caso del patosistema algodón - *X. campestris*, donde se identificó que la peroxidasa unida a la pared está fuertemente involucrada en la producción de O₂ durante el estallido oxidativo (Delannoy *et al*, 2003).

Otro estudio en plantas de arroz, reportó la importancia de peroxidasa apoplástica en defensa contra una infección por *Xanthomonas* (Hilaire *et al.*, 2001). La supresión de las respuestas inmunes de la planta durante la interacción con el patógeno se atribuye a las proteínas efectoras secretadas como Pep1 (proteína esencial durante la penetración), la cual funciona como un inhibidor de la explosión oxidativa impulsada por las peroxidases de las plantas y, como consecuencia, suprime las respuestas inmunes tempranas (Hemetsberger *et al.*, 2012).

Las enzimas CAT, POD y APX son las encargadas de la descomposición de H₂O₂, la APX es la enzima primaria que participa en la desintoxicación de ROS en cloroplastos y el citosol de las células vegetales (Mittler, 2002). En los resultados de la presente investigación se observó la actividad más baja de APX en el estado fenológico S4 (Cuadro 2), esta actividad reducida podría estar desequilibrando el metabolismo ROS en la fruta de durazno, por lo que la incidencia de *Monilinia* spp se ve incrementada.

Cuadro 1. Cambios en la actividad de compuestos antioxidante y estrés oxidativo de frutos de nectarina 'Diamond Ray' cosechados en diferente estado fenológicos.

Compuestos antioxidantes no enzimáticos	S1	S2	S3	S4
AsA (mg 100 g ⁻¹)*	0.09 C	3.66 AB	2.25 B	4.25 A
DHAsA (mg 100 g ⁻¹)	13.39 A	4.5 B	2.39 BC	0.70 C
AA Total (mg 100 g ⁻¹)	13.49 A	7.70 B	4.95 B	4.83 B
TPC (mg GAE g ⁻¹)	3.27 A	1.84 B	1.25 BC	0.65 C
AC (mg Fe ³⁺ g ⁻¹)	3.34 A	2.17 B	1.61 C	0.80 D
Compuestos antioxidantes enzimáticos	S1	S2	S3	S4
APX (U mg ⁻¹ protein)	3.72 A	1.59 B	1.47 B	1.3 B
POD (U mg ⁻¹ protein)	181.8 A	230.6 A	184.8 A	39.7 B
PPO (U mg ⁻¹ protein)	16.96 B	47.59 A	27.64 AB	22.78 B
SOD (U mg ⁻¹ protein)	576.8 A	461.8 A	549.3 A	544.8 A
CAT (U mg ⁻¹ protein)	1.47 A	1.07 A	1.26 A	1.43 A
Estrés oxidativo	S1	S2	S3	S4
MDA (μmol g ⁻¹ h ⁻¹)	10.5 C	11.9 C	18.3 B	25.3 A
H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹)	14.7 B	29.3 B	39.5 B	77.4 A

AsA: ácido ascórbico; DHAsA: ácido dehidroascórbico; AA Total: contenido total de vitamina C; TPC: compuestos fenólicos totales; AC: actividad antioxidante; APX: ascobato peroxidasa; POD: peroxidasa; PPO: polifenoloxidasa; SOD: súper oxido dismutasa; CAT: catalasa; MDA: malondialdehído; H₂O₂: peróxido. *Las medias con la misma letra en la misma fila son estadísticamente iguales (Tukey α=0.05).

Estrés oxidativo

Los resultados obtenidos (Cuadro 1), indican que la generación de H₂O₂ se incrementó en cada estado fenológico, subsecuente; no obstante, las tres primeras etapas fenológicas no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos, pero

en el estado S4 se presentó el mayor incremento significativo de H_2O_2 . Este incremento se puede explicar por la mayor actividad metabólica del fruto durante el proceso de maduración y la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes en esa misma etapa fenológica. La acumulación de altos niveles de H_2O_2 , induce un incremento en la peroxidación de lípidos, de tal modo que aumenta el contenido de MDA y provoca daño en membranas (Tian *et al.*, 2016). Lo anterior se observó en los resultados de la presente investigación, donde la concentración de MDA no aumentó de la etapa S1 a la S2, pero presentó un incremento significativo con tendencia lineal hacia las etapas S3 y S4, con los niveles más altos de MDA.

Estudios han encontrado que algunos agentes patógenos biotróficos son inhibidos por el H_2O_2 , mientras que los agentes patógenos necrotróficos fueron favorecidos por la acumulación de H_2O_2 (Mellersh *et al.*, 2002). En el caso de *Monilinia*, que es un hongo necrotrófico, se observó un incremento en la incidencia al mismo tiempo que se incrementó la acumulación de H_2O_2 . El desarrollo y la maduración de las frutas climatéricas son procesos oxidativos, que producen especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Pandey *et al.*, 2013). Por lo anterior, resulta primordial tener un buen equilibrio entre el sistema antioxidante y la presencia de ROS en los frutos de nectarina para disminuir la incidencia de *Monilinia fructicola*.

Relación de parámetros fisiológicos y bioquímicos con la incidencia de *Monilinia fructicola* en las diferentes etapas de desarrollo de nectarina 'Diamond Ray'

El gráfico de las cargas correspondientes con los dos primeros factores representó el 65.3 % de la variación observada (Figura 4). Los valores del Gráfico de Importancia Variable (VIP) varían a lo largo de la literatura, pero existe cierto acuerdo en que los valores superiores a 1.0 indican predictores que son importantes (Wold, 1995) dentro del modelo. Con base en este criterio, (Figura 3, inserto), AsA, PPO, MDA, etileno, clorofila, luteína, criptoxantina y β -caroteno fueron las variables más influyentes en la determinación del modelo de proyección PLS y explicando la susceptibilidad de *Monilinia fructicola* durante el desarrollo del fruto de nectarina, en términos de cambios fisiológicos y de composición. Se observó que el AsA fue el parámetro más negativamente relacionado con la incidencia de *Monilinia fructicola*.

Entre los antioxidantes, el ácido L-ascórbico, es un compuesto antioxidante multifuncional significativo y un sustrato importante para la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS) involucradas en la tolerancia al estrés (Akram *et al.*, 2017). De acuerdo con el modelo obtenido se observa que una mayor cantidad de ácido ascórbico en la fruta de nectarina puede generar condiciones que limitan el desarrollo de la enfermedad en la etapa S3, debido a que se mantiene un óptimo balance entre el sistema antioxidante y la producción de ROS; influyendo significativamente el AsA.

Los resultados obtenidos concuerdan con Obi *et al.* (2020), quienes encontraron una correlación negativa del contenido de AsA con la severidad de *Monilinia fructicola*,

inoculada artificialmente, en diferentes variedades de durazno. Un caso similar se observó en el patosistemas papa - *Phytophthora infestans*, en dicho experimento se utilizó papa transgénica con niveles mejorados de L-ascorbato celular, con lo cual se redujeron los síntomas causados por el hongo oomiceto *Phytophthora infestans* y mostraron tolerancia a varios tipos de estrés abióticos debido a la actividad mejorada de eliminación de ROS (Chung *et al.*, 2019).

También se observó que los carotenoides: criptoxantina y zeaxantina se relacionaron negativamente con la incidencia de *Monilinia fructicola*. Los carotenoides son importantes antioxidantes y podrían absorber oxígeno singlete, radicales anión superóxido y radicales hidroxilos mediante la formación de endoperóxido o epóxido (Maoka, 2019).

Algunos patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* inducen la disfunción del ciclo de xantofila para regular la abertura estomática. La reducción en el grupo de precursores de xantofila limita la biosíntesis de ABA (Zeng *et al.*, 2020). La reducción de ABA aparentemente debilitó las respuestas de defensa del tejido, incluida la inducción de ROS y el depósito de calosa, lo que resultó en una mayor susceptibilidad de las plantas a esclerotinia (Zhou *et al.*, 2015).

ROS podría actuar aumentando o disminuyendo varias cascadas de señalización y el alcance de su acumulación determina su papel en la célula porque podrían actuar como moléculas de transducción de señales importantes (a niveles bajos) o como moléculas tóxicas (a niveles altos) con un fuerte poder oxidante (Miller *et al.*, 2010). Por lo tanto, el AsA y compuestos carotenoides influyen significativamente para mantener los

niveles bajos de ROS y de esta manera participar en la activación de las vías de señalización relacionadas con la respuesta de defensa del huésped a los patógenos necrotróficos (Hammond- Kosack y Jones, 1996).

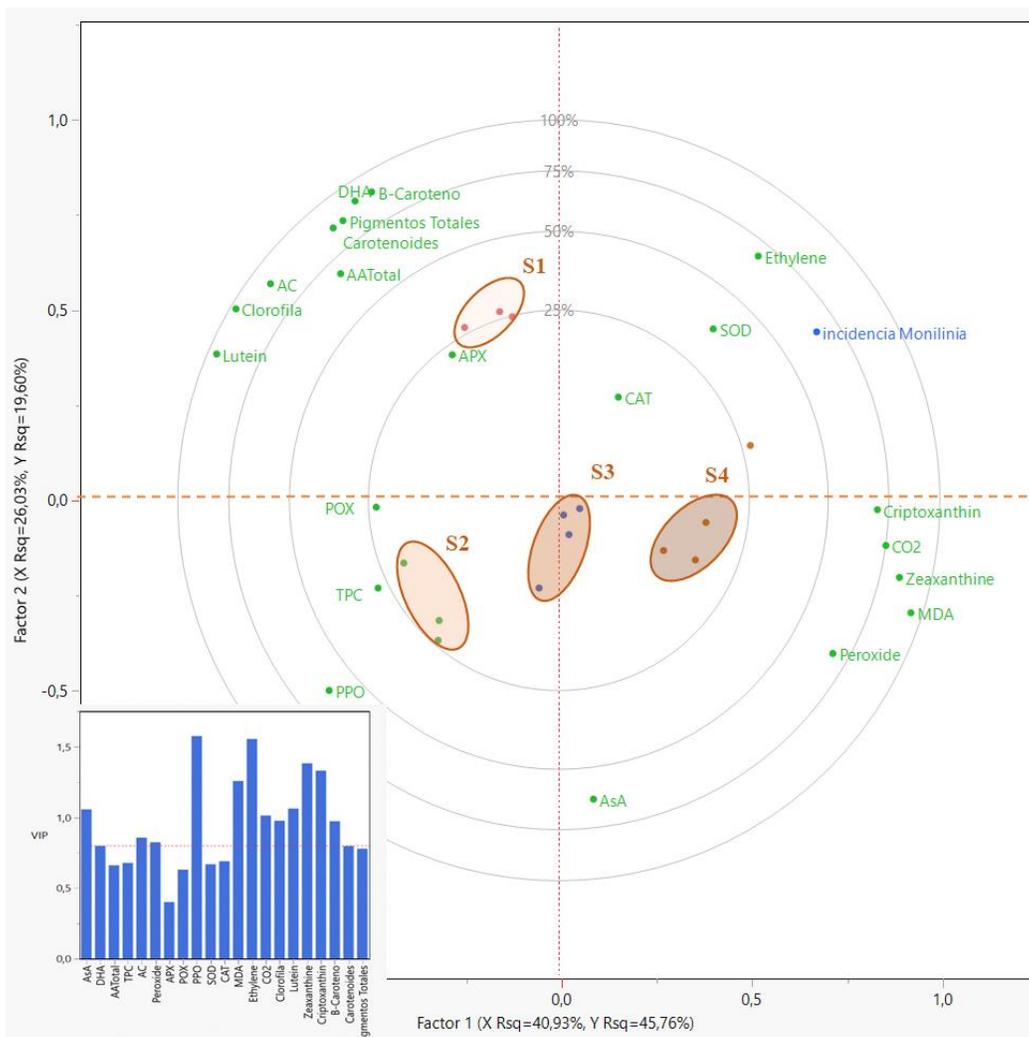


Figura 4. Correlación de mínimos cuadrados parciales (PLS) que representa la contribución de cada factor fisiológico y bioquímico (letras verdes) a la incidencia de *Monilinia fructicola* (letras azules) de nectarina ‘Diamond Ray’ en diferentes etapas de crecimiento fenológico. El inserto representa la gráfica de importancia variable (VIP). El número de VIP > 0.8 (línea roja discontinua) indica que los predictores son importantes para determinar los dos factores utilizados en el modelo PLS.

El etileno mostró una relación positiva con incidencia de la enfermedad. El etileno induce la maduración de la fruta, así como la senescencia de las plantas y muchos otros procesos de desarrollo que pueden estar relacionados con una mayor susceptibilidad a los hongos patógenos (Mengiste *et al.*, 2010).

2.5. CONCLUSIONES

Existen cambios importantes en la actividad antioxidante enzimática y no enzimática durante las diferentes etapas de desarrollo, lo cual afecta significativamente la producción de malondialdehído (MDA) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂).

El menor grado de susceptibilidad se presentó durante las primeras etapas de desarrollo del fruto. Los compuestos antioxidantes no enzimático más importante que se correlacionaron negativamente con el desarrollo de *Monilinia fructicola* fueron el contenido de ácido ascórbico y algunos carotenoides. Por lo tanto, estos compuestos son muy relevante para mantener un óptimo sistema de defensa y por su papel antioxidante que confiere tolerancia a la pudrición café.

Durante la etapa fenológica S4 (etapa climatérica y de maduración) la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa (POD) se ve reducida, lo cual sugiere que podría estar desequilibrando el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los frutos de durazno y nectarina, por lo que se incrementa la incidencia de *Monilinia* spp.

2.6. LITERATURA CITADA

Akram, N. A., Shafiq, F., Ashraf, M. 2017. Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8, 613.

- Andreotti, C., Ravaglia, D., Ragaini, A., Costa, G. 2008. Phenolics compounds in peach (*Prunus persica*) at harvest and during fruit maturation. *Annals of Applied Biology*, 153, 11–23.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 601-639.
- Baró-Montel, N., Vall-Illaura, N., Giné-Bordonaba, J., Usall, J., Serrano-Prieto, S., Teixidó, N., Torres, R. 2019. Double-sided battle: The role of ethylene during *Monilinia* spp. infection in peach at different phenological stages. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 324-333.
- Bostock, R. M., Wilcox, S. M., Wang, G., Adaskkaveg, J. E. 1999. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54, 37–50.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, United States, v. 72, n. 1-2, p. 248-254.
- Camejo, D., Guzmán-Cedeño, Á., Moreno, A. 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 10-23.
- Cao, S., Liang, M., Shi, L., Shao, J., Song, C., Bian, K., Yang, Z. 2017. Accumulation of carotenoids and expression of carotenogenic genes in peach fruit. *Food chemistry*, 214, 137-146.
- Chen, M., Liu, X., Jiang, S., Wen, B., Yang, C., Xiao, W., Li, L. 2018. Transcriptomic and functional analyses reveal that PpGLK1 regulates chloroplast development in peach (*Prunus persica*). *Frontiers in Plant Science*, 9, 34.
- Chung, I. M., Venkidasamy, B., Upadhyaya, C. P., Packiaraj, G., Rajakumar, G., Thiruvengadam, M. 2019. Alleviation of *Phytophthora infestans* Mediated Necrotic Stress in the Transgenic Potato (*Solanum tuberosum* L.) with Enhanced Ascorbic acid Accumulation. *Plants*, 8(10), 365.
- Collazo, C., Giné-Bordonaba, J., Aguiló-Aguayo, I., Povedano, I., Bademunt, A., Viñas, I. 2018. *Pseudomonas graminis* strain CPA-7 differentially modulates the oxidative response in fresh-cut ‘Golden delicious’ apple depending on the storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 138, 46-55.
- De Cal, A., Sandin-Espana, P., Martinez, F., Egüen, B., Chien-Ming, C., Lee, M. H., Prusky, D. 2013. Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of *Monilinia fructicola* on peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 418-423.
- Delannoy, E., Jalloul, A., Assigbetsé, K., Marmey, P., Geiger, J. P., Lherminier, J., Nicole, M. 2003. Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(11), 1030-1038.

- Gallie, D. R. 2013. L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*, 2013.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309-314.
- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W. G., Toyota, M., Devireddy, A. R., Mittler, R. 2014. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science*, 19(10), 623-630.
- Giné-Bordonaba, J., Cantin, C. M., Larrigaudière, C., López, L., López, R., Echeverria, G. 2014. Suitability of nectarine cultivars for minimal processing: The role of genotype, harvest season and maturity at harvest on quality and sensory attributes. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 49-60.
- Giné-Bordonaba, J., Echeverria, G., Ubach, D., Aguiló-Aguayo, I., López, M. L., Larrigaudière, C. 2017. Biochemical and physiological changes during fruit development and ripening of two sweet cherry varieties with different levels of cracking tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 216-225.
- Giné-Bordonaba, J., Terry, L. A. 2016. Effect of deficit irrigation and methyl jasmonate application on the composition of strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit and leaves. *Scientia Horticulturae*, 199, 63-70.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 43, 205-227.
- Guidarelli, M., Zubini, P., Nanni, V., Bonghi, C., Rasori, A., Bertolini, P., Baraldi, E. 2014. Gene expression analysis of peach fruit at different growth stages and with different susceptibility to *Monilinia laxa*. *European Journal of Plant Pathology*, 140(3), 503-513.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773-1791.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., Doehlemann, G. 2012. The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathogens*, 8(5).
- Hilaire, E., Young, S. A., Willard, L. H., McGee, J. D., Sweat, T., Chittoor, J. M., Leach, J. E. 2001. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(12), 1411-1419.
- Kader, A. A., y Saltveit, M. E. 2003. Respiration and gas exchange. In J. A. Bartz & J. K. Brecht (Eds.), *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables* (2nd ed.). Marcel Dekker, Inc.

- Keske, C., Amorim, L., May-De Mio, L. L. 2011. Peach brown rot incidence related to pathogen infection at different stages of fruit development in an organic peach production system. *Crop protection*, 30(7), 802-806.
- Kreidl, S., Edwards, J., & Villalta, O. N. 2015. Assessment of pathogenicity and infection requirements of *Monilinia* species causing brown rot of stone fruit in Australian orchards. *Australasian Plant Pathology*, 44(4), 419-430.
- Lurie, S., Fallik, E., Handros, A. y Shapira, R. 1997. The possible participation of peroxidase in resistance to *Botrytis cinerea* in heat-treated tomato fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50, 141e149.
- Ma, J., Li, J., Zhao, J., Zhou, H., Ren, F., Wang, L., Han, Y. 2014. Inactivation of a gene encoding carotenoid cleavage dioxygenase (CCD4) leads to carotenoid-based yellow coloration of fruit flesh and leaf midvein in peach. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(1), 246-257.
- Maoka, T. 2020. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, 1-16.
- Mellersh, D. G., Foulds, I. V., Higgins, V. J., and Heath, M. C. 2002. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions. *The Plant Journal*, 29(3), 257-268.
- Mengiste, T., Laluk, K., AbuQamar, S. 2010. Mechanisms of induced resistance against *B. cinerea*. In Dov Prusky & M. L. Gullino (Eds.), *Post-harvest Pathology, Plant Pathology in the 21st Century*. Springer.
- Miller, E. W., Dickinson, B. C., Chang, C. J. 2010. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(36), 15681-15686.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Nakano, Y. y Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.
- Obi, V. I., Montenegro, J., Barriuso, J. J., Saidani, F., Aubert, C., Gogorcena, Y. 2020. Is the Tolerance of Commercial Peach Cultivars to Brown Rot Caused by *Monilinia laxa* Modulated by its Antioxidant Content?. *Plants*, 9(5), 589.
- Pandey, D., Rajendran, S. R. C. K., Gaur, M., Sajeesh, P. K., and Kumar, A. 2016. Plant defense signaling and responses against necrotrophic fungal pathogens. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(4), 1159-1174.
- Pandey, V. P., Singh, S., Jaiswal, N., Awasthi, M., Pandey, B., Dwivedi, U. N. 2013. Papaya fruit ripening: ROS metabolism, gene cloning, characterization and

- molecular docking of peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 98, 98-105.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A., and Mittler, R. 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(6), 691-699.
- Tian, S., Torres, R., Ballester, A. R., Li, B., Vilanova, L., González-Candelas, L. 2016. Molecular aspects in pathogen-fruit interactions: virulence and resistance. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 11-21.
- van Loon, L. C., Geraats, B. P., Linthorst, H. J. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 11(4), 184-191.
- Vilaplana, R., Valentines, M. C., Toivonen, P., Larrigaudière, C. 2006. Antioxidant Potential and Peroxidative State of Golden Smoothie Apples Treated with 1-Methylcyclopropene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(1), 104-109.
- Villarino, M., Sandín-Espana, P., Melgarejo, P., De Cal, A. 2011. High chlorogenic and neochlorogenic acid levels in immature peaches reduce *Monilinia laxa* infection by interfering with fungal melanin biosynthesis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 3205-3213.
- Wang, G. Y., Michailides, T. J., Hammock, B. D., Lee, Y. M., Bostock, R. M. 2002. Molecular cloning, characterization, and expression of a redox-responsive cutinase from *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *Fungal Genetics and Biology*, 35(3), 261-276.
- Willets, H. J., y Bullock, S. 2019. Cytology, histology, and histochemistry of fruit. *Cytology, Histology and Histochemistry of Fruit Tree Diseases*, 113.
- Wold, S. 1995. PLS for Multivariate Linear Modeling. In H. van Waterbeemd (Ed.), *Chemometric methods in molecular design* (p. 369). VCH.
- Zeng, L., Yang, X., Zhou, J. 2020. The xanthophyll cycle as an early pathogenic target to deregulate guard cells during *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Plant Signaling & Behavior*, 15(1), 1691704.
- Zhou, J., Zeng, L., Liu, J., Xing, D. 2015. Manipulation of the xanthophyll cycle increases plant susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS pathogens*, 11(5), e1004878.

CONCLUSIONES GENERALES

Se presentaron cambios importantes en la actividad antioxidante enzimática y no enzimática durante el desarrollo de los frutos de nectarina, lo cual afecta significativamente la producción de malondialdehído (MDA) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2). La mayor incidencia de *Monilinia fructicola* se presentó en la etapa final de desarrollo de nectarina. Durante la etapa fenológica S4 (etapa climatérica y de maduración) la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa (POD) se ve reducida, lo cual sugiere que podría estar desequilibrando el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los frutos de durazno y nectarina, por lo que se incrementa la incidencia de la pudrición café.

La combinación de los inductores con los fungicidas proporciona un buen control de *Monilinia fructicola*, ya que hubo una reducción de los parámetros epidemiológicos que describieron el desarrollo de *Monilinia fructicola* en el fruto de durazno, en comparación de usar los inductores y fungicidas por separado. Se observó un porcentaje de eficiencia en la reducción del ABCPE de 47 % con la interacción fosfito de potasio y dosis completa de fungicidas con respecto al testigo. El uso de los inductores incrementó la actividad de las enzimas peroxidasa, polifenoloxidasas y catalasa.

El uso de los inductores incrementó el contenido de Ca. El fósforo, magnesio y azufre presentaron cambios en la concentración con la interacción de los factores inductores y año. Por lo que sería conveniente realizar evaluaciones del estatus nutrimental durante más ciclos para realizar ajustes en la fertilización cuando así se requiera, debido a que la inducción de resistencia implica un desgaste energético y por lo tanto mayor demanda de nutrimental.