



Efecto de los ácidos fenólicos en el sistema antioxidante de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.)¹

Effect of phenolic acids on the antioxidant system of tomato plants (*Solanum lycopersicum* Mill.)

William Zárate-Martínez², Susana González-Morales³, Francisca Ramírez-Godina⁴, Armando Robledo-Olivo⁵,
Antonio Juárez-Maldonado⁶

- ¹ Recepción: 17 de diciembre, 2020. Aceptación: 24 de marzo, 2021. Este trabajo formó parte de la tesis “Aplicación de ácidos fenólicos como inductores de tolerancia al estrés causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de tomate”. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.
- ² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca, Melchor Ocampo No. 7. Santo Domingo Barrio Bajo, Etla, Oaxaca, México. C.P. 68200. zarate.william@inifap.gob.mx (<https://orcid.org/0000-0001-9330-0819>).
- ³ CONACYT - Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. qfb_sgm@hotmail.com (<https://orcid.org/0000-0001-5734-6086>).
- ⁴ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Fitomejoramiento, Saltillo, Coahuila, México. godramf@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-5726-6737>).
- ⁵ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Alimentos, Saltillo, Coahuila, México. armando.robledo@outlook.com (<https://orcid.org/0000-0002-6604-7771>).
- ⁶ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Botánica, Saltillo, Coahuila, México. juma841025@hotmail.com (autor para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0003-3061-2297>).

Resumen

Introducción. Los ácidos fenólicos pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, su síntesis y concentración en las plantas aumenta cuando estas se encuentran bajo condiciones de estrés biótico o abiótico. **Objetivo.** Evaluar el efecto de los ácidos fenólicos sobre el sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático en plantas de tomate sometidas a estrés biótico. **Materiales y métodos.** El experimento se realizó de marzo a diciembre de 2016, en Saltillo, México. Se estableció un cultivo de tomate tipo Saladette de la variedad Río Fuego (*Solanum lycopersicum* Mill.). A plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (1×10^5 UFC ml⁻¹) se les realizaron aspersiones foliares de ácidos fenólicos a una dosis de 1 kg ha⁻¹ con el producto Defens Gr® (IA: ácidos fenólicos 10 000 ppm). Se muestrearon hojas a los 15, 31 y 92 días después del trasplante (ddt) y frutos a los 90 ddt. Se trabajó con seis tratamientos: 1) testigo absoluto (T0), 2) aplicación de ácidos fenólicos antes de inocular *Clavibacter* (AFA), 3) aplicación de ácidos fenólicos después de inocular *Clavibacter* (AFD), 4) aplicación de ácidos fenólicos antes y después de inocular *Clavibacter* (AFAD), 5) solo aplicación de ácidos fenólicos (AF) y 6) solo inoculación con *Clavibacter* (Cmm). **Resultados.** La aplicación de ácidos fenólicos intervino en la actividad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Se encontró mayor capacidad antioxidante en hoja que en fruto, la cual se determinó por ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)] y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). La inoculación de las plantas de tomate aumentó la actividad de las enzimas catalasa y fenilalanina amonio liasa en hoja; además, hubo reducción de la actividad enzimática del superóxido dismutasa y el contenido de fenoles totales. **Conclusión.**



Los ácidos fenólicos intervinieron en los mecanismos de defensa enzimáticos de la planta y redujeron los niveles de estrés ocasionados por la inoculación.

Palabras clave: antioxidantes enzimáticos, antioxidantes no enzimáticos, capacidad antioxidante.

Abstract

Introduction. Phenolic acids belong to the group of phenolic compounds, their synthesis and concentration in plants increases when they are under biotic or abiotic stress conditions. **Objective.** To evaluate the effect of phenolic acids on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system in tomato plants subjected to biotic stress. **Materials and methods.** The experiment was carried out from March to December 2016, in Saltillo, Mexico. A tomato crop Saladette type of the Rio Fuego variety (*Solanum lycopersicum* Mill.) was established. Tomato plants inoculated with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (1×10^5 CFU ml⁻¹) were foliar sprayed with phenolic acids at a dose of 1 kg ha⁻¹ with the Defens Gr® product (IA: phenolic acids 10 000 ppm). Leaves were sampled at 15, 31, and 92 days after the transplantation (ddt) and fruits at 90 ddt. Six treatments were used: 1) absolute control (T0), 2) application of phenolic acids before the inoculation with *Clavibacter* (AFA), 3) application of phenolic acids after inoculation with *Clavibacter* (AFD), 4) application of phenolic acids before and after inoculation with *Clavibacter* (AFAD), 5) only application of phenolic acids (AF), and 6) only inoculation with *Clavibacter* (Cmm). **Results.** The application of phenolic acids intervened in the activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. A higher antioxidant capacity was found in leaf than in fruit, which was determined by ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid)) and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). The inoculation of tomato plants increased the activity of catalase and phenylalanine ammonium lyase enzymes in leaf; in addition, there was reduction of superoxide dismutase enzyme activity and total phenol content. **Conclusion.** Phenolic acids intervened in the enzymatic defense mechanisms of the plant and reduced the stress levels caused by inoculation.

Keywords: enzymatic antioxidants, non-enzymatic antioxidants, antioxidant capacity.

Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) es un cultivo de importancia económica que se encuentra en todo el mundo. México ocupa el décimo lugar como productor de esta hortaliza (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2017). Sin embargo, los patógenos bacterianos reducen el rendimiento, la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causa la marchitez y cancro bacteriano, las dos enfermedades más importantes en tomate (Gartemann et al., 2003). El grado de afectación por el cancro bacteriano puede ser de hasta un 100 % (Rueda-Barrientos et al., 2017).

Debido a la resistencia que los microorganismos han desarrollado a los antibióticos, se han buscado nuevos compuestos con capacidad de inhibir el desarrollo de patógenos (Daferera et al., 2003). Existen reportes del uso de compuestos fenólicos como inhibidores de *Botrytis cinerea* (Mendoza et al., 2013) o contra *Xylella fastidiosa* en condiciones *in vitro* (Maddox et al., 2010).

Ante condiciones de estrés aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la planta (Mittler et al., 2004). Es importante señalar que el daño en la planta ocurre cuando la cantidad de ROS es mayor que la capacidad antioxidante (Michalak, 2006). De forma natural, todas las plantas sintetizan una gran cantidad de

compuestos orgánicos, entre estos, los metabolitos primarios y secundarios (Baraldi et al., 2017). Los metabolitos secundarios están involucrados en los sistemas de defensa y en procesos de respuestas a estrés biótico y abiótico (Bellaloui, 2012).

Los compuestos fenólicos (CF) son metabolitos secundarios, esenciales durante el crecimiento y reproducción de las plantas, actúan como agentes protectores frente a patógenos (Cervilla et al., 2012). Dentro de la clasificación de los CF se encuentran los ácidos fenólicos (AF), distribuidos en todo el reino vegetal, con propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Xu et al., 2008). Los compuestos fenólicos cumplen funciones de defensa en las plantas, ayudan a hacer frente a factores bióticos y abióticos (Lu et al., 2015); tienen una importancia fisiológica y morfológica para las plantas, ya que poseen propiedades como antioxidantes y antimicrobianos (Balasundram et al., 2006). El contenido de sustancias fenólicas presenta una alta correlación con su capacidad antioxidante (Gaviria et al., 2012). Los ácidos gálico y ferúlico se han informado como buenos inhibidores del crecimiento de *Botrytis cinérea* (Apolonio-Rodríguez et al., 2017). Los ácidos fenólicos reducen, en campo, la incidencia y severidad de *C. michiganensis* en el cultivo de tomate (Zárate-Martínez et al., 2018).

Los antioxidantes son compuestos que contrarrestan el estrés oxidativo causado por un desequilibrio de especies reactivas de oxígeno (Halliwell, 2006). Estos pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los antioxidantes enzimáticos se encuentran: la enzima catalasa que cataliza la dismutación de H_2O_2 en H_2O y O_2 (Asada, 1999). Es importante mencionar que todas las plantas tienen una red de defensa muy bien organizada y coordinada, la cual, se debe a señales apropiadas durante la patogénesis (Jones & Dangl, 2006).

Cuando en las plantas hay baja actividad de la enzima catalasa, estas pueden presentar baja tolerancia al estrés, por el contrario, el aumento en la actividad de la catalasa reducirá en las plantas los niveles tóxicos de H_2O_2 (Vandenabeele et al., 2004). El glutatión peroxidasa pertenece a una familia de enzimas que protege a las células contra el daño oxidativo causado por el exceso de ROS (Wang et al., 2017) y junto a la ascorbato peroxidasa son las principales enzimas que eliminan estas especies y catalizan la reducción de H_2O_2 con el fin de prevenir el daño celular (Ozyigit et al., 2016). Ascorbato peroxidasa tiene dos formas citosólicas, una con funciones defensivas y otra unida a la membrana, por lo cual, se le conoce como un secuestrador de ROS (Foyer & Noctor, 2005; Pignocchi et al., 2003). Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran los fenoles y flavonoides (compuestos más comunes en frutas y vegetales), que tienen una fuerte capacidad antioxidante.

El estrés biótico puede inducir el estrés oxidativo en las plantas y activar su sistema de defensa antioxidante, principal mecanismo para la eliminación de ROS (Mittler et al., 2004). El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto de los ácidos fenólicos sobre el sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático en plantas de tomate sometidas a estrés biótico.

Materiales y métodos

Establecimiento del cultivo

El trabajo se realizó de marzo a diciembre de 2016, en un invernadero de mediana tecnología (ventilación natural y sin calefacción) del departamento de Horticultura en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Saltillo, México (25° 21' 13" latitud norte y 101° 01' 56" longitud oeste, a 1743 msnm).

El 20 de marzo se sembró en charolas de poliestireno de doscientas cavidades, tomate tipo Saladette de la variedad Río Fuego, el 24 de abril se trasplantó en bolsas negras de polietileno, las cuales contenían 10 l de sustrato perlita: peat moss relación 1:1 (v: v). El cultivo se manejó a un solo tallo, se le realizaron podas de yemas axilares y deshoje. La nutrición fue administrada a través de un sistema de riego dirigido con solución Steiner (Steiner, 1961), la que se aplicó a cuatro concentraciones: 25 % en etapa vegetativa, 50 % en floración, 75 % en amarre de frutos, y 100 % en llenado y cosecha de fruto.

Aplicación de tratamientos

Los tratamientos consistieron en la aplicación de ácidos fenólicos (AF), para ello se empleó como fuente el producto Defens Gr® (10 000 ppm de ácidos fenólicos). Se establecieron seis tratamientos: 1) testigo absoluto (T0); 2) aplicación de ácidos fenólicos antes de inocular *Cmm* (AFA); 3) aplicación de ácidos fenólicos después de inocular *Cmm* (AFD); 4) aplicación de ácidos fenólicos antes y después de inocular *Cmm* (AFAD); 5) solo aplicación de ácidos fenólicos (AF) y 6) solo inoculación con *Cmm*.

Se inició con la aplicación foliar de ácidos fenólicos siete días después del trasplante (ddt). Cada siete días se aplicó una dosis de 1 kg ha⁻¹, para un total de diez aplicaciones, a todos los tratamientos a excepción de AFA, ya que en este tratamiento hubo tres aplicaciones, a una dosis de 3,3 kg ha⁻¹ a intervalos de cinco días.

A los 21 ddt se realizó la inoculación con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, día en el que no se realizó aplicación de AF, restableciendo las aplicaciones a los 28 ddt.

Inoculación de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Las plantas correspondientes a los tratamientos con estrés biótico se inocularon con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* a los 21 ddt, a una concentración de 1x10⁵ UFC ml⁻¹. Se realizaron cortes en las hojas, las cuales, se sumergieron en 30 ml de solución bacteriana por 5 min, el sobrante se asperjó al follaje.

La bacteria *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* se aisló de plantas de tomate con síntomas atribuibles a esta. Se obtuvo savia de las plantas colectadas mediante un macerado en mortero de porcelana. La savia se sembró en cajas Petri con medio de cultivo NBY (Borboa et al., 2009). Se incubaron a 28 °C por 48 h. El crecimiento bacteriano se purificó, se les realizó pruebas morfológicas y bioquímicas para su identificación. Se realizó un lavado del crecimiento bacteriano y se ajustó a 1x10⁵ UFC ml⁻¹.

Muestras y variables estudiadas

A los 15, 31 y 92 ddt, se seleccionaron plantas aleatorias, de las cuales se tomó la tercera hoja joven expandida. A los 90 ddt se cortaron frutos seleccionados al azar, frutos uniformes y con el mismo grado de madurez. Las muestras se congelaron a -80 °C, se liofilizaron durante 72 h a -84 °C y 0,060 mbar en un liofilizador (Labconco, modelo FreeZone 2,5 l, Kansas City, MO, USA). Estas muestras se molieron hasta obtener un polvo fino.

Extracto enzimático (EE): en un tubo eppendorf de 2 ml, se colocaron 200 mg de tejido vegetal liofilizado, se adicionaron 20 mg de polivinil pirrolidona y 1,5 ml de buffer de fosfatos pH 7-7,2 (0,1 M), se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min a 4 °C en una microcentrífuga (Labnet Int. Inc., modelo Prism™ R). El sobrenadante se recolectó y filtró con una membrana de PVDF de 0,45 micras de poro (Ramos et al., 2010). Con el EE se determinaron todas las variables evaluadas.

Antioxidantes enzimáticos

Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6): se cuantificó su actividad al medir dos tiempos de reacción, tiempo 0 (T0) y tiempo 1 (T1), por el método espectrofotométrico (Cansev et al., 2011). La reacción se realizó a 20 °C bajo agitación constante, el consumo de H₂O₂ se leyó a 270 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (ÚNICO, modelo 2150, Dayton, USA). La diferencia de las absorbancias se interpoló en la ecuación de la curva de calibración realizada con H₂O₂ (20 a 200 mM). Los resultados se reportaron como actividad específica (U mg⁻¹ proteínas).

Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1): la prueba de superóxido dismutasa se realizó con el kit de Cayman superoxide dismutase assay (CAYMAN CHEMICAL, 2017). En una microplaca se agregó por pocillo: 10 µl de EE,

200 μl del radical detector, 20 μl de xantina oxidasa, se agitó durante 5 s y se cubrió la microplaca para incubar por 30 min a temperatura ambiente (26 °C), enseguida se determinó la absorbancia en el lector de microplacas (Biotek, modelo ELx808™) a 450 nm. Las absorbancias obtenidas se interpolaron en la ecuación de la curva de calibración realizada con SOD (0,0 a 0,050 U ml^{-1}). Se reportó como actividad específica (U mg^{-1} proteínas).

Glutación peroxidasa (GPX) (E.C. 1.11.1.9): se determinó con la metodología propuesta por Flohé & Günzler (1984), modificada por Xue et al. (2001), con H_2O_2 como sustrato. Se determinaron las absorbancias en un espectrofotómetro UV-VIS (ÚNICO, modelo 2150, Dayton, USA) a 412 nm y estas se interpolaron en la ecuación de la curva de calibración realizada con GSH (0,02 a 1 mM). Se reportó como actividad específica (U mg^{-1} proteínas).

Ascorbato peroxidasa (APX) (E.C. 1.11.1.11): se midió en dos tiempos T0 (Tiempo inicial) y T1 (Tiempo un minuto de reacción) de acuerdo a Nakano & Asada (1987). Se reportó como actividad específica (U mg^{-1} proteínas).

Fenilalanina amonio liasa (PAL) (E.C. 4.3.1.5): se determinó de acuerdo con Sykłowska-Baranek et al. (2012). Se determinó absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (ÚNICO, modelo 2150, Dayton, USA). Las absorbancias se interpolaron en la ecuación obtenida de la curva de calibración con ácido transcinámico (0,01-0,8 mg ml^{-1}). Los resultados se reportaron como actividad específica (U mg^{-1} proteínas).

Antioxidantes no enzimáticos

Glutación reducido (GSH): se cuantificó según la metodología establecida por Xue et al. (2001), mediante la reacción con DTNB [ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)]. Se determinaron las absorbancias en un espectrofotómetro UV-VIS (ÚNICO, modelo 2150, Dayton, USA) a 412 nm y estas se interpolaron en la ecuación de la curva de calibración realizada con GSH (0,02 a 1 mM). Los resultados se expresaron en mM de GSH por mg de proteínas totales.

Flavonoides totales: se obtuvieron por el método Dowd, adaptado por Arvouet-Grand et al. (1994). Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (ÚNICO, modelo 2150, Dayton, USA). El contenido total de flavonoides se determinó con una curva de calibración con quercetina (0 a 50 ppm) en metanol, los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de quercetina por 100 gramos de peso seco ($\text{mg EQ } 100 \text{ g}^{-1}$ PS).

Fenoles totales (FT): se determinaron según la metodología propuesta por Singleton et al. (1999). Se obtuvieron absorbancias en un espectrofotómetro UV-VIS (ÚNICO, modelo 2150, Dayton, USA) a 750 nm; estas se interpolaron en la ecuación obtenida de la curva de calibración con ácido gálico (1-12,5 ppm), los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de peso seco ($\text{mg EAG } 100 \text{ g}^{-1}$ PS).

Capacidad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante por DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)]. Para ello, se utilizó la metodología propuesta por Sykłowska-Baranek et al. (2012). Las absorbancias se obtuvieron en el Lector de Microplacas (Biotek, Modelo ELx808™) a 540 nm. La determinación de antioxidantes por ABTS ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4$) se realizó por el método espectrofotométrico de Miller et al. (1993); se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (ÚNICO, modelo 2150, Dayton, USA) a 754 nm. Las absorbancias se interpolaron en las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración realizadas con TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$) y ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) con estándares, a una concentración de 0,1 a 5 mM y 0,01 a 0,5 mg ml^{-1} , respectivamente.

Análisis estadístico

El diseño experimental empleado fue completamente al azar con un total de cinco repeticiones. Una planta se consideró como unidad de muestreo y cada repetición se conformó de dos unidades de muestreo. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias según la prueba LSD de Fisher ($p \leq 0,05$) con el programa estadístico InfoStat (Di-Rienzo et al., 2008).

Resultados

Antioxidantes enzimáticos

A los 15 ddt, se encontró diferencia estadística en la actividad de la catalasa (CAT), el tratamiento AFA presentó la mayor actividad, mientras que los tratamientos AFAD, AF y Cmm, la menor (Cuadro 1). En el segundo muestreo, a los 31 ddt, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. A los 92 ddt hubo diferencias significativas, el tratamiento Cmm fue el que presentó mayor actividad de esta enzima un 264 % más que el T0. En fruto (90 ddt), no hubo diferencias significativas.

En el primer y segundo muestreo (15 y 31 ddt), los tratamientos no mostraron diferencias significativas en la actividad enzimática específica de la superoxidasa dismutasa (SOD) (Cuadro 1). A los 92 ddt los tratamientos AFD y AFAD presentaron la mayor actividad SOD en un 72,6 y 77,9 % más que el T0. La aplicación de ácidos fenólicos al igual que la inoculación con Cmm incrementó la actividad SOD en hojas, este incremento fue mayor cuando las aplicaciones de AF se hicieron en plantas inoculadas con Cmm, así, el patógeno y los ácidos fenólicos activaron los mecanismos de defensa antioxidante. En frutos (90 ddt), los tratamientos provocaron diferencias estadísticas en la actividad enzimática. La aplicación de AF redujo la actividad de la enzima SOD en un 54 % con respecto al T0; inocular las plantas con Cmm, también redujo la actividad SOD en un 45,1 %, pero cuando las aplicaciones de AF se hicieron a plantas inoculadas con Cmm la actividad SOD aumentó.

A los 15 y 31 ddt no se encontraron diferencias significativas en la actividad de glutatión peroxidasa (GPX) (Cuadro 1). El tratamiento AFD provocó 209,7 % más actividad de glutatión peroxidasa (GPX) que el T0 a los 92 ddt. Lo anterior, posiblemente, se debió a que los ácidos fenólicos se asperjaron a estas plantas después de la inoculación con *C. michiganensis*, lo cual generó plantas más estresadas. En fruto, la aplicación de ácidos fenólicos redujo la actividad de GPX en los tratamientos AFAD, AFD, AF y AFA en un 29,9, 31,9, 36,4 y 37,8 %, respectivamente, con respecto al T0.

La actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa (APX) mostró diferencias significativas en la medición realizada a los 15 ddt (Cuadro 1). Los tratamientos con aplicación de ácidos fenólicos presentaron menor actividad APX en un 67,3 % (AFA) y 71,5 % (AFAD, AF y Cmm) con respecto al T0. Con estos resultados se puede inferir que la actividad de la enzima APX no fue modificada significativamente por *Clavibacter michiganensis*, ni por aplicaciones de ácidos fenólicos.

La actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) determinada en el primer muestreo (15 ddt) no mostró diferencias significativas (Cuadro 1). A los 31 ddt, el tratamiento Cmm provocó la mayor actividad PAL con 288,4 % más que el T0. A los 92 ddt el tratamiento, Cmm presentó 338,4 % más actividad PAL que el T0. En frutos, los tratamientos no provocaron diferencias significativas. En el segundo muestreo (15 ddt) la aplicación de ácidos fenólicos, antes y después de la inoculación con Cmm, redujo la actividad PAL; en el tercer muestreo (92 ddt) la aplicación de ácidos fenólicos antes de la inoculación con Cmm redujo la actividad PAL.

Cuadro 1. Actividad de antioxidantes enzimáticos en hojas y frutos de tomate variedad Río Fuego (*Solanum lycopersicum* Mill.), con aplicaciones de ácidos fenólicos. Laboratorio de biología molecular, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, 2016.

Table 1. Activity of enzymatic antioxidants in leaves and fruits of tomato variety Río Fuego (*Solanum lycopersicum* Mill.), with applications of phenolic acids. Molecular Biology Laboratory, Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, Mexico, 2016.

Tratamiento	CAT (Catalasa) (U proteínas ⁻¹)			
	15 ddt (hoja)	31 ddt (hoja)	92 ddt (hoja)	90 ddt (fruto)
T0	443,7ab±279,0	459,2a±713,8	173,5b±196,8	449,9a±231,4
AFA	612,9a±343,5	266,4a±305,3	172,1b±83,7	340,7a±235,1
AFD	443,7ab±279,0	185,9a±127,8	98,7b±48,9	482,4a±381,1
AFAD	131,9b±111,2	158,6a±60,7	89,8b±66,5	560,3a±103,1
AF	131,9b±111,2	85,8a±27,6	152,5b±96,7	431,7a±149,8
Cmm	443,7ab±279,0	121,4a±57,3	631,7a±341,3	447,8a±57,9
SOD (Superóxido dismutasa) (U proteínas ⁻¹)				
TO	523,3a±157,2	514,1a±233,6	343,9b±74,8	564,7a±53,5
AFA	500,2a±148,9	652,2a±321,8	504,1ab±204,7	457,0ab±127,3
AFD	523,3a±157,2	787,0a±179,8	593,6a±102,5	432,1bc±121,6
AFAD	425,2a±67,5	851,5a±248,4	612,1a±119,8	333,1bcd±63,3
AF	425,2a±67,5	587,4a±272,8	470,1ab±291,6	259,4d±65,2
Cmm	523,3a±157,2	794,0a±283,8	371,3ab±44,0	309,6cd±43,8
GPX (Glutación peroxidasa) (U proteínas ⁻¹)				
TO	1,65a±0,6	9,67a±7,6	10,16b±8,3	7,47a±0,6
AFA	2,63a±1,0	9,44a±7,0	13,21b±5,3	4,64b±1,3
AFD	1,65a±0,6	7,21a±9,7	31,47a±8,5	5,08b±1,7
AFAD	2,21a±1,5	13,00a±6,9	12,71b±6,2	5,23b±0,9
AF	2,21a±1,5	10,90a±2,4	7,62b±6,1	4,75b±0,8
Cmm	1,65a±0,6	10,35a±9,4	15,80b±12,1	7,26a±0,6
APX (Ascorbato peroxidasa) (U proteínas ⁻¹)				
TO	18,27a±11,0	11,04a±2,8	6,97a±4,1	6,86a±2,1
AFA	5,96b±2,6	11,70a±6,4	13,14a±5,9	8,88a±1,8
AFD	18,27a±11,0	11,08a±5,4	12,84a±2,2	8,08a±1,1
AFAD	5,19b±1,5	9,48a±5,6	12,49a±6,3	7,41a±3,6
AF	5,19b±1,5	8,59a±6,4	9,13a±5,3	5,88a±1,0
Cmm	18,27a±11,0	14,17a±6,7	9,78a±6,8	9,00a±4,2
PAL (Fenilalanina Amonio Liasa) (U proteínas ⁻¹)				
TO	9,60a±1,2	8,97c±3,1	5,72b±3,6	11,60a±10,0
AFA	6,07a±6,4	19,69abc±12,5	5,50b±2,1	11,83a±6,9
AFD	9,60a±1,2	19,00abc±13,6	12,24ab±5,4	9,55a±2,4
AFAD	5,40a±5,2	13,30bc±7,8	14,02ab±13,2	7,80a±3,1
AF	5,40a±5,2	27,20ab±9,3	8,46b±7,6	7,43a±2,6
Cmm	9,60a±1,2	34,84a±19,9	25,08a±13,6	9,27a±2,9

ddt: días después del trasplante. T0: testigo absoluto. AFA: aplicación de ácidos fenólicos antes de inocular *Clavibacter michiganensis*. AFD: aplicación de ácidos fenólicos después de inocular *Clavibacter michiganensis*. AFAD: aplicación de ácidos fenólicos antes y después de inocular *Clavibacter michiganensis*. AF: solo aplicación de ácidos fenólicos. Cmm: solo inoculación con *Clavibacter michiganensis*. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo con la prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$). / ddt: days after transplantation. T0: absolute witness. AFA: application of phenolic acids before inoculating *Clavibacter michiganensis*. AFD: application of phenolic acids after inoculating *Clavibacter michiganensis*. AFAD: application of phenolic acids before and after inoculating *Clavibacter michiganensis*. AF: application of phenolic acids only. Cmm: only inoculation with *Clavibacter michiganensis*. Different letters in the same column indicate significant differences between the treatments according to the LSD Fisher test ($p \leq 0,05$).

Antioxidantes no enzimáticos

A los 15 y 92 ddt (Cuadro 2) los tratamientos no provocaron diferencias en la concentración de glutatión reducido (GSH) en hojas. A los 31 ddt el tratamiento AF (solo aplicación de ácidos fenólicos) incrementó en un 58,2 % la concentración de la GSH con respecto al T0. En frutos, los tratamientos provocaron diferencias en la concentración de glutatión reducido, los tratamientos AFA y AF provocaron la mayor y la menor concentración, respectivamente.

Cuadro 2. Contenido de antioxidantes no enzimáticos en hojas y frutos de tomate variedad Río Fuego (*Solanum lycopersicum* Mill.), con aplicaciones de ácidos fenólicos. Laboratorio de biología molecular, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, 2016.

Table 2. Content of non-enzymatic antioxidants in leaves and fruits of tomato variety Río Fuego (*Solanum lycopersicum* Mill.), with applications of phenolic acids. Molecular Biology Laboratory, Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, Mexico, 2016.

GSH (glutatión reducido) (mM de GSH por mg de proteínas totales)				
Tratamiento	15 ddt (Hoja)	31 ddt (Hoja)	92 ddt (Hoja)	90 ddt (Fruto)
T0	2,38a±0,5	2,42b±0,7	2,98a±0,7	0,82abc±0,3
AFA	1,99a±0,5	2,05b±0,4	2,94a±0,9	1,17a±0,4
AFD	2,38a±0,5	2,37b±0,5	2,60a±0,4	0,76bc±0,2
AFAD	2,74a±1,0	2,43b±0,5	2,33a±0,6	0,77bc±0,2
AF	2,74a±1,0	3,83a±1,9	2,55a±0,4	0,61c±0,1
Cmm	2,38a±0,5	2,90ab±0,8	3,38a±1,4	1,06ab±0,1
Flavonoides (mg EQ 100 g ⁻¹ PS)				
TO	344,6b±33,5	361,5b±63,8	472,4ab±84,4	107,0a±34,3
AFA	408,2a±10,3	400,6ab±91,6	372,3cd±50,8	126,0a± 51,3
AFD	344,6b±33,5	481,1a±131,6	286,5d±83,9	122,6a±2,9
AFAD	377,7ab±25,4	366,4ab±27,6	451,1bc±60,1	129,3a±29,8
AF	377,7ab±25,4	340,2b±18,7	413,3bc±62,1	126,2a±34,0
Cmm	344,6b±33,5	349,0b±81,4	559,0a±7,2	134,3a±46,9
Fenoles totales (mg EAG 100 g ⁻¹ PS)				
TO	160,5a±7,8	238,5a±8,8	218,1ab±22,3	133,5a±43,7
AFA	143,0a±21,2	221,9ab±20,1	204,8ab±23,6	156,2a±24,8
AFD	160,5a±7,8	211,2ab±20,0	224,2a±37,4	83,4b±28,3
AFAD	133,5a±28,1	190,7b±19,2	194,4ab±3,7	62,7b±5,0
AF	133,5a±28,1	216,4ab±15,4	190,8b±19,1	66,0b±4,9
Cmm	133,5a±7,8	207,3ab±54,7	193,8ab±12,9	70,6b±2,9

ddt: días después del trasplante. T0: testigo absoluto. AFA: aplicación de ácidos fenólicos antes de inocular *Clavibacter michiganensis*. AFD: aplicación de ácidos fenólicos después de inocular *Clavibacter michiganensis*. AFAD: aplicación de ácidos fenólicos antes y después de inocular *Clavibacter michiganensis*. AF: solo aplicación de ácidos fenólicos. Cmm: solo inoculación con *Clavibacter michiganensis*. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo con la prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$). / ddt: days after transplantation. T0: absolute witness. AFA: application of phenolic acids before inoculating *Clavibacter michiganensis*. AFD: application of phenolic acids after inoculating *Clavibacter michiganensis*. AFAD: application of phenolic acids before and after inoculating *Clavibacter michiganensis*. AF: application of phenolic acids only. Cmm: only inoculation with *Clavibacter michiganensis*. Different letters in the same column indicate significant differences between the treatments according to the LSD Fisher test ($p \leq 0,05$).

A los 15 ddt (Cuadro 2) la aplicación de ácidos fenólicos promovió en las hojas un mayor contenido de flavonoides totales, ya que el tratamiento AFA provocó 18,4 % más concentración de flavonoides que el T0. A los 31 ddt, el tratamiento AFD provocó 33 % más concentración de flavonoides que el T0, sin embargo, este mismo tratamiento a los 92 ddt provocó el menor contenido de flavonoides (39,3 % menos que el tratamiento testigo). En frutos, la aplicación de ácidos fenólicos no provocó cambios en la concentración de flavonoides totales.

A los 15 ddt no se encontraron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales (FT) (Cuadro 2). En el segundo muestreo (31 ddt), el T0 fue diferente al tratamiento AFAD, tratamiento que presentó 20 % menos contenido de FT que el T0. A los 92 ddt hubo diferencias significativas entre los tratamientos, AFD y AF presentaron el mayor y menor contenido de FT, respectivamente; el T0 no mostró diferencia estadística con respecto al resto de los tratamientos. En frutos, los tratamientos provocaron diferencias significativas; AFD, Cmm, AF y AFAD, presentaron 37,5, 47,1, 50,5 y 53 %, menos concentración de FT respectivamente con relación al T0.

Capacidad antioxidante

En el primer muestreo (15 ddt), se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante ABTS; los tratamientos AFAD, AF, y Cmm presentaron mayor capacidad antioxidante que el tratamiento T0 (Cuadro 3). En muestreos realizados en hoja a los 31 y 92 ddt y en fruto (90 ddt) el T0 no mostró diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos, sin embargo, en el segundo muestreo (15 ddt) AFA y AF presentaron mayores valores que AFAD. En el tercer muestreo (92 ddt), Cmm presentó mayor capacidad antioxidante ABTS que AFAD y en el muestreo de frutos (90 ddt), AF presentó mayores valores que AFAD, lo anterior muestra que la menor capacidad antioxidante ABTS se registró en el tratamiento AFAD. En la capacidad antioxidante por DPPH, se observó que en todos los muestreos los tratamientos provocaron diferencias estadísticas (Cuadro 3). A los 15 ddt, la aplicación de ácidos fenólicos aumentó la capacidad antioxidante, lo anterior se observó en el tratamiento AFA, el cual presentó mayor capacidad antioxidante DPPH que el T0. A los 31 ddt AFAD presentó mayor capacidad antioxidante DPPH que los tratamientos AFD y Cmm. En el tercer muestreo (92 ddt), los tratamientos AFD y AFAD presentaron mayor capacidad antioxidante que el T0. En frutos AF y Cmm presentaron mayor capacidad antioxidante que los tratamientos AFD y AFAD, sin embargo, T0 no fue diferente a ningún tratamiento.

Discusión

La mayor actividad de la enzima catalasa se observó en frutos y en el segundo muestreo en las hojas, lo cual se debió al estrés de las plantas ocasionado por la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. La enzima SOD proporciona a las plantas protección contra las ROS, especies que se forman ante condiciones de estrés biótico y abiótico (Feng et al., 2015). Lo anterior evidencia el papel de los ácidos fenólicos como señalizadores de estrés, ya que al aplicar AF la actividad SOD en hoja incrementó, no hubo el mismo efecto en frutos. La enzima SOD representa la línea primaria de control del estrés oxidativo (Gill & Tuteja, 2010); transforma el O₂ en H₂O₂ y, las enzimas ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa y catalasa, lo detoxifica y reduce a H₂O (Asada, 2006). El T0 presentó la mayor actividad SOD en fruto y la menor actividad en hoja. Según los datos anteriores, se puede inferir que los ácidos fenólicos funcionan como señalizadores que activan el mecanismo de defensa antioxidante de la planta.

Los tratamientos T0 y Cmm presentaron la mayor actividad GPX en frutos. En hojas la actividad de esta enzima aumentó conforme pasaban los días y, conforme la planta crecía, las ROS también aumentaron, ya que son subproductos normales de varias vías metabólicas en la planta (Navrot et al., 2007). Una mayor concentración de GPX significa una mayor tolerancia contra el estrés, debido a su capacidad de eliminar ROS (Herbette et al., 2011);

Cuadro 3. Capacidad antioxidante determinada por ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)] y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), en hojas y frutos de tomate variedad Río Fuego (*Solanum lycopersicum* Mill.), con aplicaciones de ácidos fenólicos. Laboratorio de biología molecular, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, 2016.

Table 3. Antioxidant capacity determined by ABTS [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid)] and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) in leaves and fruits of tomato variety Río Fuego (*Solanum lycopersicum* Mill.), with applications of phenolic acids. Molecular Biology Laboratory, Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, Mexico, 2016.

Trata- miento	ABTS							
	15 ddt (hoja)		31 ddt (hoja)		92 ddt (hoja)		90 ddt (fruto)	
	TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC	TEAC	VCEAC
TO	42,0b±3,9	340,7b±134,2	52,4ab±11,7	696,6ab±399,3	58,2ab±2,3	894,6ab±80,0	35,1ab±3,3	137,8ab±46,8
AFA	43,1b±4,1	378,4b±141,5	55,6a±1,4	805,3a±46,5	61,4ab±5,7	1004,5ab±195,9	34,6ab±2,1	129,1ab±26,2
AFD	42,0b±3,9	340,7b±134,2	49,1ab±6,7	585,6ab±228,6	59,3ab±15,2	933,5ab±519,2	34,8ab±2,6	132,3ab±33,1
AFAD	50,0a±5,0	616,5a±170,7	41,0b±2,8	307,5b±97,0	48,2b±14,2	553,6b±493,9	31,8b±1,7	97,2b±17,7
AF	50,0a±5,0	616,5a±170,7	53,4a±11,0	731,0a±376,9	53,5ab±8,0	734,4ab±272,2	40,2a±7,8	227,3a±148,8
Cmm	42,0b±3,9	340,7b±134,2	49,5ab±9,0	598,2ab±308,6	69,9a±19,4	1295,2a±664,4	35,2ab±1,1	136,3ab±14,4
	DPPH							
TO	46,8c±1,2	409,6c±56,4	45,3ab±4,7	342,2ab±213,7	34,0c±2,5	219,2c±112,9	25,6ab±4,2	393,7ab±190,8
AFA	55,8a±3,4	821,9a±157,0	45,9ab±8,8	369,9ab±402,4	38,6ab±0,4	433,3ab±20,5	26,3ab±3,1	425,4ab±142,4
AFD	46,8c±1,2	409,6c±56,4	40,7b±1,8	132,0b±82,4	41,7a±3,1	572,1a±141,5	21,8b±4,2	219,2b±193,4
AFAD	52,2b±2,6	658,0b±117,5	56,7a±20,9	865,5a±955,6	40,3a±2,0	508,7a±93,7	22,2b±1,0	235,1b±46,7
AF	52,2b±2,6	658,0b±117,5	53,0ab±9,8	695,0ab±449,1	36,3bc±2,2	326,3bc±103,1	30,1a±4,0	599,9a±184,0
Cmm	46,8c±1,2	409,6c±56,4	41,2b±3,3	155,8b±149,3	34,6c±1,8	227,2c±92,0	28,5a±3,1	524,5a±141,5

ddt: días después del trasplante. TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente Trolox. VCEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente Vitamina C. ddt: días después del trasplante. T0: testigo absoluto. AFA: aplicación de ácidos fenólicos antes de inocular *Clavibacter michiganensis*. AFD: aplicación de ácidos fenólicos después de inocular *Clavibacter michiganensis*. AFAD: aplicación de ácidos fenólicos antes y después de inocular *Clavibacter michiganensis*. AF: solo aplicación de ácidos fenólicos. Cmm: solo inoculación con *Clavibacter michiganensis*. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo con la prueba LSD Fisher ($p \leq 0,05$). / ddt: days after transplantation. TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. VCEAC: Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity. ddt: days after transplantation. T0: absolute witness. AFA: application of phenolic acids before inoculating *Clavibacter michiganensis*. AFD: application of phenolic acids after inoculating *Clavibacter michiganensis*. AFAD: application of phenolic acids before and after inoculating *Clavibacter michiganensis*. AF: application of phenolic acids only. Cmm: single inoculation with *Clavibacter michiganensis*. Different letters in the same column indicate significant differences between the treatments according to the LSD Fisher test ($p \leq 0,05$).

Por lo anterior, se puede afirmar que la actividad de GPX aumentó bajo condiciones de estrés, tal como lo informó Diao et al. (2014), al evaluar plantas de arroz bajo diferentes tipos de estreses.

APX es una de las principales enzimas que eliminan ROS en cloroplastos y citosol de células vegetales (Asada, 2000; Ozyigit et al., 2016). En este trabajo no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos por actividad de la enzima APX, por lo tanto, estos resultados no coincidieron con lo informado por Ozyigit et al. (2016), quienes afirmaron que plantas estresadas presentaron mayor concentración de APX, ya que la enzima juega un papel clave al catalizar la conversión de H_2O_2 en H_2O monodeshidroascorbato (Asada, 2000).

La mayor actividad de PAL en el segundo y tercer muestreo en hoja, coincidió con lo reportado por Pérez et al. (2015) quienes evaluaron la enzima PAL bajo condiciones de estrés biótico, también fue similar a lo informado por Flores-Torres et al. (2017), quienes afirmaron que la actividad de la enzima PAL aumentó bajo condiciones de estrés por ataque de algún patógeno. Lo anterior se debió a que la enzima PAL se encuentra involucrada en la vía de los fenilpropanoides, que intervienen en la deposición de compuestos fenólicos en las paredes celulares (van-

Loon et al., 2006). Incrementos en la actividad PAL permiten suponer que la planta se prepara contra el avance de un patógeno (Pérez et al., 2015).

La alta concentración de GSH en las hojas del tercer muestreo, se debieron a que esta enzima interviene en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Dubreuil-Maurizi & Poinssot, 2012). El GSH proporciona las bases para iniciar la señalización de estrés y, una elevada concentración de GSH, se correlaciona con la capacidad de las plantas para resistir el estrés oxidativo, por lo cual, en el tercer muestreo, se asumió que las plantas se encontraron más preparadas ante un estrés (Wang et al., 2004). Los flavonoides son antioxidantes no enzimáticos cuya síntesis y concentración incrementa en plantas que crecen bajo condiciones de estrés (Appel & Hirt, 2004). La importancia de estos compuestos, se debe a que pueden actuar como eliminadores de ROS y dan protección contra las tensiones bióticas y abióticas (Shi et al., 2015). Lo anterior concuerda con lo observado a los 92 ddt, donde la inoculación del patógeno incrementó el contenido de flavonoides, en este mismo muestreo, la aplicación de ácidos fenólicos redujo el contenido de flavonoides en los tratamientos con estrés biótico, prueba de esto se observó en los tratamientos AFAD, AFA y AFD, con 19,3, 33,3 y 48,7 % menos contenido de flavonoides que el tratamiento Cmm. Esta reducción se debió a que algunos ácidos fenólicos actúan como toxinas contra ciertos patógenos, reducen el nivel de estrés en la planta y, como consecuencia, la concentración de flavonoides (Maham et al., 2018).

En este estudio no se observó una tendencia en la concentración de compuestos fenólicos en las diferentes fechas de muestreo, lo cual se debió a que los niveles de los compuestos fenólicos en la planta dependen más de factores externos que de los mismos tratamientos, tal como lo mencionaron Márquez-García et al. (2009), que los niveles de los compuestos fenólicos en las plantas, dependen del momento de muestreo y de las condiciones del ambiente. Diversos autores reportan que los compuestos fenólicos se encuentran asociados al sistema de protección antioxidante, ya que hay un incremento en la producción y contenido de estos compuestos ante factores de estrés biótico y abiótico (Treutter, 2008).

En las hojas se encontró mayor actividad antioxidante que en los frutos, debido a que en las hojas hay un mayor número de cloroplastos, en los cuales se realiza la fotosíntesis, proceso que genera ROS (Blanke & Lenz, 1989). La actividad antioxidante se correlaciona con el contenido de compuestos fenólicos, tal como lo reportaron Edet et al. (2015), que los valores de antioxidantes en frutos (Hidrofílicos) se correlacionaron significativamente con el contenido de flavonoides, compuestos fenólicos y ácido ascórbico. Con esta información se puede inferir que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante.

Conclusiones

La inoculación de las plantas de tomate con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, incrementó la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y catalasa (CAT) en el tercer muestreo (92 ddt); lo anterior indica que se activó el sistema de defensa antioxidante enzimático por efecto del estrés biótico, mientras que al aplicar ácidos fenólicos a estas plantas la actividad de las enzimas PAL y CAT disminuyó en las hojas.

Al inocular la bacteria Gram positiva *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en los frutos de tomate, hubo reducción de la actividad enzimática del superóxido dismutasa y en el contenido de fenoles totales. La aplicación de ácidos fenólicos no intervino en estas concentraciones, solo cuando se realizó de manera preventiva, con el tratamiento de ácidos fenólicos antes de inocular *Clavibacter*. Lo anterior indica que los ácidos fenólicos intervinieron en los mecanismos de defensa enzimáticos de la planta y redujeron los niveles de estrés ocasionados por la inoculación de *C. michiganensis*.

Referencias

- Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M. L., & Aquino-Martínez, J. G. (2017). Inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(2), 170–185. <http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1611-1>
- Appel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Lergret, P. (1994). Standardisation dun extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49(6), 462–468.
- Asada, K. (1999). The water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601–639. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>
- Asada, K. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions Royal Society London B Biological Science*, 355(1402), 1419–1431. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0703>
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141, 391–396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Baraldi, R., Bertazza, G., Fontana, A. R., Murcia, G., Pontin, M. A., & Piccoli, P. N. (2017). ABA and GA3 regulate the synthesis of primary and secondary metabolites related to alleviation from biotic and abiotic stresses in grapevine. *Phytochemistry*, 135, 34–52. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.12.007>
- Bellaloui, N. (2012). Soybean seed phenol, lignin, and isoflavones partitioning as affected by seed node position and genotype differences. *Food and Nutrition Sciences*, 3(4), 447–454. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.34064>
- Blanke, M. M., & Lenz, E. (1989). Fruit photosynthesis. *Plant Cell Environment*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1989.tb01914.x>
- Borboa, F. J., Rueda, P. E. O., Acedo, F. E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo, J. O., & García, O. A. M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie michiganensis en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 32(4), 319–326. <http://doi.org/10.35196/rfm.2009.4.319-326>
- Cansev, A., Gulen, H., & Eris, A. (2011). The activities of catalase and ascorbate peroxidase in olive (*Olea europaea* L. Cv. Gemlik) under low temperature stress. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 52(2), 113–120. <https://doi.org/10.1007/s13580-011-0126-4>
- CAYMAN CHEMICAL. (2017). *Superoxide dismutase assay kit item № 706002*. <https://www.caymanchem.com/pdfs/706002.pdf>
- Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., Sanchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M. M., Romero, L., & Ruiz, J. M. (2012). Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants. *Journal of Botany*, 2012, Article 726206. <https://doi.org/10.1155/2012/726206>

- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22(1), 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0261\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261(02)00095-9)
- Diao, Y., Xu, H., Li, G., Yu, A., Yu, X., W. Hu., Zheng, X., Li, S., Wang, Y., & Hu, Z. (2014). Cloning a glutathione peroxidase gene from *Nelumbo nucifera* and enhanced salt tolerance by overexpressing in rice. *Molecular Biology Reports*, 41, 4919–4927. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3358-4>
- Di-Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2008). *InfoStat versión 2008*. Universidad Nacional de Córdoba. <https://www.infostat.com.ar/>
- Dubreuil-Maurizi, C., & Poinssot, B. (2012). Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 7(2), 210–212. <https://doi.org/10.4161/psb.18831>
- Edet, E. E., Ofem, J. E., Igile, G. O., Ofem, O. E., Zainab, D. B., & Akwaowo, G. (2015). Antioxidant capacity of different African seeds and vegetables and correlation with the contents of ascorbic acid, phenolics and flavonoids. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(13), 454–461. <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5660>
- Feng, X., Lai, Z., Lin, Y., Lai, G., & Lian, C. (2015). Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao (AAA group). *BMC Genomics*, 16(823), 2–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2046-7>
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114–120. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1)
- Flores-Torres, L. M., Flores-Olivas, A., Ochoa-Fuentes, Y. M., López -Arroyo, J. I., Olalde-Portugal, V., Benavides-Mendoza, A., González-Morales, S., & Zamora-Villa, V. M. (2017). Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(2), 314–325. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1608-2>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment*, 29, 1056–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>
- Gartemann, K. H., Kirchner O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2–3), 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.011>
- Gaviria, M. C., Hernández, A. J., Lobo, A. M., Medina, C. C., & Rojano, B. (2012). Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) durante su desarrollo y maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1), 6487–6495. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472012000100019.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Herbette, S., Labrouhe, D. T., Drevet, J. R., & Roeckel-Drevet, P. (2011). Transgenic tomatoes showing higher glutathione peroxidase antioxidant activity are more resistant to an abiotic stress but more susceptible to biotic stresses. *Plant Science*, 180(3), 548–553. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.12.002>

- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Lu, L., Wang, J., Zhu, R., Lu, H., Zheng, X., & Yu, T. (2015). Transcript profiling analysis of *Rhodosporidium paludigenum* mediated signaling pathways and defense responses in mandarin orange. *Food Chemistry*, *172*, 603–612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.097>
- Maddox, C. E., Laur, L. M., & Tian, L. (2010). Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, *60*(1), 53–58. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9501-0>
- Maham, S., Muhammad, K., & Muhammad, S. (2018). Differential responses of plants to biotic stress and the role of metabolites. In P. Ahmad, M. Abass, V. Pratap, D. Kumar, P. Alam, & M. Nasser (Eds.), *Plant metabolites and regulation under environmental stress* (pp. 69–87). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00004-2>
- Marquéz-García, B., Fernández, M. Á., & Córdoba, F. (2009). Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *Bioresource Technology*, *100*(1), 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.070>
- Mendoza, L., K. Yáñez, K., Vivanco, M., Melo, R., & Cotoras, M. (2013). Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products*, *43*, 360–364. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.048>
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, *15*(4), 523–530.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, *84*, 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Breusegem, F. V. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, *9*(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, *28*(1), 131–140. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077268>
- Navrot, N., Roubier, N., Gelbaye, E., & Jacquot, J. P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, *129*, 185–195. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x>
- Ozyigit, I. I., Filiz, E., Vatansever, R., Kurtoglu, K. Y., Koc, I., Öztürk, M. X., & Anjum, N. A. (2016). Identification and comparative analysis of H₂O₂-scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase) in selected plants employing bioinformatics approaches. *Frontiers in Plant Science*, *7*, Article 301. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00301>
- Pérez, E., de-la-Noval, B. M., Martínez, B., Torres, W., Medina, A., Hernández, A., & León, O. (2015). Inducción de mecanismos de defensa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) micorrizadas frente al ataque de *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salm. *Cultivos Tropicales*, *36*(1), 98–106. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000100013
- Pignocchi, C., Fletcher, J. M., Wilkinson, J. E., Barnes, J. D., & Foyer, C. H. (2003). The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology*, *132*(3), 1631–1641. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022798>

- Ramos, S. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Castro, E. M., Ávila, F. W., Carvalho, G. S., Bastos, C. E. A., & Oliveira, C. (2010). Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant Soil and Environment*, 56(12), 584–588. <https://doi.org/10.17221/113/2010-PSE>
- Rueda-Barrientos, M. C., Martínez-Fernández, E., Villegas-Torres, O. G., Sainz-Aispuro, M. J., Peña-Chora, G., Hernández-Velazquez, V. M., & Hernández-Romano, J. (2017). Sensibilidad de la prueba de InmunoStrips® en la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 3(2), 50–57. <https://doi.org/10.30973/aap/2017.3.2/4>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). *Atlas Agroalimentario 2017*. http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017
- Shi, J. X., Cui, M. H., Yang, L., Kim, Y. J., & Zhang, D. B. (2015). Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. *Trends in Plant Science*, 20(11), 741–753. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.07.010>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Steiner, A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*, 15(2), 134–154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., & Naliwajski, M. R. (2012). Effect of l-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 48(5), 555–564. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9443-2>
- Treutter, D. (2008). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7(6), 581–591. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873009>
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidilitz, H. K., Zabeau, M., Van-Montagu, M., Inze, D., & Van-Breusegem, F. (2004). Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 39(1), 45–58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02105.x>
- van-Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Xu, G., Ye, X., Liu, D., Ma, Y., & Chen, J. (2008). Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. *Changshanhuoyou*) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.003>
- Xue, T., Hartikainen, H., & Piironen, V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*, 237(1), 55–61. <https://doi.org/10.1023/A:1013369804867>
- Wang, B., Lüttge, U., & Ratajczak, R. (2004). Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C3, halophyte *Suaeda salsa* L. *Journal of Plant Physiology*, 161(3), 285–293. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01123>
- Wang, X., Fang, G., & Yang, J. (2017). A thioredoxin-dependent glutathione peroxidase (OsGPX5) is required for rice normal development and salt stress Tolerance. *Plant Molecular Biology Reporter*, 35, 333–342. <https://doi.org/10.1007/s11105-017-1026-2>
- Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. (2018). Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con *Clavibacter michiganensis*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Esp.*(20), 4367–4379. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.1005>