



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DE LOS
FENILPROPANOIDES EN FRUTOS DE TOMATE EN
RESPUESTA A OLIGÓMEROS DE QUITINA DE *Alternaria*
*alternata***

Por:

Mary Concepción Vega Luna

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Mary Concepción Vega Luna la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias



Dra. Rosalba Troncoso Rojas
Directora de Tesis



Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández
Integrante del Comité de Tesis



Dr. Alberto Sánchez Estrada
Integrante del Comité de Tesis



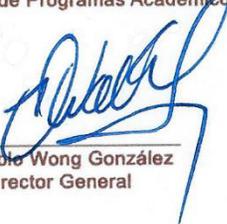
Dra. Tania Elisa González Soto
Integrante del Comité de Tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Alteraciones en el metabolismo de los fenilpropanoides en frutos de tomate en respuesta a oligómeros de quitina de *Alternaria alternata*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Mary Concepción Vega Luna, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

 **CENTRO DE INVESTIGACION EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por brindarme el apoyo económico durante este posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), por haberme brindado la oportunidad de ingresar a sus instalaciones.

De igual modo, se agradece al CONACyT por el apoyo financiero al proyecto clave CB-287254.

Quiero agradecer de manera especial a cada uno de los miembros de mi comité de tesis. A mi asesora la Dra. Rosalba Troncoso Rojas, por creer en mi desde un principio y apoyarme en cada momento, por toda su atención y paciencia, sobre todo su gran conocimiento, gracias.

Agradezco al Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández por su conocimiento y su apoyo. Al Dr. Alberto Sánchez Estrada por su aporte y apoyo a este proyecto. A la Dra. Tania Elisa González Soto por sus consejos y amabilidad, gracias por su apoyo. Asimismo, quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron durante mi formación académica, investigadores y maestros que me brindaron su conocimiento y me permitieron el uso de equipos.

Por último, a Dios por darme la fe para finalizar este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, por haberme apoyado en el transcurso de este proyecto, por estar siempre para mí en todo momento, gracias por los consejos y por el amor que siempre me han brindado a lo largo del tiempo, los amo infinitamente. A mis hermanos, gracias por los buenos consejos y por su apoyo, en especial a mi hermana Amy, que, a pesar de estar lejos de mí, siempre estuvo al pendiente, acompañándome en todo momento.

A mis amigos, Karla, José, Joel, Luz, Rosy, Francisco, Ana Laura[‡], Orlando, Enis y Ana, gracias por todos los buenos momentos que pasamos juntos, por su apoyo y por su amistad. Jamás los olvidare.

Quiero dedicar este proyecto a una persona especial en mi vida, mi novio Irvin, quien siempre estuvo apoyándome en los momentos más difíciles y en los momentos más lindos, que a pesar de mis corajes y frustraciones siempre fuiste paciente conmigo. Por tu conocimiento y tus consejos, que me sirvieron para seguir adelante, me enseñaste que todo se puede lograr con esfuerzo y dedicación, gracias por todo, te amo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACION INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	155
2.1. Situación Actual del Tomate	15
2.1.1. Importancia del Tomate en México	15
2.1.2. Pérdidas Postcosecha y Enfermedades Fúngicas del Fruto de Tomate	16
2.2. Control de Enfermedades Fúngicas en Tomate.....	19
2.2.1. Inducción de Mecanismo de Defensa en Frutos	19
2.3. Fenilpropanoides y Enzimas que Regulan su Biosíntesis	21
2.4. Moléculas Inductoras del Mecanismo de Defensa: Elicitores.....	23
2.4.1. Quitina y sus Oligosacáridos de Origen Fúngica como Elicitores	24
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo General.....	27
4.2. Objetivos Específicos	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Obtención y Caracterización Parcial de Oligómeros de Quitina Fúngica.....	28
5.1.1. Obtención de Quitina de <i>A. alternata</i>	28
5.1.2. Obtención de Oligómeros de Quitina de Bajo Peso Molecular.....	29
5.1.3. Caracterización Parcial de los Oligómeros de Quitina de Bajo Peso Molecular de <i>A.alternata</i>	29
5.2. Evaluación del Efecto de los Oligómeros de Quitina en la Síntesis de Fenilpropanoides en Frutos de Tomate.....	30
5.2.1. Aplicación Postcosecha de Oligómeros de Quitina Fúngica en Frutos de Tomate.....	30
5.2.2. Determinación de la Actividad Enzimática de Fenilalanina amonio-liasa (PAL).....	31
5.2.3. Determinación del Contenido de Fenoles Totales	31
5.2.4. Determinación del Contenido de Flavonoides.....	32
5.2.5. Determinación del Perfil de Compuestos Fenólicos por HPLC	32
5.3. Evaluación del Efecto de los Oligómeros de Quitina en la Tolerancia del Tomate a la Infección por <i>A. alternata</i>	344

CONTENIDO (continuación)

5.3.1. Medición del Crecimiento de <i>A. Alternata</i> en Frutos de Tomate Infectados por el Hongo y Expuestos a los Oligómeros de Quitina.....	35
5.4. Diseño de Experimentos y Análisis de Datos.....	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1. Caracterización Parcial de los Oligómeros de Quitina.....	40
6.1.1. Contenido de N-acetil glucosamina.....	40
6.1.2. Grado de Acetilación de los Oligómeros de Quitina Fúngica	41
6.1.3. Contenido de Proteína Residual.....	42
6.2. Efecto de los Oligómeros de Quitina en la Síntesis de Fenilpropanoides en Tomate	43
6.2.1. Actividad Enzimática de Fenilalanina amonio-liasa en Tomate en Respuesta a los Oligómeros de Quitina.....	43
6.2.2. Contenido de Fenoles Totales en Tomate en Respuesta a los Oligómeros de Quitina.....	46
6.2.3. Contenido de Flavonoides en Tomate en Respuesta a los Oligómeros de Quitina.....	48
6.2.4. Cambios en el Perfil de Ácidos Fenólicos en Tomate en Respuesta a los Oligómeros de Quitina.....	51
6.2.5. Efecto de los Oligómeros de Quitina en el Perfil de Flavonoides en Tomate.....	55
6.2.6. Control de la Pudrición Negra en Frutos de Tomate Infectados con <i>A. alternata</i> , Mediante Oligómeros de Quitina	58
7. CONCLUSIONES.....	61
8. RECOMENDACIONES.....	62
9. REFERENCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Desarrollo y síntomas de la enfermedad causada por <i>Alternaria</i>	17
2 Morfología de <i>A. alternata</i>	18
3 Lesiones provocadas por <i>A. alternata</i> en frutos de tomate	19
4 Rutas biosintéticas que conducen a la síntesis de los fenilpropanoides en plantas..	21
5 Biomasa de <i>A. alternata</i> obtenida antes y después del tratamiento enzimático.....	39
6 Apariencia general de la quitina obtenida de <i>A. alternata</i>	40
7 Actividad enzimática de fenilalanina amonio-liasa en frutos de tomate expuestos a distintas concentraciones de oligómeros de quitina fúngica [50 µg/mL (F1+INO), y 100 µg/mL (F2+INO)] en relación al tiempo posterior a la exposición..	45
8 Contenido de fenoles totales en frutos de tomate expuestos a distintas a concentraciones de oligómeros de quitina fúngica e inoculados [50 µg/mL (F1+INO), y 100 µg/mL (F2+INO)] en relación al tiempo posterior a la exposición	47
9 Contenido de flavonoides en frutos de tomate expuestos a distintas a concentraciones de oligómeros de quitina fúngica e inoculados con <i>A. alternata</i> . F1+INO: 50 µg/mL oligómeros de quitina fúngica; F2+INO: 100 µg/mL oligómeros de quitina fúngica.....	50
10 Cromatograma de los estándares comerciales de ácidos fenólicos analizados por HPLC.....	51
11 Cromatograma de los ácidos fenólicos detectados en frutos de tomate Testigo, después de 1 h de exposición.....	53
12 Cromatograma de los ácidos fenólicos detectados en frutos de tomate expuestos a 100 µg/mL de oligómeros de quitina e inoculados con <i>A. alternata</i> , después de 1 h de exposición al tratamiento.....	54
13 Cromatograma de los estándares comerciales de flavonoides analizados por HPLC.....	55
14 Cromatograma de los flavonoides detectados en frutos de tomate Testigo, después de 1 h posterior a los tratamientos.....	57
15 Cromatograma de los flavonoides detectados en frutos de tomate expuestos a 100 µg/mL de oligómeros de quitina e inoculados con <i>A. alternata</i> , después de 1 h de exposición al tratamiento.....	57
16 Efecto de los oligómeros de quitina de <i>Alternaria alternata</i> sobre el índice de daños causados por el hongo en frutos de tomate durante 10 días de almacenamiento.....	59

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Elicitores biológicos contra enfermedades fúngicas en tomate.....	24
2	Gradiente de elución para ácidos fenólicos.....	33
3	Gradiente de elución para flavonoides.....	34
4	Escala de daños en frutos de tomate causados por <i>Alternaria alternata</i>	36
5	Características físico-químicas de los oligómeros de quitina fúngica.....	41
6	Actividad enzimática de Fenilalanina amonio-liasa en tomate expuesto a oligómeros de quitina fúngica e inoculados con <i>Alternaria alternata</i>	43
7	Contenido de fenoles totales en frutos de tomate expuestos a oligómeros de quitina fúngica e inoculados con <i>Alternaria alternata</i>	46
8	Contenido de flavonoides en frutos de tomate expuestos a oligómeros de quitina fúngica e inoculados con <i>Alternaria alternata</i>	49
9	Tiempos de retención y coeficientes de regresión de estándares de ácidos fenólicos.....	52
10	Tiempos de retención y coeficientes de regresión de estándares de flavonoides.....	56

RESUMEN

El tomate es un fruto económicamente importante y uno de los más consumidos debido a sus características organolépticas; sin embargo, presenta una corta vida de anaquel y es altamente susceptible al hongo *Alternaria alternata*, causando pérdidas postcosecha importantes. Entre las estrategias propuestas para el control de enfermedades, se encuentra la inducción del mecanismo de defensa de los frutos mediante moléculas elicitoras como la quitina. La quitina, componente importante de la pared celular de los hongos, ha demostrado que estimula el mecanismo de defensa en plantas. Por otra parte, se ha reportado que la activación de la biosíntesis de fenilpropanoides en plantas brinda protección contra patógenos; sin embargo, no hay reportes en la literatura sobre el efecto de los oligómeros de quitina fúngica en la biosíntesis de los fenilpropanoides en frutos. El objetivo del presente estudio es evaluar las alteraciones en el metabolismo de los fenilpropanoides en fruto de tomate, en respuesta a la aplicación de oligómeros de quitina de *A. alternata*. Se prepararon oligómeros de quitina de *A. alternata* mediante tratamiento enzimático, sonicación y ultrafiltración y se caracterizaron por medio de espectrofotometría y conductimetría. Se aplicaron dos concentraciones de oligómeros (50 y 100 $\mu\text{g/mL}$) a frutos de tomate inoculados o no con *A. alternata*. Se determinó la actividad enzimática de fenilalanina amonio-liasa, y el contenido de fenoles totales y flavonoides, así como la capacidad antifúngica de los oligómeros sobre *A. alternata* a distintos tiempos. Se obtuvieron oligómeros de quitina con peso molecular de ≤ 1 kDa, 77% de grado de acetilación y un grado de polimerización estimado de ≤ 5 monómeros. Los oligómeros de quitina indujeron en fruto de tomate un aumento en la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa, en el contenido de fenoles totales y flavonoides durante los primeros minutos posteriores a su aplicación. Se identificaron los ácidos fenólicos: gálico, *p*-hidroxibenzóico y *p*-cumárico, así como los flavonoides: rutina, kaempferol-3-O-rutinósido y naringenina. Los oligómeros de quitina (100 $\mu\text{g/mL}$) indujeron en tomate un aumento en el contenido de rutina y kaempferol-3-O-rutinósido. Además, este tratamiento retardó 2 días el inicio del daño provocado por *A. alternata* y redujo el 70% el desarrollo de la pudrición negra en fruto de tomate. Se concluye que los oligómeros de quitina aislados de *A. alternata* representan una alternativa viable para el control de la pudrición negra, a través de la inducción del metabolismo de los fenilpropanoides en el fruto del tomate tipo bola.

Palabras clave: quitina fúngica, fenilpropanoides, tomate, *Alternaria alternata*, control de *Alternaria*

ABSTRACT

Tomato is an economically important fruit and one of the most consumed due to its high nutrient content; however, it has a short shelf life and is highly susceptible to *Alternaria alternata*, causing significant postharvest losses. Among the strategies proposed for disease control is the induction of the fruit defense mechanism through elicitor molecules such as chitin. Chitin, an essential component of the fungal cell wall, has been shown to stimulate the defense mechanism in plants. On the other hand, activation of phenylpropanoid biosynthesis in plants has been reported to protect against pathogens; however, there are no reports in the literature on the effect of fungal chitin oligomers on phenylpropanoid biosynthesis in fruits. The objective of the present study was to evaluate alterations in phenylpropanoid metabolism in tomato fruit in response to chitin oligomers from *A. alternata*. Chitin oligomers from *A. alternata* were prepared by enzymatic treatment, sonication and ultrafiltration, and characterized by spectrophotometry and conductimetry. Two concentrations of oligomers (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) were applied to tomato fruits inoculated or not with *A. alternata*. The enzymatic activity of phenylalanine ammonium-lyase, total phenols content, flavonoids content, and the antifungal capacity of the oligomers on *A. alternata* at different times were determined. Chitin oligomers with a molecular weight of ≤ 1 kDa, 77% degree of acetylation, and an estimated degree of polymerization of ≤ 5 monomers were obtained. Chitin oligomers increased in phenylalanine ammonium-lyase enzyme activity, total phenols content, and flavonoids content from the first minutes after application. Besides, the phenolic acids gallic, *p*-hydroxybenzoic and *p*-coumaric, as well as the flavonoids rutin, kaempferol-3-O-rutside and naringenin were identified. A high concentration of chitin oligomers induced an increase in rutin and kaempferol-3-O-rutside content in tomatoes. In addition, this treatment delayed the onset of *A. alternata* damage by 2 days and reduced the development of black rot in tomato fruit by 70%. It is concluded that chitin oligomers isolated from *A. alternata* represent a viable alternative for controlling black rot, through the induction of phenylpropanoid metabolism in the fruit of ball-type tomato.

Keywords: fungal chitin, phenylpropanoids, tomato, *Alternaria alternata*, *Alternaria* control

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la hortaliza de mayor importancia a nivel internacional, esto se debe a su vasto consumo, al área producida y al valor económico (Escobar *et al.*, 2009). Según los datos de FAO (2020), a nivel mundial ha alcanzado una producción de 182 millones de toneladas, siendo México el principal exportador de tomate ocupando el 9° lugar en producción. En el año 2018 se sembraron más de 47 mil hectáreas de las cuales produjeron más de 79 mil toneladas (SIAP, 2019).

En el Noroeste de México la producción se ha visto afectada por la presencia de enfermedades que causan pérdidas hasta el 100% (Borboa-Flores *et al.*, 2009). El tomate es una hortaliza rica en nutrientes y altamente susceptible a varios hongos patógenos necrótrofos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, y *Fusarium* sp (Smith *et al.*, 2014; Mohammed *et al.*, 2019; Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014). *A. alternata* es capaz de infectar los cultivos de tomate en todas las etapas del desarrollo de la planta, causando pérdidas postcosecha (Bashir *et al.*, 2016). El uso de fungicidas sintéticos sigue siendo el principal método de control para la conservación postcosecha de frutas y verduras. Sin embargo, la aplicación excesiva de fungicidas puede generar residuos tóxicos en frutas y hortalizas, contaminación al medio ambiente y la generación de cepas de patógenos resistentes a los fungicidas (Yang y Jiang, 2015). Por lo tanto, se requiere de alternativas con un enfoque más económico, inofensivo y efectivo para el control de enfermedades (Droby *et al.*, 2009).

Una alternativa muy promisoría es la inducción del mecanismo de defensa de los frutos. El uso de moléculas inductoras también llamadas elicitores, son capaces de desencadenar respuestas de defensa en las plantas que pueden inducir efectos fisiológicos, bioquímicos, así como la acumulación de fitoalexinas en el organismo al cual son aplicados (García *et al.*, 2018). Sun *et al.* (2018) demostraron que al aplicar quitina obtenida de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mejoró efectivamente la resistencia del fruto de tomate contra *Botrytis cinerea* controlando la podredumbre del moho gris.

La quitina es un componente importante de la pared celular de los hongos, la cual es reconocida por receptores membranales celulares estimulando el mecanismo de defensa de las plantas (Squegli *et al.*, 2017). Estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo han demostrado que la

aplicación de oligómeros de quitina fúngica en frutos de tomate indujeron un aumento en los niveles de actividad de las enzimas quitinasa y β -1,3- glucanasa (Valle-Sotelo, 2019), peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Falcón-Verdugo, 2019). De acuerdo a lo anterior, la quitina y sus oligómeros inducen la actividad de proteínas relacionadas con la patogénesis, así como ciertas enzimas relacionadas con el sistema oxidativo.

Sin embargo, hasta el momento no se tienen reportes en la literatura del efecto de los oligómeros de quitina de *A. alternata* sobre la síntesis de las fitoalexinas. Entre estas se encuentran los fenilpropanoides, los cuales son un grupo de metabolitos secundarios de plantas derivados de la fenilalanina. En el fruto del tomate, se ha reportado que la activación de la vía de biosíntesis de fenilpropanoides brinda protección contra patógenos (Wei *et al.*, 2017). Otro estudio indica que al inocular tomate con patógenos ocurre la activación de fenilpropanoides debido a la participación de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL), la cual es la principal enzima involucrada en la síntesis de estos compuestos (Vanitha *et al.*, 2009). Wang *et al.* (2013), investigaron los efectos de oligandrina como inductor en frutos de tomate contra *Botrytis cinerea*, en donde los resultados indicaron que al aplicar este bio-elicitor estimuló enzimas como la fenilalanina amonio-liasa, induciendo resistencia contra *B. cinerea*. Debido a lo anterior surge el interés de determinar el efecto de los oligómeros de quitina fúngica en la activación de la ruta de los fenilpropanoides en este fruto.

2. ANTECEDENTES

2.1. Situación Actual del Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la familia de las Solanáceas y es importante desde el punto de vista nutricional y valor comercial (Correia *et al.*, 2015). De acuerdo con Bakir *et al.* (2020) el tomate tiene una gran diversidad de metabolitos secundarios considerados clave para los aspectos de calidad de la fruta, como los azúcares, compuestos fenólicos y flavonoides, alcaloides y glucósidos de compuestos volátiles relacionados con el sabor.

En términos de producción, en el 2018 se produjeron 182 millones de toneladas de tomate en el mundo, representando un aumento del 25% en los últimos 10 años (FAO, 2019). El comercio internacional de tomate fresco es de 7.8 millones de toneladas con un valor de \$8,453 millones de dólares, promediando un precio de US\$ 1,084 por tonelada (MAGyP, 2017).

Los principales países productores del tomate son China con 32.6%, seguido por India, Turquía, Estados Unidos y Egipto (FAO, 2019). México ocupa el noveno lugar en producción mundial (SADER, 2019). En el rubro de exportaciones, México es el principal proveedor a nivel mundial con una participación en el mercado internacional de 25.11% del valor de las exportaciones (SAGARPA, 2017).

2.1.1. Importancia del Tomate en México

México es de los mayores productores de tomate a nivel mundial y el primero en exportar dicho fruto. El cultivo de tomate pertenece a los de mayor comercialización en el mundo y el de mayor valor económico (Navarro-Urbina, 2011). Según los datos de SAGARPA (2017) la producción de tomate en México tiene un valor económico alrededor de \$15.7 mil millones de pesos, destacando a esta hortaliza en segundo lugar a nivel nacional de acuerdo a su valor de producción. Dicho lo anterior, se ha diversificado el tomate para satisfacer las exigencias del mercado global existiendo

distintos tipos de tomate: bola, saladette, racimo, grape, cherry, entre otros. El tomate saladette es el más popular en México por su alta tolerancia a enfermedades patógenas o virus, a diferencia del tipo bola que es más susceptible a estas enfermedades teniendo una vida anaquel menor a la del saladette (INTAGRI, 2017).

De acuerdo con datos del SIAP (2019), en el ciclo 2018-2019 se obtuvo una producción de 3 millones de toneladas, siendo los principales estados productores: Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Puebla y Sonora. Aunque su producción sea alta, las plagas y enfermedades son un factor biótico primordial que afecta significativamente la producción provocando pérdidas económicas importantes (Aidoo *et al.*, 2014; Raybaudi-Mansilla *et al.*, 2006).

2.1.2. Pérdidas Postcosecha y Enfermedades Fúngicas del Fruto de Tomate

Las pérdidas de los alimentos afectan la seguridad alimentaria de las poblaciones más pobres, al desarrollo económico, así como al medio ambiente (FAO, 2016). Las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas están influenciadas por diversos factores, como físicas, fisiológicas, mecánicas e higiénicas. Además, otros factores que causan pérdidas después de la cosecha son los patógenos no infecciosos y pudriciones patológicas, los cuales causan daños graves (Yahaya, 2019).

En tomate, se estima que las pérdidas llegan hasta un 28.8% en comparación con otros frutos, por lo tanto, es necesario contar con datos más precisos que permitan establecer prácticas de manejo postcosecha más adecuadas, así como identificar áreas de mejora en las cadenas productivas, con el fin de disminuir las pérdidas de los alimentos (SADER, 2019). El tomate como fruto climatérico tiene una vida postcosecha relativamente corta, entre 8 y 10 días a una temperatura de almacenamiento entre 7 y 10 °C en estado rojo maduro. Generalmente este tiempo de vida útil se limita por diversos factores como la maduración, transpiración y senescencia lo que lo convierte en un fruto altamente susceptible a enfermedades postcosecha (Fagundes *et al.*, 2014).

Una de las principales causas en pérdidas postcosecha de tomate son los hongos patógenos. Entre los principales patógenos que afectan al tomate se encuentran *Alternaria alternata* (causante de la pudrición negra), *Botrytis cinerea* (moho gris), *Phytophthora infestans* (tizón tardío) y *Fusarium* sp, causando daño severo tanto antes como después de la cosecha (Dean *et al.*, 2012). Después de

la cosecha y durante el almacenamiento refrigerado, el tomate es susceptible al ataque por *A. alternata*, el cual puede causar pérdidas económicas sustanciales. Las infecciones aparecen generalmente como manchas de color negro-marrón que se desarrollan a partir de sitios de penetración del hongo, como puntas podridas y/o heridas accidentales, hasta su propagación en una gran parte de la superficie y pulpa de la fruta (Figura 1) (Pane *et al.*, 2016).

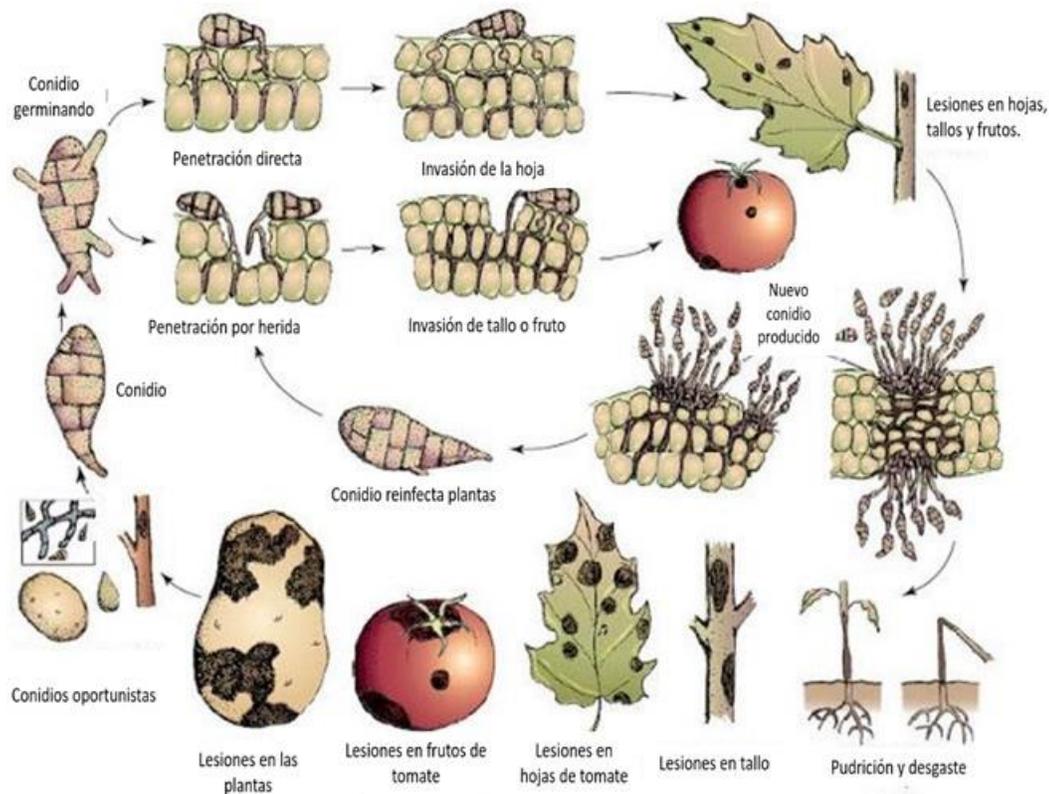


Figura 1. Desarrollo y síntomas de la enfermedad causada por *Alternaria*. Tomado de: Agrios (2005).

Pastor y Guarro (2008) mencionan que unas de las características morfológicas para la distinción de esta especie de *Alternaria* es que los conidios presentan septas transversales y longitudinales, son de color verde olivo oscuro con un pico corto y cilíndrico; además, forman cadenas largas, con ramificaciones secundarias y terciarias con diez o más conidios (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014) (Figura 2). Las conidias o esporas del hongo se diseminan mediante viento y salpicaduras de agua de lluvia o riego. El hongo infecta a la planta a través de heridas provocadas por factores abióticos o daño mecánico ocasionado por insectos o labores culturales (Agrios, 2005). También tiene la capacidad de infectar de forma directa a través de la epidermis (Reyes, 2016).

Macroscópicamente se puede observar colonias planas y algodonosas, de coloración blanca grisácea inicial y posteriormente se observa su superficie de color café o verde olivo oscuro, el reverso de la colonia es café oscuro a negro (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014), como resultado de la síntesis del pigmento dihidroxinaftaleno o melanina (Rivas, 2014).

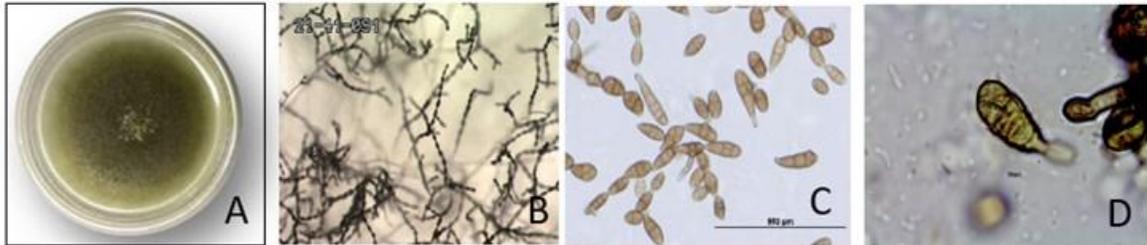


Figura 2. Morfología de *A. alternata*. **A**, Colonia de *A. alternata* en agar Papa Dextrosa. **B**, Cadena de conidias y tipo de ramificación de *A. alternata*. **C**, Conidias a 40X. **D**, Conidia a 100X. (Fotografías B y C proporcionadas por el Profesor Dr. Barry Pryor, Plant Pathology, Universidad de Arizona, Tucson, Arizona, USA.)

Frecuente se suele confundir *Alternaria alternata* con *Alternaria solani*, sin embargo, ambas especies presentan diferencias tanto morfológicas como moleculares. Morfológicamente *A. solani* presenta esporas grandes (50-143 µm, Gannibal *et al.*, 2014), produce conidios simples de origen individual que contienen picos largos, frecuentemente ramificados, son de color oscuros y muriformes con septas longitudinales y transversales. En el caso de *A. alternata*, sus esporas son pequeñas (no mayor a 20 µm), y no presenta picos largos (Pryor y Michailides, 2001). De manera molecular, se pueden diferenciar mediante estudios de RAPD-PCR, isoenzimas y cebadores (Weir *et al.*, 1998).

Los factores climáticos más importantes que afectan el desarrollo y la severidad de *A. alternata* son la temperatura, el agua libre y la humedad relativa, los cuales influyen directamente en los procesos de crecimiento, esporulación y germinación del hongo. Las temperaturas óptimas para su desarrollo se sitúan a una temperatura de 2 a 32 °C, siendo 25 °C la temperatura ideal con humedades relativas superiores al 80% (Troncoso-Rojas y Tiznado- Hernández, 2014). En el fruto del tomate el daño causado por *A. alternata* se caracteriza por depresiones, principalmente en la parte peduncular, de ovals a circulares y lesiones que eventualmente llegan a tornarse de color negro (Figura 3) como resultado de la esporulación masiva del patógeno (López *et al.*, 2013). La

podrición es seca, de color café negruzca y los conidios que recubre la zona dañada son de color verde oliva a negro, siendo las causas principales de rechazo por parte de la agroindustria (Reyes, 2016).



Figura 3. Lesiones provocadas por *A. alternata* en frutos de tomate (Imágenes tomadas en el laboratorio de Biotecnología de Vegetales y Poscosecha, CIAD, A.C.).

2.2. Control de Enfermedades Fúngicas en Tomate

La aplicación de fungicidas en el campo es necesaria para controlar la presencia de los patógenos, que infectan la fruta durante las etapas del desarrollo. Los fungicidas posteriores a la cosecha se utilizan para controlar las infecciones durante los procesos de manipulación y almacenamiento del producto. A consecuencia del uso excesivo y desmedido de los fungicidas, existe preocupación en la población por los posibles riesgos a la salud, la residualidad tóxica en los alimentos, así como la contaminación al ambiente y la generación de cepas resistentes a los fungicidas sintéticos (Dukare *et al.*, 2018). Debido a lo anterior, la tendencia global hacia la reducción de la aplicación de fungicidas químicos ha aumentado, con la demanda de alternativas ecológicas y rentables (Munhuwey *et al.*, 2016).

2.2.1 Inducción de Mecanismo de Defensa en Frutos

Una alternativa para la reducción de las enfermedades postcosecha es la inducción del mecanismo de defensa de la planta contra el patógeno (Aguilar-Gastélum *et al.*, 2018). Este mecanismo se

basa en los efectos combinados de barreras preformadas y mecanismos inducibles. Las plantas llegan a utilizar las defensas físicas y bioquímicas en contra de plagas. En teoría, las plantas tienden a poseer los genes necesarios para responder al ataque ocasionado por un patógeno (Laredo *et al.*, 2017).

Estudios previos reportan que las plantas responden a la invasión por microorganismos patógenos desarrollando una variedad de mecanismos de defensa o resistencia. Inicialmente hay un reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por la planta hospedera, el cual frecuentemente involucra la interacción de genes de resistencia del hospedero y genes de virulencia del patógeno los que codifican para efectores o activadores específicos. Mediante los caminos de transducción de señales participan diversas moléculas que le permiten a la planta responder a un amplio rango de estímulos que involucran, entre otros, proteínas activadas por mitógenos (MAP quinasas), fosfolípidos transmembranales, canales aniónicos de Cl^- y NO^- , moléculas de alcalinización extracelular/acidificación citoplásmica, especies reactivas de oxígeno (O^- , H_2O_2 , OH), radicales de NO y sistemas de señalización por ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), y ácidos grasos (Malik *et al.*, 2020).

Además, ocurre la activación de una amplia serie de respuestas de defensa que detienen o eliminan al patógeno. Entre estas respuestas se incluye la respuesta hipersensible que regula la activación de proteínas relacionadas a la patogénesis y de ciertas enzimas como la fenilalanina amonio liasa, una enzima clave en la síntesis de compuestos fenólicos; la deposición de material para el reforzamiento de pared celular y, la síntesis de un amplio espectro de compuestos antimicrobianos, entre los que se encuentran las fitoalexinas (Trouvelot *et al.*, 2014).

El metabolismo de los fenilpropanoides es una de las rutas biosintéticas que se activa en las plantas en respuesta al ataque por patógenos. A pesar de que la participación de los fenilpropanoides en la defensa de la planta ha sido ampliamente estudiada (Naoumkina *et al.*, 2010), su participación en la respuesta de defensa natural en frutos ha recibido poca atención. Por lo tanto, se sugiere que los eventos bioquímicos y moleculares que suceden durante las interacciones entre fruto-patógeno, podrían inducir el mecanismo de defensa en frutos de tomate y conferirle protección contra patógenos.

2.3. Fenilpropanoides y Enzimas que Regulan su Biosíntesis

Los fenilpropanoides son un grupo de metabolitos secundarios de plantas derivados de fenilalanina e incluyen monolignoles, flavonoides, diversos ácidos fenólicos y estilbenos (Figura 4). Estos compuestos tienen una amplia variedad de funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en la defensa contra el estrés biótico y abiótico.

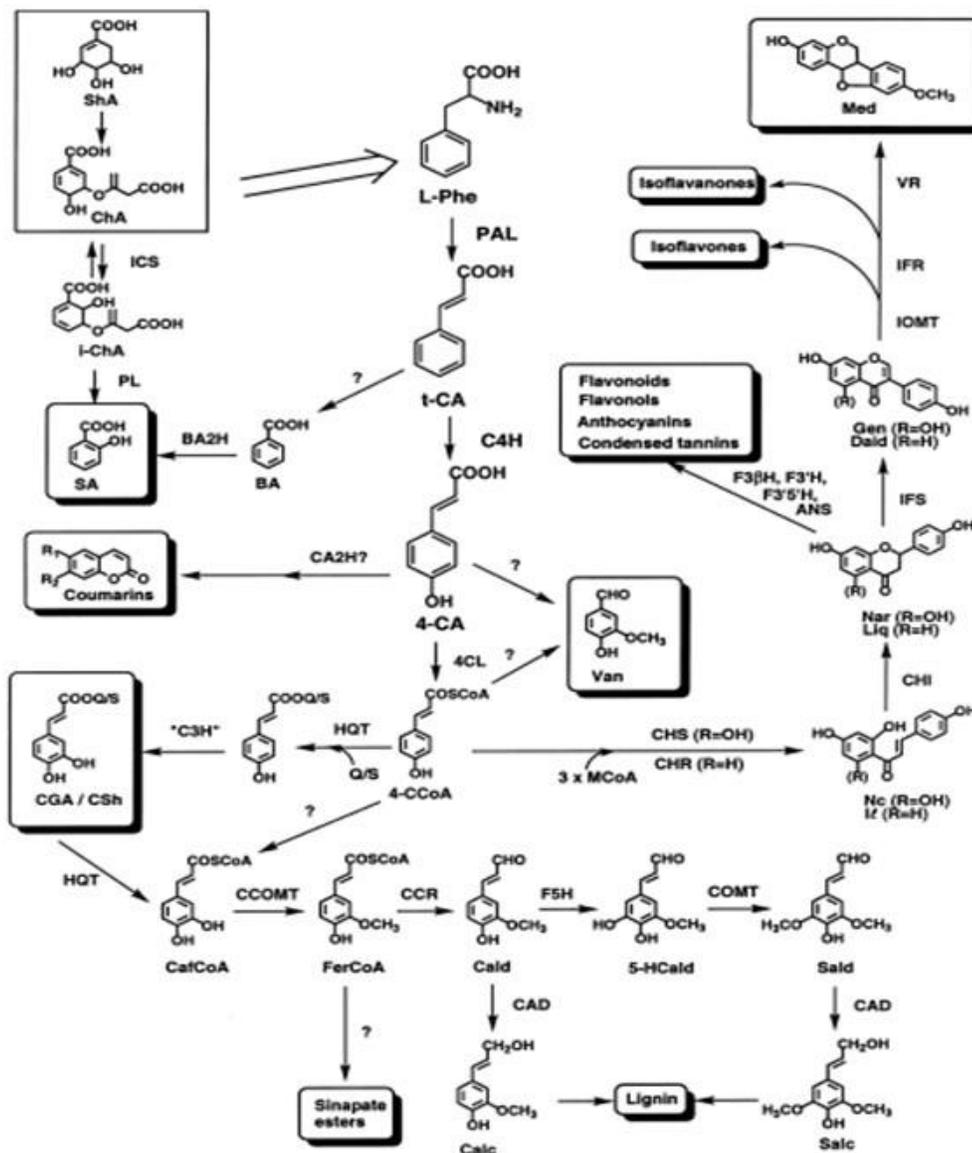


Figura 4. Rutas biosintéticas que conducen a la síntesis de los fenilpropanoides en plantas (Dixon *et al.*, 2002).

En el tomate los fenoles se han asociado principalmente al desarrollo del sabor durante su maduración, ya que su contenido aumenta a partir del estado verde maduro hasta que termina su etapa de maduración. Los ácidos fenólicos encontrados en tomate maduro son el cumárico, vanílico, caféico, ferúlico, *p*-hidroxibenzóico y clorogénico (Mattila y Kumpulainen, 2002; Ruelas *et al.*, 2006). La naringenina y la quercitrina (quercetina-3-ramnosido), fueron los primeros flavonoides aislados de la cutícula de tres variedades de tomate en 1958 por Ponderosa y colaboradores. En los últimos años, el número de flavonoides encontrados en tomate se ha multiplicado debido a la combinación de la cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas.

Lijima *et al.* (2008) identificaron 48 flavonoides mediante espectro UV y de masas. De estos, 7 eran derivados de naringenina chalcona, 2 de erodictiol chalcona, 7 de naringenina, 6 de eridictiol, 13 de kampferol y 13 de quercetina. Las determinaciones de estos compuestos se realizaron a partir de 5 variedades diferentes de tomate (Fossen y Verheul, 2008). En el 2013, Pacheco reportó la presencia de naringenin-7-O-glucósido, rutina, kaempferol-3-O-glucosido, kaempferol-3-O-rutinosido, naringenina y quercetina en fruto de tomate tipo bola.

Por otra parte, se ha reportado que la activación de la biosíntesis de los fenilpropanoides en los frutos de tomate brinda protección contra patógenos como *A. solani*, *A. alternata*, y *B. cinerea* (Shinde *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2017). Troncoso-Rojas *et al.* (2013), demostraron que la aplicación de elicitors fúngicos aumentaron la respuesta de defensa en el fruto de tomate contra *Fusarium oxysporum* activando la vía metabólica de los fenilpropanoides. En otro estudio, se demostró que la simbiosis de micorrizas arbusculares (MA) y tomate, induce un incremento en las actividades de las enzimas β -1,3-glucanasa, quitinasa, fenilalanina amonio-liasa (PAL) y lipogenasa (LOX) en el tejido foliar, favoreciendo la activación de defensas (Dabdoub-González, 2018).

La enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC 4.3.1.5) cataliza la primera etapa en la ruta de los fenilpropanoides, dando lugar a una diversidad de compuestos fenólicos. Esta enzima actúa sobre la fenilalanina transformándola en el ácido *trans*-cinámico, sustrato común de la biosíntesis de distintos fenilpropanoides tales como antocianinas, flavonoides, furanocumarinas, fitoalexinas, lignina y ésteres fenólicos (Dixon *et al.*, 2002). Los compuestos más simples conteniendo el esqueleto del fenilpropanoide C₆C₃, son los ácidos hidroxicinámicos como el ácido sináptico, los monolignoles, que tiene como función relacionarse con la estructura y defensa de las plantas. Esta enzima está regulada por diferentes factores como la luz y la concentración de diversas hormonas vegetales.

La actividad de la enzima PAL aumenta cuando las plantas son sometidas a estrés como infecciones fúngicas o bacterianas, falta de agua, entre otros (Romero-de la Fuente, 2009). Sin embargo, al aumentar la actividad de la enzima PAL o los genes que codifican para esta enzima se ha relacionado constantemente con los mecanismos de defensa de la planta ante distintos patógenos, tales como los procesos de resistencia inducida. Por lo cual, la actividad enzimática de PAL se ha utilizado también como indicador para la cuantificación de grado de respuesta defensiva por la planta tras la inducción (Pensado, 2014).

2.4. Moléculas Inductoras del Mecanismo de Defensa: Elicitores

El mecanismo de defensa de las plantas puede activarse en respuesta a diversos elicitores. Estos se clasifican como bióticos o abióticos, los cuales pueden actuar solos o combinados con otros elicitores. Entre los elicitores abióticos se incluye luz ultravioleta, metales pesados, alta o baja temperatura, o radicales libres, mientras que los elicitores biológicos son compuestos de diversa estructura y origen como componentes de la pared celular de levadura también pueden provenir de la pared celular de la planta, de micelios, esporas de hongos, o moléculas de origen microbiano como carbohidratos, proteínas, lípidos, glicoproteínas y compuestos volátiles (Cuadro 1) (Thakur y Singh, 2013). Debe considerarse que la magnitud y el alcance de la respuesta inducida va a depender del tipo de molécula, de la señal, movilidad y su capacidad para inducir la señalización secundaria dentro del tejido (García *et al.*, 2018; Falcón *et al.*, 2015).

Uno de los componentes de la pared celular de hongos es la quitina la cual puede actuar como elicitor, promoviendo la resistencia en varias especies de plantas contra los patógenos bacterianos y fúngicos (Wiesel *et al.*, 2014). Es importante determinar el momento adecuado para la aplicación de elicitores ya que estos generan múltiples efectos sobre la planta, entre los que se encuentra el incremento en la resistencia sistémica adquirida e inducida y la estimulación del metabolismo secundario (Baenas *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Elicitores biológicos contra enfermedades fúngicas en tomate.

Elicitor	Contra	Referencia
Quitosano de crustáceo	<i>Botrytis cinerea</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2007)
Ácido oligogalacturónico	<i>Botrytis cinerea</i>	(Wiesel <i>et al.</i> , 2014)
Fructooligosacárido de <i>Arctium lappa</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2009)
Biomasa fúngica enriquecida	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Troncoso-Rojas <i>et al.</i> , 2013)

2.4.1. Quitina y sus Oligosacáridos de Origen Fúngico como Elicitores

La quitina es un polisacárido con alto peso molecular, compuesto por monómeros de 2-acetoamida-2-desoxi- α -D-glucosa, unidos mediante enlaces β (1-4). Se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos, insectos, hongos, y algas. En forma tradicional, su procesamiento deriva de los desechos de crustáceos (Cisneros *et al.*, 2019). Es uno de los componentes principales de la pared celular de los hongos; la quitina tiene gran estabilidad química y térmica, pero aun así es susceptible a la acción de enzimas quitinolíticas (Lucas-Bautista *et al.*, 2019).

El proceso tradicional de obtención de quitina es el alcalino, en el cual se utilizan condiciones agresivas como elevada concentración de NaOH, y temperatura. La quitina obtenida bajo estas condiciones es de consistencia dura e inflexible, difícil de disolver y de difícil manejo. Recientemente, Henry *et al.*, (2019), reportó la obtención de quitina de hongos a través de tratamiento enzimático, en el cual utilizaron las enzimas comerciales proteasa y β -1,3-glucanasa. El producto obtenido de este tratamiento, presentó alto porcentaje de acetilación, cierta solubilidad en agua, y de fácil manejo. La combinación del tratamiento enzimático con la sonicación y ultrafiltración, produjo oligómeros de quitina parcialmente solubles en agua, lo que puede permitir su aplicación a nivel postcosecha.

Los oligosacáridos de quitina tienen efectos positivos al activar el mecanismo de defensa en las plantas, por lo que se han considerado como potentes inductores de la inmunidad de las plantas (Zhao *et al.*, 2019). Las plantas han desarrollado receptores membranales que reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), entre los que se encuentran los oligosacáridos de quitina (Lárez *et al.*, 2019). Posteriormente se desencadena una serie de reacciones de señalización, conduciendo a una muerte celular en el sitio donde el patógeno

intenta invadir. El ácido salicílico (AS), el ácido jasmónico (AJ), y el etileno se distinguen como las hormonas más importantes para las respuestas inmunes de las plantas, debido a que la biosíntesis y la señalización de estas están relacionadas con la defensa contra patógenos biótrosos o necrótrofos (Boccardo *et al.*, 2019).

Estudios previos reportaron que el primer receptor de quitina identificado en las plantas es la proteína CEBiP (proteína de unión al elicitor de quitina) con dominio de lisina, en el arroz (*Oriza sativa*). CEBiP es un receptor tipo proteína el cual contiene tres dominios extracelulares de lisina (LysM) y una cola de glicosilfosfatidilinositol anclada a la membrana plasmática. En reacción a la quitina o a los oligosacáridos de quitina, CEBiP forma un complejo proteico heterodimérico con CERK1 (Receptor del elicitor de quitina tipo Cinasa 1), el cual es un receptor tipo cinasa que contiene un dominio LysM, identificado en Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*). Diversos estudios en Arabidopsis mencionan que posee cinco receptores tipo cinasas con dominios LysM llamadas LYK1 a LYK5. La proteína LYK1 es un receptor tipo cinasa con actividad intracelular la cual se necesita para la homodimerización y la autofosforilación de las proteínas. LYK1 ha demostrado un papel esencial en la inmunidad inducida por quitina contra patógenos fúngicos como *Fusarium* sp y *Alternaria* sp (Xue *et al.*, 2019).

Recientemente, Valle-Sotelo (2019) demostró que los fragmentos de quitina aislados de *A. alternata* con grado de polimerización estimado < 5 tienen capacidad elicitora, promoviendo un aumento en la actividad enzimática de quitinasa y β -1-3 glucanasa, y redujeron la infección provocada por *A. alternata* en frutos de tomate. Asimismo, Falcón-Verdugo (2019) reportó que la aplicación de esos fragmentos de quitina indujo un aumento en el nivel de actividad de las enzimas peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa en frutos de tomate, promoviendo la resistencia frente al patógeno *A. alternata*. De acuerdo a los estudios previamente descritos, es claro que los fragmentos de quitina de origen fúngico estimulan el mecanismo de defensa de naturaleza proteica en frutos; sin embargo, no se ha encontrado información científica sobre el efecto de los oligómeros de quitina de *A. alternata* en la síntesis de los fenilpropanoides en frutos de tomate.

3. HIPÓTESIS

La aplicación de oligómeros de quitina de *A. alternata* aumenta el contenido de los fenilpropanoides en frutos de tomate tipo bola.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar las alteraciones en el metabolismo de los fenilpropanoides en fruto de tomate, en respuesta a la aplicación de oligómeros de quitina de *A. alternata*.

4.2. Objetivos Específicos

- Obtener y caracterizar parcialmente los oligómeros de quitina de *A. alternata*.
- Analizar el efecto de los oligómeros de quitina fúngica en la actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa en tomate tipo bola.
- Determinar el efecto de los oligómeros de quitina en el contenido de fenoles totales y flavonoides en tomate.
- Analizar el efecto de los oligómeros de quitina en el perfil de ácidos fenólicos y flavonoides en tomate.
- Evaluar la tolerancia de frutos de tomate tratado con oligómeros de quitina fúngica a la infección causada por *A. alternata*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención y Caracterización Parcial de Oligómeros de Quitina Fúngica

5.1.1. Obtención de Quitina de *A. alternata*.

Se utilizó una cepa de *Alternaria alternata* previamente aislada de frutos de tomate y conservada bajo refrigeración y con resiembra constante en el laboratorio de Biotecnología Vegetal y Postcosecha de la CTAOV-CIAD, A.C., ubicado en Hermosillo, Sonora. Se obtuvo la biomasa en medio de cultivo sumergido, de acuerdo con la técnica reportada por Henry *et al.* (2019). Se preparó una suspensión de esporas de *A. alternata* a una concentración de 1×10^7 , se tomó un mL y se añadió a caldo papa dextrosa (PDB), posteriormente se incubó a 27 °C por 10 días, en agitación a 120 rpm en un agitador orbital (Shaker Environ 3527). La biomasa se filtró en tela de organza y se lavó con agua destilada, se centrifugó utilizando una centrífuga Thermo Scientific (Sorvall ST8R) a 4500 rpm durante 15 min a 25 °C. La quitina se obtuvo por tratamiento enzimático reportado por Sivan y Chet (1989) y Jadhav y Gupta (2016) y modificado por Henry *et al.* (2019). A la biomasa obtenida se le añadieron 20 U/mL de proteasa comercial de *Bacillus licheniformis* (Sigma) en solución reguladora de fosfato de sodio 0.1 M a pH 7.0 por 24 h a 50 °C, y se colocó en un agitador orbital a 120 rpm. Al término de las 24 h se inactivó la enzima en baño maría a 100 °C por 10 min. La biomasa se filtró en tela de organza, se lavó y posteriormente se centrifugó a 4500 rpm durante 15 min a 25 °C. Al material obtenido se le añadieron 0.5 U/mL de β -1,3- glucanasa comercial de *Trichoderma longibrachiatum* en solución reguladora de citrato de sodio 0.5 M pH 3.5 durante 72 h a 37 °C, y se colocó en un agitador orbital a 120 rpm. Se recuperó la quitina en tela de organza, se lavó y liofilizó durante 24 h.

5.1.2. Obtención de Oligómeros de Quitina de Bajo Peso Molecular

La quitina obtenida del paso anterior se resuspendió en agua milliQ a una concentración de 5 mg/mL y se sometió a ultrasonificación a 250W durante 4 h a 50 °C en un sonicador (BRANSON, 2510). Posteriormente se pasó a través de papel filtro Whatman No.1 para remover el material que no se solubilizó. El material filtrado se sometió a ultrafiltración en celda de AMICON (Millipore) utilizando membranas de celulosa regenerada de 10 kDa (Sigma-Aldrich, USA) con la finalidad de eliminar moléculas de gran tamaño, y de 1 kDa para la obtención de oligómeros de bajo peso molecular (Valle-Sotelo, 2019). Finalmente, se colectó el permeado y se mantuvo a 4 °C para su posterior caracterización.

5.1.3. Caracterización Parcial de los Oligómeros de Quitina de Bajo Peso Molecular de *A. alternata*

Los oligómeros de quitina de *A. alternata* obtenidos, se caracterizaron parcialmente en base a su contenido de N-acetil-glucosamina, grado de acetilación, contenido de proteínas, y grado de polimerización.

Se determinó el contenido de N-acetil-glucosamina por espectrofotometría de acuerdo con la metodología descrita por Suárez-Pérez et al. (2009) con algunas modificaciones. Se tomó 1 mL de muestra y se añadieron 500 µL de HCl 0.1 N, se agitó y se dejó reposar 5 min. Se agregó 1 mL de agua milliQ seguido de 1 mL de NaOH 35% (m/v) dejando reposar durante 5 min. Se colocó en baño maría a 100 °C durante 10 min, se dejó enfriar y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 330 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (HACH, DR 5000). Para su cuantificación, se realizó una curva de calibración utilizando como estándar N-acetil-glucosamina (SIGMA, USA). El análisis se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en µg de N-acetil-glucosamina/mL de solución.

El grado de acetilación se determinó por medio de titulación conductimétrica en un potenciómetro (Denver Instrument 125) reportado por Henry *et al.* (2019). Para esta medición, se tomó una muestra de 100 mL de la solución de oligómeros y se agregó poco a poco HCl 0.1 N. Se midió el volumen

de HCl utilizado para lograr la protonación de los grupos amino libres de la molécula de quitina. Posteriormente se elaboró una gráfica con los valores de pH y conductancia para cada volumen de HCl 0.1 N que se añadió a la muestra. La medición se realizó por triplicado y los resultados se reportaron como porcentaje de grupos acetilados o grado de acetilación (%).

Se determinó el contenido de proteínas en la solución de oligómeros por el método de Bradford (1976). Se utilizó como estándar albúmina de suero bovino para la curva de calibración. La mezcla consistió en 50 μ L de muestra, 200 μ L del reactivo de Bradford y 750 μ L de agua milliQ. Se homogenizó la mezcla y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (HACH, DR 5000) a una longitud de onda de 590 nm. Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados como mg de proteína/mL.

El grado de polimerización se estimó en base al peso molecular de los oligómeros de quitina ≤ 1 kDa y al peso molecular de N-acetil-glucosamina.

5.2. Evaluación del Efecto de los Oligómeros de Quitina en la Síntesis de Fenilpropanoides en Frutos de Tomate

5.2.1. Aplicación Postcosecha de Oligómeros de Quitina Fúngica en Frutos de Tomate

Se realizó un bioensayo siguiendo la metodología reportada por Troncoso-Rojas *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Se obtuvieron los tomates tipo bola del mercado de abastos Francisco I. Madero, localizado en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Se seleccionaron 144 tomates en estado de madurez rosa de acuerdo a la clasificación de la USDA. Se desinfectaron con agua clorada (150 ppm) por 3 min, posteriormente se lavó con agua estéril para retirar el exceso del cloro y se dejó secar a temperatura ambiente. Se dividieron en 6 grupos de 24 frutos cada uno. A 3 grupos se les aplicó por inmersión los oligómeros de quitina a distintas concentraciones: 0, 50 y 100 μ g/mL, estos tratamientos fueron denominados como: Testigo (0 μ g/mL), F1 (50 μ g/mL), F2 (100 μ g/mL), respectivamente. En el caso del Testigo, los frutos se sumergieron en agua destilada estéril. Mientras que los otros 3 grupos se les aplicó oligómeros de quitina (0, 50 y 100 μ g/mL) y se inocularon con una suspensión de esporas de 1×10^7 esporas/mL de *A. alternata* mediante inmersión

de la zona peduncular, estos últimos se denominaron: inoculados (IN), F1 + inoculados (F1+INO), F2 + inoculados (F2+INO), respectivamente. Se tomaron muestras del pericarpio de los frutos a distintos tiempos posteriores a la aplicación de los oligómeros (0, 0.5, 1, 3, 6, 24, 48, y 72 h). Se tomaron 3 frutos por cada tratamiento y tiempo de muestreo, considerándose un fruto como unidad experimental. Se liofilizaron las muestras y almacenaron para su posterior análisis.

5.2.2. Determinación de la Actividad Enzimática de Fenilalanina amonio-liasa (PAL)

Se determinó PAL siguiendo el protocolo reportado por Zucker (1969) y Lafuente *et al.* (2001). Se homogenizaron 0.4 g de muestra liofilizada con 15 mL de buffer de borato de sodio a 0.1 M (pH 8.8 con 20 mM β -mercaptoetanol) por 1 h, se filtró con tela de organza y posteriormente se centrifugó a 9,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se midió el volumen del sobrenadante, y en base a éste se añadió sulfato de amonio para obtener un 27% de saturación, y se centrifugó a 9,000 rpm por 20 min a 4 °C. El precipitado se disolvió en 4.5 mL de buffer de acetato de amonio 0.1 M (pH 7.7 con 20 mM β -mercaptoetanol). Posteriormente se mezcló en tubos de ensayo 600 μ L de fenilalanina, 3.4 mL de agua y 2 mL de extracto. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (HACH modelo DR500 UV-Visible) a una longitud de onda de 290 nm y se dejó reposar por 2 horas para su segunda medición. Se calculó la actividad de PAL mediante el coeficiente de extinción molar del ácido transcinámico y se reportó como 1 mol de ácido transcinámico/min.

Con el propósito de reportar la actividad enzimática de forma específica, se determinó el contenido de proteína por el método de Bradford (1976), tal y como se menciona en la sección 3.1.3. Los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados de la actividad de PAL fueron reportados como U/ μ g de proteína. Una unidad enzimática de PAL se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de ácido transcinámico por minuto.

5.2.3. Determinación del Contenido de Fenoles Totales

Se determinó el contenido de los fenoles totales utilizando el método Folin-Ciocalteu reportado por

Singleton y Rossi (1965), modificado por Sánchez-Estrada *et al.*, (2009). Se tomó una muestra de 500 mg de tejido liofilizado, se agregaron 10 mL de metanol al 80% y se homogenizó la muestra en un homogenizador (Ultra-T25). Posteriormente se sonicó (BRANSON, 2510) por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, se centrifugó a 4,450 rpm a 5 °C por 15 min y por último se filtró el sobrenadante con papel Whatman N°10. Se mezcló en tubos de ensayo 100 µL de muestra, 3 mL de agua, 750 µL Na₂CO₃ al 20% durante 5 min, 250 µL de reactivo Folin-Ciocalteu 2 N, 900 µL de H₂O, y se agitó en vortex. Posteriormente, se dejó reposar 1.5 h a temperatura ambiente en oscuridad. La absorbancia se leyó a 724 nm con un espectrofotómetro UV-Visible. Se calculó la concentración de compuestos fenólicos totales utilizando una curva estándar de ácido gálico. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de tomate en peso seco (mg GAE/g p.s.).

5.2.4. Determinación del Contenido de Flavonoides

Para la determinación del contenido de flavonoides se utilizó el método colorimétrico de Cloruro de aluminio (Chang *et al.*, 2002), con algunas modificaciones. Se mezcló en tubos de ensayo 6.4 mL H₂O, 300 µL NaNO₂ al 5%, 1 mL de extracto; se dejó reposar 5 min y posteriormente se añadió 300 µL de AlCl₃ al 10% dejándose reposar 1 min. Posteriormente, se añadieron 2 mL de NaOH 1 N y se agitó en vortex vigorosamente. Se midió la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro. Se calculó la concentración de flavonoides utilizando una curva estándar de quercetina. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina por gramo de tomate en peso seco (mg QE/g p.s.).

5.2.5. Determinación del Perfil de Compuestos Fenólicos por HPLC

A partir del extracto utilizado para la determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides, se tomó una muestra y se filtró utilizando membrana de nylon 0.22 µm (Millipore Co., Bedford, MA, EE. UU.)

Para el análisis cromatográfico de los ácidos fenólicos, se inyectó una alícuota de 20 μ L del filtrado, en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian modelo ProStar 230, equipado con una columna C₁₈ODS Beckman Coulter de 25 cm de largo, 4.6 mm de diámetro y un tamaño de partícula de 5 μ m, con una bomba de gradiente ternario HPLC, acoplado a un detector UV y Vis ProStar 310 con arreglo de diodos (Walnut Creek California, USA).

Se utilizó un gradiente de elución (Cuadro 2) para la separación de los ácidos fenólicos empleando como fase móvil metanol grado HPLC (Solución A), y ácido ortofosfórico al 0.1% con agua MilliQ (Solución B) (Ruelas *et al.*, 2006). Se utilizó una velocidad de flujo de 1 mL/min y se detectó a una longitud de onda de 280 nm. Los ácidos fenólicos se identificaron comparando sus tiempos de retención con los de estándares comerciales de ácido gálico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido hidroxibenzoico y ácido *p*-cumárico.

Cuadro 2. Gradiente de elución para ácidos fenólicos

Tiempo (min)	Solución A Acetonitrilo	Solución B Agua MilliQ + 0.1% Ácido Ortofosfórico
0	8%	92%
25	22%	78%
30	8%	92%

(Gupta *et al.*, 2012).

En cuanto al análisis de flavonoides se utilizó un gradiente de elución (Cuadro 3) con una fase móvil empleando 95% de metanol grado HPLC más 5% de acetonitrilo (Solución elución A), y ácido fórmico al 5% más 95% de agua grado HPLC (Solución B) (Pacheco, 2013). Se utilizó una velocidad de flujo de 1 mL/min y se detectó a una longitud de onda de 270 nm. Los flavonoides resultantes se identificaron comparando sus tiempos de retención con los de estándares comerciales de naringenina, naringenina 7-O-glucósido, rutina, kaempferol-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-rutinósido y quercetina.

Cuadro 3. Gradiente de elución para Flavonoides

Tiempo (min)	Solución A (Metanol 95% + Acetonitrilo 5%)	Solución B (Ácido fórmico 5% + Agua 95%)
0	15%	85%
5	15%	85%
10	30%	70%
15	32%	68%
22	33%	67%
27	50%	50%
39	95%	5%
46	95%	5%
50	15%	85%

(Pacheco, 2013).

Para la cuantificación de los ácidos fenólicos y flavonoides, se realizó una curva de calibración para cada compuesto, utilizando un rango de concentración entre 0-100 mg/mL, con un coeficiente de regresión (R^2) por arriba de 0.99.

5.3. Evaluación del Efecto de los Oligómeros de Quitina en la Tolerancia del Tomate a la Infección por *A. alternata*

Los frutos testigo, inoculados, y los inoculados y expuestos a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina fúngica descritos en la sección 3.2.1, se almacenaron en una cámara de refrigeración durante 15 días a 20 °C y 90% H.R. Se determinó el efecto de los oligómeros de quitina en el control de la infección causada por *A. alternata* en base al progreso y la severidad de las lesiones causadas por el hongo, así como el índice de la enfermedad.

5.3.1. Medición del Crecimiento de *A. alternata* en Frutos de Tomate Infeccionados por el Hongo y Expuestos a los Oligómeros de Quitina

En el caso del progreso de la severidad de las lesiones causadas por el hongo, diariamente se registró el número de lesiones de cada fruto, se midió el diámetro de cada lesión con un vernier, y se calculó el índice de la enfermedad en el fruto de tomate de acuerdo con la fórmula de Townsend-Heuberger descrita por Wenda-Piesik y Piesik (1998) de acuerdo al cuadro 4. El índice de enfermedad se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación modificada por Sánchez-Estrada et al. (2009):

$$IE (\%) = \frac{\sum i...1 (ni \times vi)}{N \times V}$$

donde vi , clase de daño (%); ni , número de frutos en la clase; N , número total de frutos; V , clase más alta. Se determinó el porcentaje de frutos infectados por tratamiento.

Cuadro 4. Escala de daños en frutos de tomate causados por *Alternaria alternata*.

FRUTO	ESCALA DE DAÑO	DESCRIPCIÓN
	GRUPO 0	Frutos con 0% de daños
	GRUPO 1	Frutos con 0 - 25% de daños
	GRUPO 2	Frutos con > 25 - 50% de daños
	GRUPO 3	Frutos con > 50 - 75% de daños
	GRUPO 4	Frutos con > 75 - 100% de daños

Wenda-Piesik y Piesik (1998).

5.4. Diseño de Experimentos y Análisis de datos

En el primer objetivo específico, se utilizó estadística descriptiva para el análisis de las variables: contenido proteico, contenido de N-acetil-glucosamina y grado de acetilación. En el segundo y

tercer objetivo se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial A x B, en donde el factor A son los tratamientos (0, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oligómeros de quitina), y B los tiempos de muestreo (0, 0.5, 1, 3, 6, 24, 48, y 72 horas). Las variables respuesta fueron: actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa, contenido de fenoles totales y contenido de flavonoides.

Con respecto al quinto objetivo específico se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial A x B, en donde el factor A son los tratamientos (testigo, frutos inoculados, y frutos inoculados y expuestos a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oligómeros), y el factor B correspondiente al tiempo de muestreo (diariamente durante 10 días). La variable de respuesta es el índice de la enfermedad, donde los datos del índice de daños se analizaron después de la transformación arctan.

Se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% y comparación de medias. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico Number Cruncher NCSS 2021.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo la biomasa de *Alternaria alternata* a partir de la suspensión de esporas de 1×10^7 en medio PDB, teniendo un rendimiento de 9.7 g/L (peso seco) durante los 10 días de incubación. Estos resultados coinciden con lo reportado por Valle-Sotelo (2019) quien obtuvo 9.04 g/L, mientras que Henry *et al.* (2019) reportó un rendimiento de 7.03 g/L. Se ha reportado rendimientos de 9.0 g/L en *Alternaria solani* (Koley y Mahapatra, 2015), por lo que el rendimiento que se obtuvo en esta investigación coincide con lo reportado en la literatura. Los resultados de la obtención de biomasa pueden variar debido a diversos factores como medios de cultivos y condiciones de pH (Koley y Mahapatra, 2015), así como por la especie y origen del fitopatógeno (Martínez-Peña *et al.*, 2020), entre otros. Se ha reportado que la biomasa cultivada en medios ricos en nitrógeno y micronutrientes contiene cantidades mayores de proteína; en cambio, la biomasa cultivada en medios ricos en almidón y glucosa muestran mayor proporción lípidos y polisacáridos (Tigini *et al.*, 2012).

A partir de la biomasa se obtuvo la quitina fúngica mediante tratamiento enzimático, aplicando primero la proteasa comercial con la cual se logró hidrolizar 24.74% del peso de la biomasa inicial. Mahboubi *et al.* (2017) menciona que los hongos filamentosos pueden producir biomasa con altos niveles de proteína, de tal manera que la biomasa de origen fúngico puede llegar a contener entre 19.8% hasta 47% de proteína en especies como *Aspergillus oryzae*, *A. niger* y *Trichoderma viride* (Asadollahzadeth *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2008).

Por otra parte, al finalizar el tratamiento enzimático con β -glucanasa comercial se obtuvo el 37.11% del peso de la biomasa inicial, por lo tanto, con esta relación se puede inferir que el 38.15% del peso de la biomasa que se obtuvo de *A. alternata* fue hidrolizada por el tratamiento enzimático con β -glucanasa. De acuerdo con Pérez y Ribas (2013), los hongos tienen distintos componentes en su pared celular, el cual está formado por proteínas que varían entre un 20 y 30%, posteriormente una capa de β -glucanos el cual conforma entre 50 y 60% y por último la quitina, la cual se encuentra en la parte más interna y representa entre un 10 y 20% en los hongos filamentosos. De acuerdo con la literatura, el mayor componente de la pared celular fúngica son los glucanos, distinguiéndose dos grupos: α -glucanos y β -glucanos. Dentro del primer grupo se encuentran unidos mediante enlaces α -1,3 glucanos que son insolubles en agua, y en algunos hongos se encuentran

interconectados con enlaces α -1,4; sin embargo, la mayor proporción de los glucanos se encuentra unidos por enlaces β , destacándose los β -1,3 glucanos que representan entre el 65 y 90% del contenido de β -glucanos (Fesel y Zuccaro, 2016). En el caso de la enzima utilizada en el presente estudio para degradar este componente de la pared celular, consistió de una mezcla de β -1,3 y β -1,4 glucanasas, por lo que probablemente no se eliminó en su totalidad los glucanos provenientes de la pared celular fúngica, reflejándose en un porcentaje inferior a lo encontrado en la literatura y posiblemente quedaron residuos de glucanos en la muestra de quitina obtenida.

Respecto a la apariencia general de la quitina obtenida en el presente estudio, ésta presentó un color oscuro (Figura 5) como resultado de la síntesis del pigmento melanina que se encuentra en la pared celular de las conidias de *Alternaria alternata* (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernandez, 2014). González-Lorente *et al.* (2002) reportaron que la quitina obtenida por tratamiento químico a partir de la cáscara de camarón presentó una apariencia de color blanco. Por otro lado, Urbina-Salazar *et al.* (2020) obtuvo quitina de hongos comestibles (*Agaricus bisporus*) presentando una apariencia de color blanco-amarillo. En un estudio elaborado por Escobar-Sierra *et al.* (2013) extrajeron quitina de caparazones de crustáceos, la cual mostró un color perla claro, esto debido a los procesos de desmineralización, desproteínización y desacetilación realizados como una etapa de purificación. Por lo tanto, es de destacar que el método de extracción enzimático que se utilizó en el presente estudio no incluye los procesos químicos de desmineralización o blanqueo por medio de agentes decolorantes, lo que permitió que la biomasa obtenida conservara sus propiedades que dan ese color oscuro.

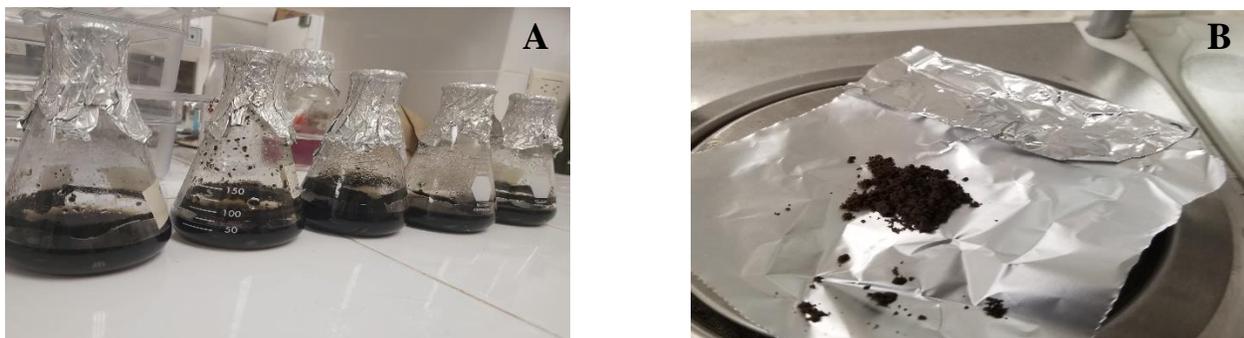


Figura 5. Biomasa de *A. alternata* obtenida antes y después del tratamiento enzimático. A) Biomasa obtenida por cultivo sumergido. B) Biomasa después del tratamiento enzimático.

6.1. Caracterización Parcial de los Oligómeros de Quitina

La quitina de *A. alternata* obtenidos mediante tratamiento enzimático, fue expuesta a los procesos de sonicación y ultrafiltración, obteniéndose los oligómeros de quitina con un peso molecular ≤ 1 kDa. De acuerdo con el peso molecular de la quitina y el tamaño de poro de la membrana se pudo estimar un grado de polimerización ≤ 5 (Cuadro 5). Estudios han demostrado que la degradación ultrasónica de biopolímeros solubles en agua se debe a los efectos mecánicos inducidos por ultrasonidos el cual da como resultado la producción de radicales libres $\text{OH}\cdot$ y $\text{H}\cdot$ (Koda *et al.*, 2011). Kjartansson *et al.*, (2006), reportó que el proceso de sonicación en quitina de crustáceo provocó la ruptura del polisacárido causando la despolimerización y mejorando la eliminación de proteínas volviéndolo soluble y con un rendimiento de 8.28%. En la figura 6 se puede observar como el proceso de sonicación favoreció la solubilidad de los oligómeros de quitina.



Figura 6. Apariencia general de la quitina obtenida de *A. alternata*. A) Quitina insoluble (sin sonicación). B) Quitina soluble (posterior a la sonicación). C) Oligómeros de quitina de *A. alternata* ≤ 1 kDa

6.1.1. Contenido de N-acetil glucosamina

El contenido de N-acetil glucosamina (GlcNAc) que se obtuvo en la solución acuosa de los oligómeros fue de 50 ± 0.007 $\mu\text{g/mL}$ lo que representa un valor de 2.06 g/100 g de quitina inicial (Cuadro 5). Falcón-Verdugo (2019) realizó el mismo método enzimático, sonicó durante 3 horas y ultrafiltró bajo las mismas condiciones para la obtención de oligómeros, en el que obtuvo 100 $\mu\text{g/mL}$ de N-acetil-glucosamina que representa un valor de 3.82 g/100g de quitina inicial. Por otro

lado, Valle-Sotelo (2019) sonicó por 4 horas a 250 watts y obtuvo 314 $\mu\text{g/mL}$ (12 g/100 g de quitina inicial). Sin embargo, en el actual estudio se sonicó por 4 horas, donde nuestros resultados están por debajo de los antes mencionados. Urbina-Salazar *et al.* (2020), obtuvieron una concentración de 80.4 ± 2.2 de N-acetil glucosamina; estos valores se deben a que la quitina obtenida de *Agaricus bisporus* fue tratada con el tratamiento tradicional de NaOH para preservar su estructura y aumentar su pureza. En el presente trabajo, cabe destacar que el tiempo de sonicación es un factor considerable para fragmentar la quitina y obtener una mayor cantidad de oligómeros. Sin embargo, el bajo contenido de GlcNAc en la muestra del presente estudio puede deberse a que se añadió más agua de la requerida antes de sonicar.

Cuadro 5. Características físico-químicas de los oligómeros de quitina de *A. alternata*.

Característica	Resultados Obtenidos
Grado de polimerización	≤ 5 Monómero
Contenido de N-acetil-glucosamina	$50 \pm 0.007 \mu\text{g/mL}$
Grado de acetilación	77%
Proteína residual	$0.025 \mu\text{g/mL}$
Solubilidad	Soluble en agua
Apariencia de la solución	Turbia, café oscuro

6.1.2. Grado de Acetilación de los Oligómeros de Quitina Fúngica

El grado de acetilación de los oligómeros de quitina soluble presentó un valor promedio de 77% (Cuadro 5), estos resultados son similares a lo obtenido por Falcón-Verdugo (2019), quien obtuvo 78%. En un estudio similar, Henry *et al.* (2019) reportaron un valor promedio de 76%, lo cual nos permite suponer que la molécula obtenida es quitina y no quitosano. Esto debido a que la quitina tiene un grado de acetilación $>50\%$ mientras que el quitosano tiene un promedio de 0 a 40% (Pillai *et al.*, 2009). Wu (2004), reportó que la quitina de *Aspergillus niger* presentó un valor de 76.53 % de grado de acetilación. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio. Tradicionalmente, el método de extracción para quitina es el tratamiento alcalino utilizando bases a altas concentraciones y temperaturas, lo que provoca la desacetilación de la molécula (Gadgery y Bahekar, 2017). Por otra parte, diversos estudios reportan que el método de extracción por

tratamiento enzimático no afecta el grado de acetilación de la quitina al contrario del método químico (Rojas, 2014). Esto es importante debido a que los oligómeros de quitina deben de estar altamente acetilados para ser reconocidos por los receptores de membrana celular y activar el mecanismo de defensa en las plantas.

6.1.3. Contenido de Proteína Residual

La solución de oligómeros de quitina presentó una concentración de 0.025 $\mu\text{g/mL}$ de proteína residual (Cuadro 5). Estos resultados son similares a lo reportado por Falcón-Verdugo (2019) quien obtuvo una concentración de 0.02 $\mu\text{g/mL}$. Cisneros-Pérez *et al.* (2019), extrajeron quitina a partir del exoesqueleto de crustáceos mediante el tratamiento enzimático utilizando enzimas proteolíticas, logrando reducir hasta un 67% el contenido de proteínas, lo que comprueba que la extracción enzimática es efectiva para la obtención de la quitina. En el mismo estudio, los autores observaron un alto porcentaje de acetilación, lo que confirma que el método enzimático no afecta el grado de acetilación. Asimismo, es fundamental señalar que el contenido de proteína residual puede variar dependiendo del proceso de sonicación, o del tipo de enzimas y concentración utilizada, por el que fue sometido la muestra de quitina para la obtención de los oligómeros. Kjartansson *et al.* (2006) evaluaron el efecto de la sonicación para la extracción de quitina de crustáceos, donde se observó que la concentración de proteína residual disminuyó debido al aumento del tiempo de sonicación. Además, se ha reportado que la quitina debe presentar alta pureza para sus aplicaciones biológicas, con valores entre 1 y 7% de proteína residual (Percot *et al.*, 2003), por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que los oligómeros de quitina con bajo contenido proteico pueden desempeñar una función biológica.

6.2. Efecto de los Oligómeros de Quitina en la Síntesis de Fenilpropanoides en Tomate

6.2.1. Actividad Enzimática de Fenilalanina amonio-liasa en Tomate en Respuesta a los Oligómeros de Quitina

Los resultados obtenidos por el efecto elicitor de los oligómeros de quitina fúngica sobre la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa en frutos de tomate, se muestran en el cuadro 6. Como se puede apreciar, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos, observándose que los tomates expuestos a 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con *A. Alternata* mostraron un mayor nivel de actividad enzimática, la cual fue mayor significativamente ($p \leq 0.05$), con respecto a los otros tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre el tratamiento F1+INO y el testigo. La fenilalanina amonio-liasa sintetiza una variedad de compuestos con capacidad antifúngica, los cuales pueden detener o evitar el desarrollo de los patógenos fúngicos (Kumar *et al.*, 2020).

Cuadro 6. Actividad enzimática de Fenilalanina amonio-liasa en tomate expuestos a oligómeros de quitina fúngica e inoculados con *Alternaria alternata*.

Tratamiento*	Actividad enzimática (U/mg de proteína)
Testigo	6.62 ± 0.68^b
Inoculado	7.92 ± 0.99^{ab}
F1+INO	6.80 ± 0.48^b
F2+INO	8.61 ± 0.81^a

*Tratamientos: Testigo: frutos sin tratamiento; Inoculado: frutos inoculados con *A. alternata*; F1+INO, frutos de tomate expuestos a 50 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con *A. alternata*; F2+INO, frutos de tomate expuestos a 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con *A. alternata*. Los valores representan la media \pm la desviación estándar ($n=24$). Las literales diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Al analizar el efecto de los oligómeros de quitina con respecto al tiempo de exposición en los niveles de actividad de la PAL en frutos de tomate (Figura 7), se puede apreciar que hubo

diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). La aplicación de los oligómeros de quitina provocó una inducción en el nivel de la actividad de la enzima a partir de los primeros segundos posteriores a la exposición. El tratamiento F2+INO presentó un mayor incremento en la actividad de PAL al tiempo de una hora posterior a la exposición, siendo 1.48 veces más con respecto al testigo a la misma hora, y 2.2 veces más con respecto al testigo al tiempo 0. Esta actividad registrada en el tratamiento F2+INO fue mayor significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto a los diferentes tiempos y tratamientos evaluados. Estos cambios que ocurrieron en los primeros minutos posteriores a la exposición, coincide con lo reportado por Shen *et al.* (2007), quienes señalan que las primeras interacciones moleculares implicadas en la activación de los eventos bioquímicos ocurren alrededor de los 5 minutos posteriores al contacto con el agente invasor. Asimismo, Valle-Sotelo (2019) demostró que la activación del mecanismo de defensa en frutos también ocurre desde los primeros minutos al tener contacto con el elicitador. Por su parte, Sun *et al.* (2018) demostraron que al utilizar quitina de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* en fruto de tomate infectado con *Botrytis cinerea*, la respuesta en la actividad PAL ocurre desde las primeras horas y se mantiene así durante todo el tiempo de incubación. En el mismo estudio se obtuvieron los valores más altos a partir de las 24 h mostrando diferencias significativas con respecto al testigo. En un estudio elaborado por Oliva *et al.* (2020) demostraron que PAL induce una respuesta de defensa en hojas de petunia y tomate contra *Botrytis cinerea*. Por su parte, Wang *et al.* (2021), observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de PAL en mandarinas tratadas con un bio-elicitor e inoculadas con *Meyerpzya guilliermondii* en comparación con el testigo. Estudios previos han reportado en plantas como *A. thaliana*, soya, arroz y en tomate la presencia de receptores membranales que tienen la capacidad de reconocer a los oligosacáridos de quitina, los cuales deben de presentar ciertas características como el grado de polimerización, y el grado de acetilación para que el reconocimiento sea más efectivo y se induzca el mecanismo de defensa (Badawy *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Henry *et al.*, 2021). Por lo que dependiendo de la molécula de quitina y/o sus oligosacáridos que se apliquen se llevará a cabo o no el reconocimiento molecular, y por lo tanto la activación del mecanismo de defensa.

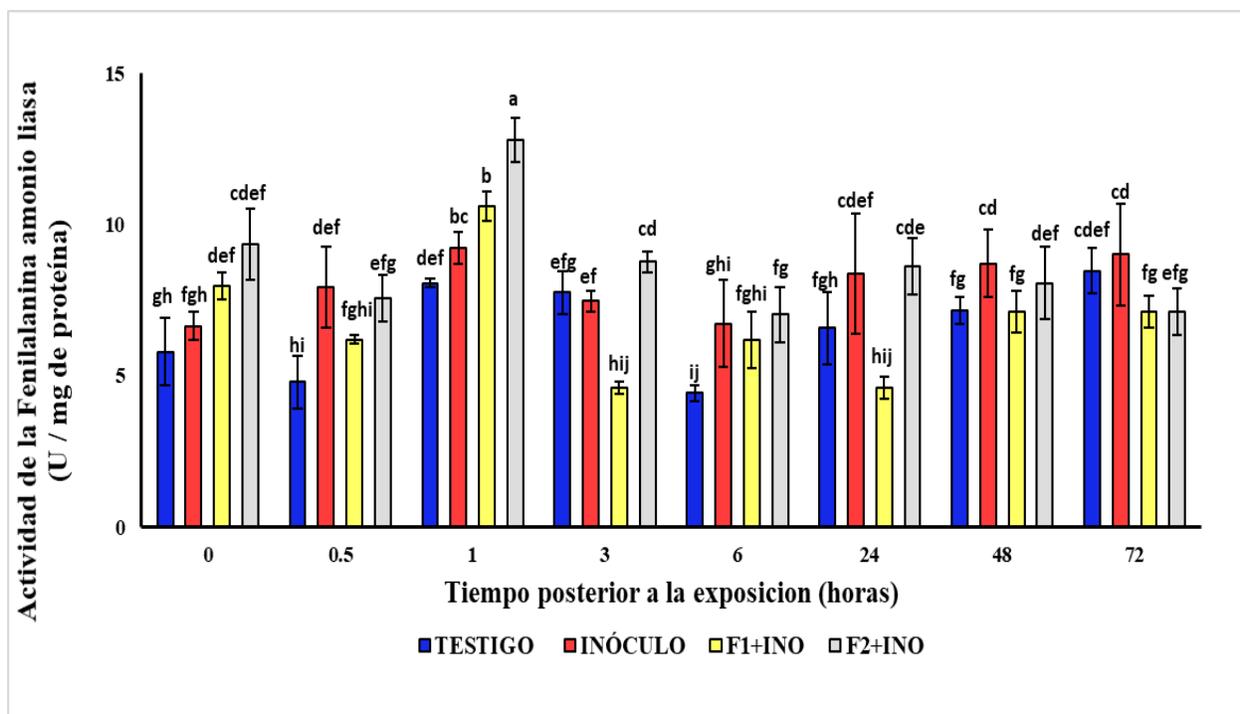


Figura 7. Actividad enzimática de fenilalanina amonio-liasa en frutos de tomate expuestos a distintas concentraciones de oligómeros de quitina fúngica y evaluado a distintos tiempos posteriores a la exposición. Testigo: frutos sin tratamiento; Inoculo: frutos inoculados con *A. alternata*; F1+INO: frutos aplicados con 50 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con el hongo; F2+INO: frutos aplicados con 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con el hongo. Las columnas representan los promedios y las barras la desviación estándar ($n=4$). Las literales muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que a partir de las 3 horas hay una disminución en la actividad de PAL. Esto coincide con el tiempo en que la espora de *A. alternata* inicia su germinación (Ruelas-Villaseñor, 2004), lo cual puede sugerir que las células del fruto dejan de sintetizar la enzima PAL para producir otras enzimas que le permitan al fruto evitar el crecimiento del patógeno; sin embargo, se requiere de más estudios que confirmen esta hipótesis. Es importante destacar la función que desempeña la enzima PAL durante su interacción planta-patógeno, esto debido a que induce varios cambios en el metabolismo celular, sintetizando una serie de compuestos secundarios relacionados con la defensa de las plantas como la biosíntesis de los fenilpropanoides (Vanitha *et al.*, 2009). Cabe destacar que la mayoría de los estudios reportan la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en frutos en periodos de largo tiempo posterior a los tratamientos (12 o 24 h).

6.2.2. Contenido de Fenoles Totales en Tomate en Respuesta a los Oligómeros de Quitina

Los resultados del contenido de fenoles totales por efecto de la aplicación de los oligómeros de quitina de *A. alternata* en frutos de tomate, se muestran en el cuadro 7. Como se puede observar, hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$), de los cuales los frutos testigo presentaron el valor más bajo. En cambio, la aplicación de 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina en frutos inoculados con *A. Alternata* (F2+INO), indujo la mayor síntesis de estos compuestos, valor que fue mayor significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto a los otros tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre los frutos testigo y los inoculados con *A. alternata*.

Cuadro 7. Contenido de fenoles totales en frutos de tomate expuestos a oligómeros de quitina fúngica e inoculados con *Alternaria alternata*.

Tratamiento	Contenido de fenoles totales (mg GAE/g p.s)
Testigo	$3.57 \pm 0.15\text{b}$
Inoculado	$3.64 \pm 0.30\text{b}$
F1+INO	$3.86 \pm 0.30\text{ab}$
F2+INO	$4.12 \pm 0.29\text{a}$

*Tratamientos: Testigo: frutos sin ningún tratamiento; Inoculados: frutos inoculados con *A. alternata*; F1+INO: frutos aplicados con 50 $\mu\text{g/mL}$ oligómeros de quitina fúngica e inoculados con *A. alternata*; F2+INO: frutos aplicados con 100 $\mu\text{g/mL}$ oligómeros de quitina fúngica e inoculados con *A. alternata*. Las literales diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$) $n=24$.

Al analizar el efecto de los oligómeros de quitina fúngica con respecto al tiempo de exposición en el contenido de fenoles totales en frutos de tomate (Figura 8), se puede apreciar que hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). Inicialmente el contenido de los fenoles totales fue muy similar entre los distintos tratamientos (3.51 – 3.81 mg GAE/g.p.s.) por lo que no fueron diferentes estadísticamente. Sin embargo, al tiempo de 1 h posterior al tratamiento, se observó un incremento sustancial en el contenido de fenoles totales, particularmente en el tratamiento F2+INO, observándose un incremento de 1.35 veces con respecto al testigo a ese

mismo tiempo, y de 1.78 veces con respecto al testigo al tiempo 0. La concentración de fenoles totales al tiempo de 1h posterior a la exposición registró la mayor concentración de estos compuestos, la cual fue mayor significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto a los otros tratamientos. No hubo diferencias significativas entre los frutos de tomate inoculados con *Alternaria alternata* y los testigos en los distintos tiempos evaluados ($p \geq 0.05$). Un estudio similar reportó concentraciones mayores en el contenido de fenoles totales en frutos de tomate inoculados con *Fusarium oxysporum* y tratados con un bio-elicitor en comparación con el testigo reduciendo así la infección causada por *F. oxysporum* (Troncoso-Rojas *et al.*, 2013). Wang *et al.* (2021) demostró que los fenoles totales aumentaron en la fruta de mandarina tratada con un bio-elicitor e inoculadas con *Meyerzyma guilliermondii* con respecto al testigo. En otra investigación reportada por Orzali *et al.* (2014), demostraron que al aplicar quitosano e inocular con *Fusarium graminearum* se indujo un incremento en el contenido de fenoles totales en comparación con el testigo ($p \leq 0.05$), induciendo así una mayor capacidad defensiva en la plántula.

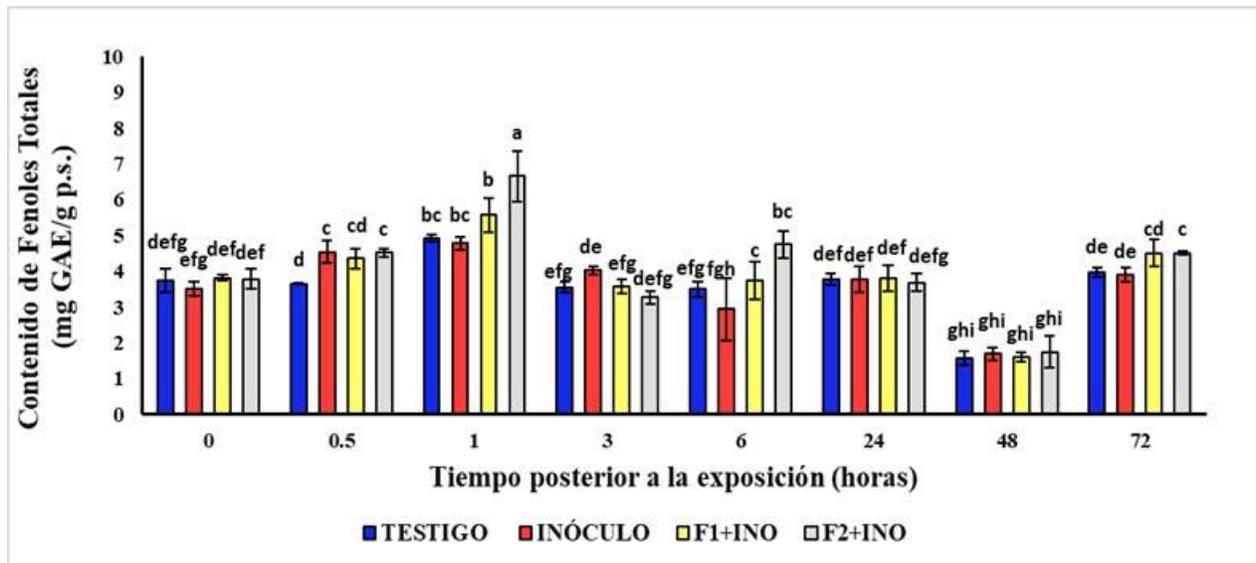


Figura 8. Contenido de fenoles totales en frutos de tomate expuestos a distintas a concentraciones de oligómeros de quitina fúngica [50 $\mu\text{g/mL}$ (F1+INO), y 100 $\mu\text{g/mL}$ (F2+INO)], e inoculados con *A. alternata* en relación al tiempo posterior a la exposición. Las literales muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$) $n=4$.

El aumento de compuestos fenólicos por efecto de los oligómeros de quitina coincide con lo reportado por Sánchez-Estrada *et al.* (2009) quienes probaron que al aplicar en frutos de melón un

bio-elicitador formulado con *Fusarium oxysporum*, se indujo un aumento en los compuestos fenólicos reduciendo el índice de enfermedad causada por *Fusarium*. Por otro lado, Ruelas *et al.* (2006) reportó que los ácidos fenólicos aumentaron en el epicarpio del fruto de tomate como mecanismo de defensa frente al ataque por *Alternaria alternata*. Así mismo, se ha demostrado que los compuestos fenólicos como metabolitos secundarios tienen la capacidad de exhibir propiedades antimicrobianas y antifúngicas para evitar la propagación de la infección, siendo importantes en la relación fruto-patógeno (Kumar *et al.*, 2020).

La principal función de los ácidos fenólicos es el mecanismo de defensa en las plantas frente a factores bióticos y abióticos, teniendo importancia fisiológica, ya que contienen propiedades como antimicrobianas y antioxidantes que se van desarrollando durante el crecimiento de las plantas (Lu *et al.*, 2015; Cervilla *et al.*, 2012).

Diversos investigadores han propuesto que la acción antimicrobiana que brinda los compuestos fenólicos podrían tener la capacidad de penetrar las membranas microbianas y alterar las propiedades funcionales de la célula, también tienen la capacidad de desnaturalizar a las enzimas responsables del principio de la germinación de esporas (Rodríguez-Sauceda, 2011; Colcha-López, 2021).

6.2.3. Contenido de Flavonoides en Tomate en Respuesta a los Oligómeros de Quitina

Los resultados del efecto de los oligómeros de quitina fúngica en el contenido de flavonoides en frutos de tomate, se muestran en el cuadro 8. Se puede apreciar que hubo diferencias significativas entre tratamientos. Los frutos testigo presentaron un contenido basal de 1.98 mg QE/g p.s., valor que fue menor significativamente con respecto a los otros tratamientos ($p \geq 0.05$). La aplicación de 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina indujeron un aumento significativo en los frutos de tomate tratamiento F2+INO, observándose un incremento en el contenido de flavonoides de 1.21 veces con respecto al testigo. Los datos del contenido mayor de flavonoides correlacionan con la mayor cantidad de fenoles en el caso del tratamiento F2+INO. No se observaron diferencias significativas entre el testigo, tratamiento inoculado y F1+INO.

Cuadro 8. Contenido de flavonoides en frutos de tomate expuestos a oligómeros de quitina fúngica e inoculados con *Alternaria alternata*.

Tratamiento*	Contenido de flavonoides (mg QE/g p.s.)
Testigo	1.98 ± 0.12b
Inoculado	2.10 ± 0.09b
F1+INO	2.09 ± 0.09b
F2+INO	2.40 ± 0.08 ^a

*Tratamientos: Testigo: frutos sin ningún tratamiento; Inoculados: frutos inoculados con *A. alternata*; F1+INO: frutos aplicados con 50 µg/mL oligómeros de quitina fúngica e inoculados con *A. alternata*; F2+INO: frutos aplicados con 100 µg/mL oligómeros de quitina fúngica e inoculados con *A. alternata*. Las distintas literales indican diferencias significativas ($p \geq 0.05$) $n=24$.

Los resultados del efecto de los oligómeros de quitina fúngica con respecto al tiempo de exposición, en el contenido de flavonoides en frutos de tomate se presentan en la figura 9. Se puede observar que hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). Al inicio del experimento, el testigo presentó un contenido de flavonoides de 2.44 mg QE/g p.s., aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \geq 0.05$). Sin embargo, los frutos expuestos a la mayor concentración de los oligómeros de quitina presentaron un incremento significativo al tiempo de 1 h posterior al tratamiento. Este incremento fue mayor significativamente ($p < 0.05$) con respecto a los demás tratamientos. En general, no se observaron diferencias significativas entre los frutos de tomate testigo, inoculados con *Alternaria alternata*, y los inoculados y expuestos a 50 µg/mL oligómeros de quitina ($p \geq 0.05$).

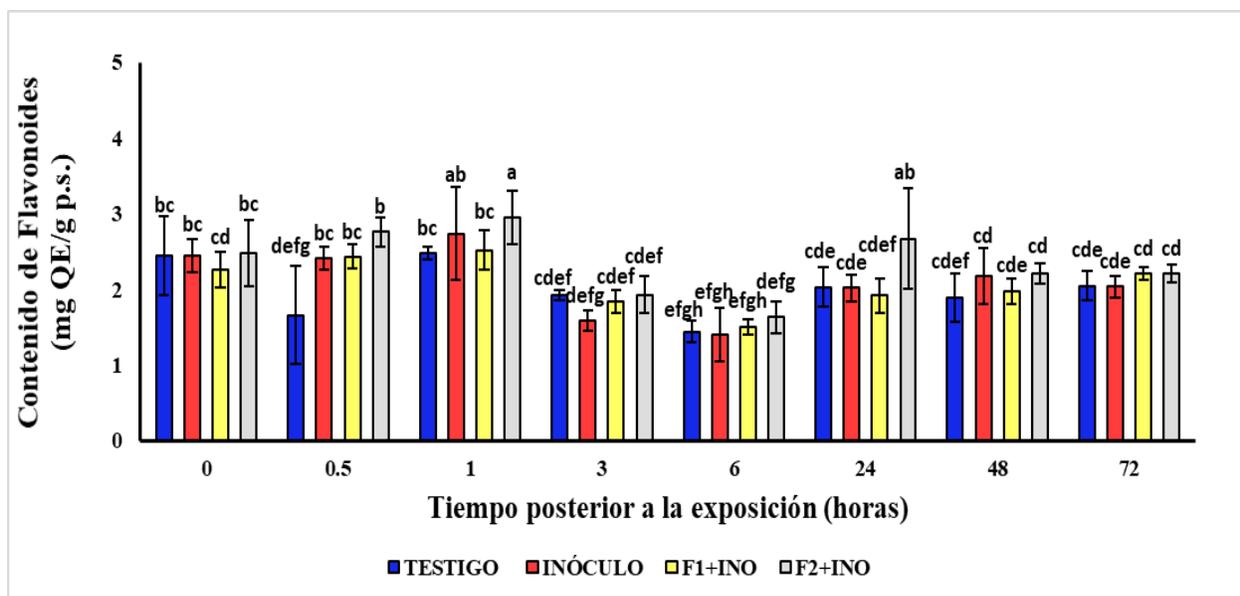


Figura 9. Contenido de flavonoides en frutos de tomate expuestos a distintas a concentraciones de oligómeros de quitina fúngica e inoculados con *A. alternata*. F1+INO: 50 $\mu\text{g/mL}$ oligómeros de quitina fúngica; F2+INO: 100 $\mu\text{g/mL}$ oligómeros de quitina fúngica. Las columnas representan las medias y las barras las desviaciones estándar. Las distintas literales muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$) $n=4$.

Diversos estudios mencionan que los flavonoides son sintetizados por las plantas como respuesta de defensa a lesiones físicas, infecciones o estrés, almacenándose en sitios estratégicamente importantes desempeñando así, una función de señalización y/o directa en la defensa (Treutter, 2006). Por otro lado, investigadores mencionan que los flavonoides exhiben diversas funciones biológicas, entre ellos, efectos antifúngicos, antivirales y antibacterianos (Yong-Sheng, 2019; Cushnie y Lamb, 2015). Yan *et al.* (2021), aplicaron *Trichoderma harzianum* en plantas de tomate, donde indujo altas concentraciones de flavonoides reduciendo las infecciones en la raíz causadas por nemátodos.

En un estudio reportado por Rodríguez-Maturino *et al.*, (2015), evaluaron el efecto antifúngico de los flavonoides del chiltepín sobre el crecimiento de *A. alternata* y *F. oxysporum*, observándose una reducción significativa en la germinación de conidios de estos hongos. Chen *et al.*, (2018) reportaron un incremento en el contenido de flavonoides en frutos de durazno, 24 horas después de la aplicación de oligosacáridos de quitosano (5 g/L). Por su parte, Lu *et al.* (2019), aplicaron dextrano como bio-elicitor en frutos de tomate contra la infección por *Botrytis cinerea* y se obtuvo un aumento significativo de flavonoides totales en el tejido del pericarpio, por lo que la biosíntesis de los flavonoides se indujo en respuesta a la aplicación del dextrano en el fruto del tomate. Por lo

tanto, estos compuestos juegan un papel importante en la resistencia poscosecha de frutas y hortalizas, que debido a altas concentraciones pueden producir una baja incidencia de infecciones patógenas (Lattanzio, 2003). En base a los estudios anteriores, es evidente que los flavonoides como metabolitos secundarios participan en el mecanismo de defensa tanto en plantas como en frutos, reduciendo las infecciones causadas por patógenos.

6.2.4. Cambios en el Perfil de Ácidos Fenólicos en Tomate en Respuesta a los Oligómeros de Quitina

En la figura 10 se presenta el cromatograma correspondiente a los estándares comerciales de los ácidos fenólicos utilizados en el presente estudio. Se obtuvieron picos bien separados y muy bien definidos, los cuales fueron identificados como ácidos: gálico, hidroxibenzoico, clorogénico, vanílico, caféico, *p*-cumárico, y ferúlico.

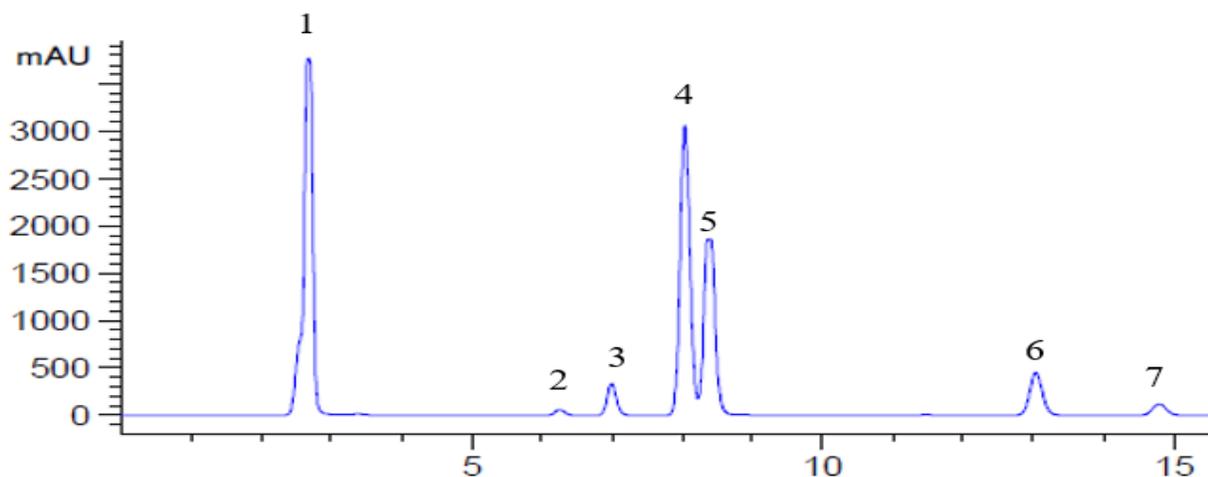


Figura 10. Cromatograma de los estándares comerciales de ácidos fenólicos analizados por HPLC. (1) Ácido Gálico, (2) Ácido *p*-Hidroxibenzoico, (3) Ácido Clorogénico, (4) Ácido Vanílico, (5) Ácido Cafeico, (6) Ácido *p*-Cumárico, y (7) Ácido Ferúlico.

En el cuadro 9, se presentan los tiempos de retención y los coeficientes de regresión obtenidos para cada uno de los ácidos fenólicos analizados en el presente estudio. Los tiempos de retención obtenidos fueron diferentes a los reportados por Ruelas-Villaseñor (2004) quien analizó el perfil de los ácidos fenólicos en frutos de tomate como respuesta a la infección provocada por *A. alternata*. Estas diferencias pueden deberse a que las condiciones cromatográficas no fueron las mismas que las del presente estudio, ya que dicho autor utilizó una gradiente de elución con una fase móvil de metanol/acetato de amonio pH 5.4 y una columna Phenomenex PLRP-S de 5 µm tamaño de partícula (150 x 4.6 mm diámetro interno) y una precolumna C-18.

Cuadro 9. Tiempos de retención (t_R) y coeficientes de regresión (R^2) de estándares comerciales de ácidos fenólicos.

No de Pico	Estándar	t_R (min)	t_{R^1} (min)	R^2
1	Ácido Gálico	2.67	5.39	0.9910
2	Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	6.25	28.02	0.9997
3	Ácido Clorogénico	6.99	8.14	0.9999
4	Ácido Vanílico	8.03	11.77	0.9990
5	Ácido Caféico	8.37	15.50	0.9998
6	Ácido <i>p</i> -cumárico	13.03	26.23	0.9998
7	Ácido Ferúlico	14.79	22.28	0.9999

t_{R^1} = tiempo de retención obtenido por Ruelas-Villaseñor (2004).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la variable del contenido de fenoles totales previamente descrita en la sección 6.2.2, se seleccionó el tiempo de 1 h posterior al tratamiento para el análisis de los ácidos fenólicos, ya que a este tiempo se observaron los cambios más significativos.

Los resultados de los análisis cromatográficos realizados tanto en los frutos testigo (Figura 11), como en los frutos de tomate expuestos a 100 µg/mL de oligómeros de quitina e inoculados con *A. alternata* al tiempo de 1 h (F2+INO, Figura 12), mostraron la presencia de varios picos bien definidos; tres de los cuales fueron identificados en base a sus tiempos de retención con respecto a los de los estándares, como: ácido gálico, *p*- hidroxibenzóico y *p*-cumárico. La concentración de los ácidos fenólicos en los frutos testigo y los del tratamiento F2+INO fue similar, por lo que la

aplicación de los oligómeros de quitina no tuvo efecto en esos ácidos fenólicos en el fruto de tomate. Se ha mencionado que la presencia de ciertos ácidos fenólicos depende de la variedad del cultivo, condiciones ambientales, tipo de suelo y, por último, el procedimiento de extracción y las condiciones cromatográficas de análisis de estos compuestos. En un estudio realizado, se detectaron varios ácidos fenólicos en tomate rosa de Barbastro cultivadas en túnel y al aire libre, entre ellos se identificaron al ácido clorogénico, ácido caféico, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico en dos variedades de frutos de tomate: “Balastro y Montaña” (Sanvicente-Benedico, 2015).

Ruelas *et al.* (2006), analizó el perfil de los ácidos fenólicos en el fruto de tomate inoculados con *A. alternata* en donde los resultados indicaron la presencia de los ácidos vanílico, caféico y clorogénico. Por otro lado, en una investigación realizada por Dumas *et al.* (2003), identificaron la presencia de ácidos fenólicos en diversas variedades comerciales de tomate producidos en España, en los que destacaron la presencia de los ácidos: clorogénico, ferúlico, y *p*-cumárico.

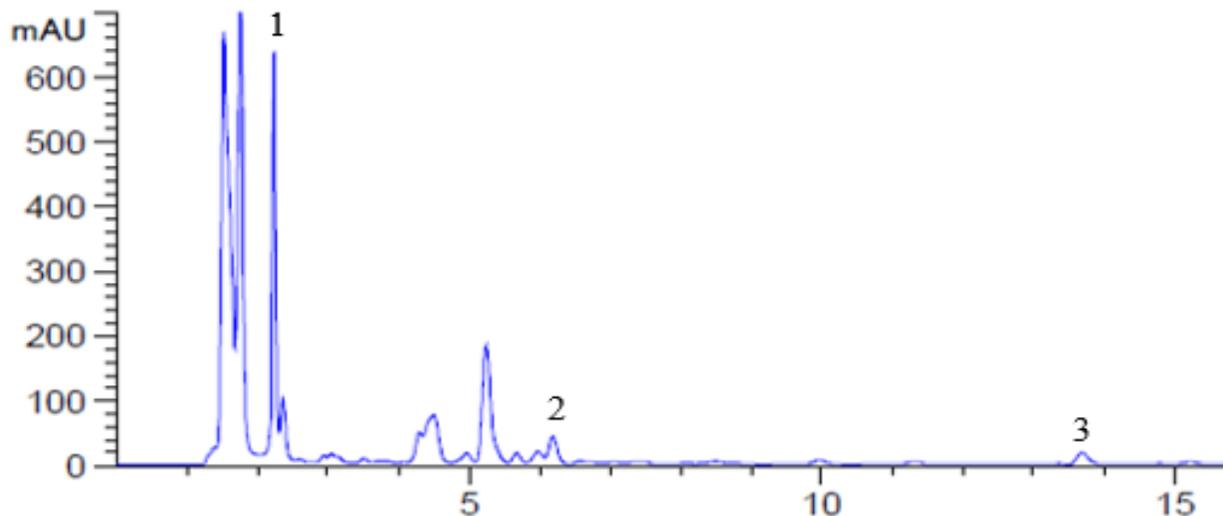


Figura 11. Cromatograma de los ácidos fenólicos detectados en frutos de tomate Testigo, después de 1 h de exposición al tratamiento (1: Ácido Gálico, 2: Ácido *p*-Hidroxibenzóico y 3: Ácido *p*-Cumárico).

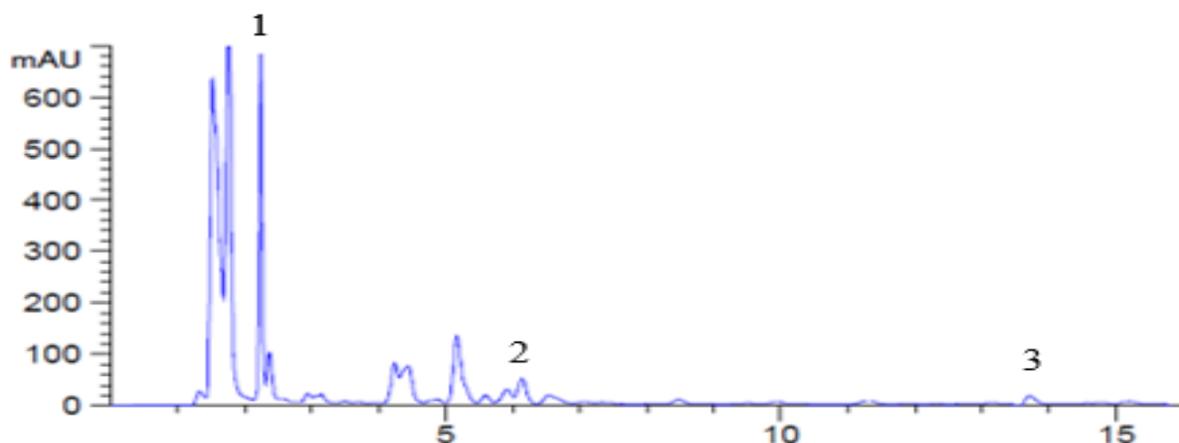


Figura 12. Cromatograma de los ácidos fenólicos detectados en frutos de tomate expuestos a 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con *A. alternata*, después de 1 h de exposición al tratamiento F2+INO (1: Ácido gálico, 2: Ácido *p*-Hidroxibenzóico y 3: Ácido *p*-Cumárico).

El ácido fenólico identificado con mayor concentración en el fruto expuesto al tratamiento F2+INO e inoculado fue el ácido gálico presentando una concentración de 94.67 $\mu\text{g/g}$ p.s. mientras que el testigo mostró una concentración de 93.22 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, por lo tanto, no hubo diferencias significativas entre el testigo y tratamiento ($p \geq 0.05$). Se ha reportado que el ácido gálico tiene propiedades antifúngicas en el fruto del tomate contra *Alternaria solani* mostrando inhibición en el crecimiento micelial del hongo (El-Nagar *et al.*, 2020). Por otra parte, el ácido fenólico de menor concentración para el mismo tratamiento fue el ácido *p*-cumárico con una concentración de 10.37 $\mu\text{g/g}$ de p.s.; mientras que en el fruto testigo se obtuvo una concentración de 0.60 $\mu\text{g/g}$ p.s., por lo que existe diferencias significativas entre el testigo y el tratamiento ($p \leq 0.05$).

Pane *et al.* (2016) evaluaron la capacidad de los extractos de hojas de *Capsicum annum* para controlar *A. alternata* en frutos de tomate cherry, en donde se detectaron los ácidos fenólicos: gálico, clorogénico, *p*-cumárico, y ferúlico, siendo el ácido gálico el de mayor concentración. Este último resultado coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio. Los ácidos fenólicos tienen la capacidad de alterar la funcionalidad de la membrana celular y causan pérdida del contenido citoplasmático (Nazzaro *et al.*, 2013). Lo anterior, reafirma el potencial de los ácidos fenólicos en el uso del manejo de enfermedades fúngicas postcosecha del tomate. Ali e Ismail (2014), determinaron el efecto del óxido nítrico aplicado al fruto del tomate en respuesta al estrés causado por la salinidad, en donde la tensión causada por la salinidad provocó la acumulación y el aumento de ácidos fenólicos, entre ellos, el gálico y el sináptico. Estos resultados confirman que el

óxido nítrico funciona como inductor para la biosíntesis de metabolitos secundarios como los ácidos fenólicos y mejora la calidad del fruto de tomate. En otro estudio, Çolak *et al.* (2014), detectaron la presencia de ácidos fenólicos en distintas variedades de tomate, en donde el ácido más abundante fue ácido gálico, similar al presente estudio. Se ha encontrado en otros estudios, que el ácido clorogénico es el ácido más abundante en el fruto del tomate, sin embargo, como se mencionó anteriormente, el contenido y tipo de los ácidos fenólicos varía dependiendo del genotipo, así como de los factores ambientales pre-cosecha, manejo post-cosecha, del método de extracción y las condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis realizado.

6.2.5. Efecto de los Oligómeros de Quitina en el Perfil de Flavonoides en Tomate.

En la figura 13 se muestra el cronograma correspondiente a los estándares comerciales de flavonoides utilizados en la presente investigación. Se observan varios picos claramente separados y definidos los cuales fueron identificados como rutina, kaempferol-3-O-rutinósido, kaempferol 7-O-glucósido, naringenina 7-O-glucósido, y naringenina.

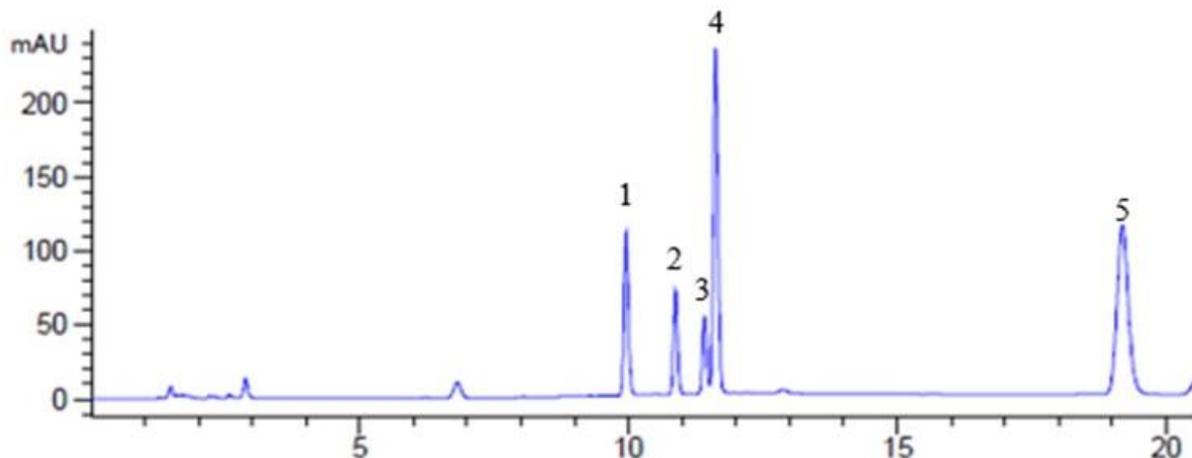


Figura 13. Cromatograma de los estándares comerciales de flavonoides analizados por HPLC. (1: Rutina, 2: Kaempferol-3-O-rutinósido, 3: Kaempferol 7-O-glucosido, 4: Naringenina 7-O-glucósido, y 5: Naringenina).

En el cuadro 10, se presentan los tiempos de retención y los coeficientes de regresión obtenidos para cada uno de los flavonoides analizados en el presente estudio.

Cuadro 10. Tiempos de retención (t_R) y coeficientes de regresión (R^2) de los estándares de flavonoides.

No de Pico	Estándar	t_R (min)	R^2
1	Rutina	9.916	0.9939
2	Kaempferol-3-O-rutinósido	10.898	0.9996
3	Kaempferol 7-O-glucósido	11.433	0.9996
4	Naringenina 7-O-glucósido	11.641	0.9997
5	Naringenina	19.198	0.9993

Los resultados obtenidos de los análisis cromatográficos en flavonoides, realizados tanto en el fruto de tomate testigo y en el fruto de tomate expuesto a 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con *A. alternata* (F2+INO) al tiempo de 1 h, mostraron la presencia de: rutina, kaempferol-3-O-rutinósido y naringenina (Figuras 14 y 15). Al comparar los dos cromatogramas es claro que el contenido de los flavonoides identificados en los frutos testigo y los inoculados que se les aplicó oligómeros de quitina fueron diferentes significativamente ($p \leq 0.05$). Se observó que la aplicación de 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina de *A. alternata* indujo un aumento en la síntesis del flavonoide rutina. Los frutos con este tratamiento presentaron un contenido de rutina 1.95 veces más que el testigo. Un comportamiento similar se observó en el flavonoide kaempferol-3-O-rutinósido, cuya síntesis se indujo por la aplicación del tratamiento F2+INO. Su contenido fue 5.40 más que el testigo. Caso contrario ocurrió con el flavonoide naringenina, cuyo contenido fue mayor en el testigo que en los frutos tratados con F2+INO. Por lo tanto, la aplicación de los oligómeros de quitina de *A. alternata* indujeron un aumento en la síntesis de los flavonoides rutina y kaempferol-3-O-rutinósido en el fruto de tomate. Diversos autores han reportado que los principales flavonoides encontrados en exocarpo de distintas variedades de tomate son quercertina, kaempferol, naringenina y rutina (da Silva Souza *et al.*, 2020; Dumas *et al.*, 2002). Slimestad y Verheul (2009), reportaron que la rutina es el principal flavonoide en tomates maduros en la mayoría de los distintos cultivares que se han estudiado, así como la presencia de otros flavonoides en bajas concentraciones, entre los que destacan naringenina y kaempferol 3-rutinósido, lo cual

coincide con los resultados del presente estudio. Además, dichos autores reportaron que la variación de estos compuestos puede depender de la especie del fruto, la etapa de madurez, condiciones climáticas pre-cosecha, manejo post-cosecha, las condiciones de manipulación y el almacenamiento del fruto.

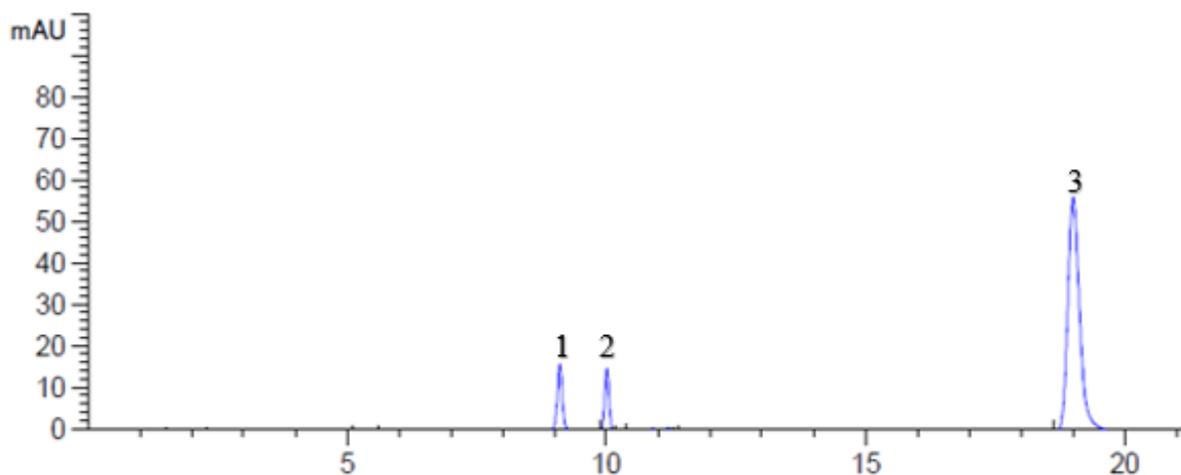


Figura 14. Cromatograma de los flavonoides detectados en frutos de tomate Testigo, después de 1 h posterior a los tratamientos (1: Rutina, 2: Kaempferol-3-O-rutinósido y 3: Naringenina).

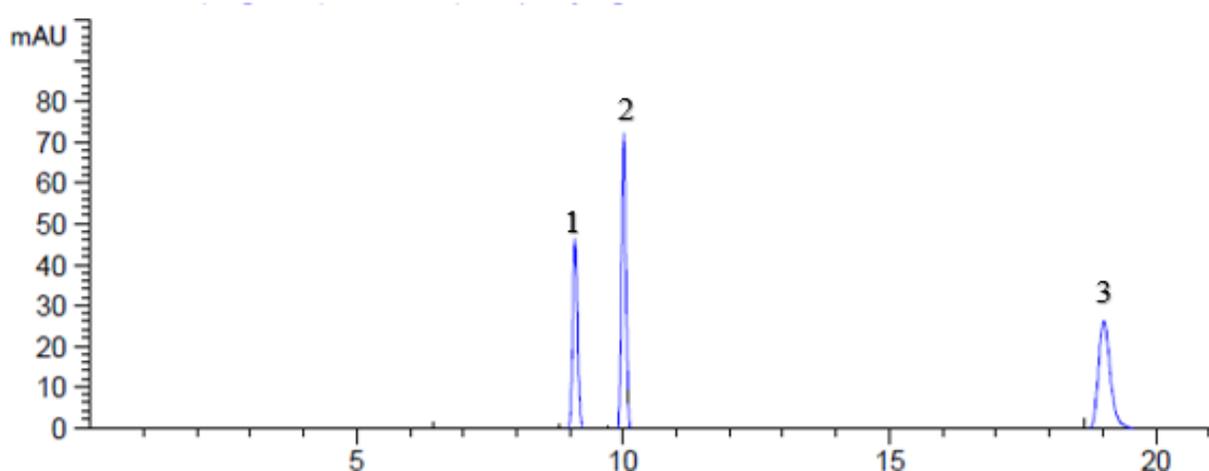


Figura 15. Cromatograma de los flavonoides detectados en frutos de tomate expuestos a 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con *A. alternata* (F2+INO), después de 1 h de exposición al tratamiento (1: Rutina, 2: Kaempferol-3-O-rutinósido y 3: Naringenina).

El flavonoide identificado con mayor concentración en el fruto expuesto al tratamiento F2+INO al tiempo de 1 h posterior al tratamiento, fue kaempferol-3-O-rutinósido presentando una concentración de 14.02 $\mu\text{g/g}$ p.s., mientras que el testigo presentó un contenido de 2.59 $\mu\text{g/g}$ p.s., ($p \leq 0.05$). Por otra parte, el de menor concentración fue rutina presentando un valor de 1.92 $\mu\text{g/g}$ p.s., y en el testigo se registró una concentración de 0.98 $\mu\text{g/g}$ p.s. ($p \leq 0.05$). Los flavonoides naringenina 7-O-glucósido y kaempferol 7-O-glucosido, no se detectaron. Se ha reportado que la mayoría del contenido de flavonoides se concentra en las partes externas de los tejidos del fruto durante su desarrollo, esto debido a que la formación de glicósidos del flavonol requiere la luz, por lo cual estos compuestos se encuentran principalmente en la cáscara del fruto. Así mismo, su concentración depende de los factores reportados anteriormente.

6.2.6. Control de la Pudrición Negra en Frutos de Tomate Infectados con *A. alternata*, Mediante Oligómeros de Quitina

En la figura 16, se puede observar el efecto de los oligómeros de quitina sobre el desarrollo de *A. alternata* en frutos de tomate durante el almacenamiento a 20 °C expresado en porcentaje de índice de daño. Los frutos presentaron manchas negras, secas, particularmente cercanas a la zona peduncular, sintomatología típica reportada para *A. alternata* (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014). Los frutos inoculados con el hongo presentaron los primeros síntomas de la infección a las 24 horas posteriores a la inoculación. Estos resultados son similares a lo reportado por Encinas-Basurto *et al.* (2017) quienes demostraron que las primeras lesiones aparecieron a partir del tercer día posterior a la inoculación. Esta similitud puede deberse a que en ambos estudios se utilizó una cepa de *A. alternata* proveniente del mismo cepario. Sin embargo, el hecho de que los daños se hayan desarrollado tan rápido puede deberse a que los tomates del presente estudio pudieron presentar un estado de madurez más avanzado que el que presentaron los frutos evaluados por Encinas-Basurto *et al.* (2017).

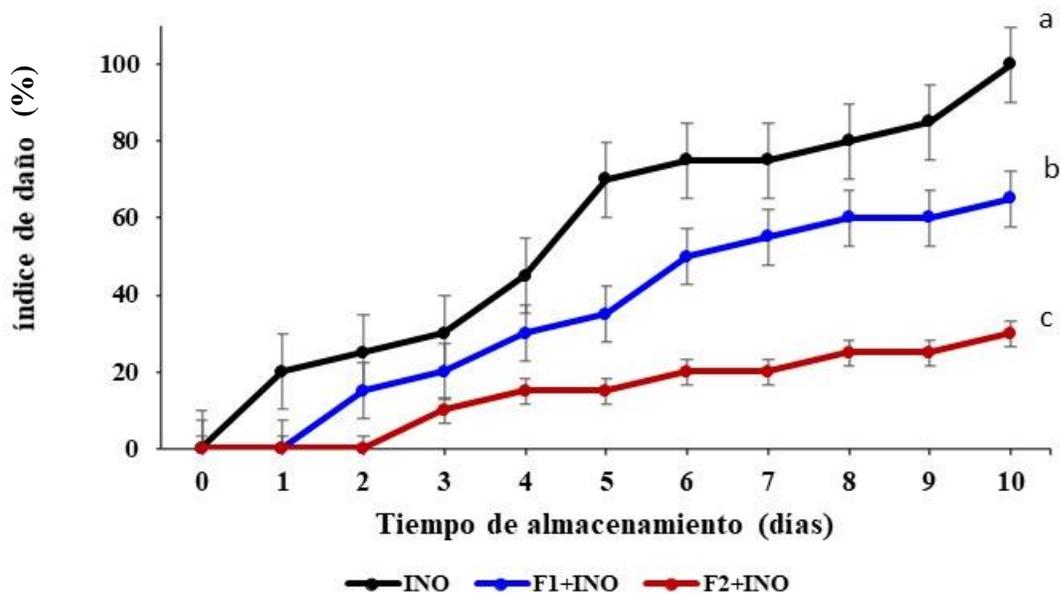


Figura 16. Efecto de los oligómeros de quitina de *Alternaria alternata* sobre el índice de daños causados por el hongo en frutos de tomate durante 10 días de almacenamiento. INO: frutos inoculados con *A. alternata*; F1+INO: frutos aplicados con 50 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con el hongo; F2+INO: frutos aplicados con 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina e inoculados con el hongo. Los datos representan las medias y las barras el error estándar. Las distintas literales muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$) $n=4$.

En el tratamiento F1+INO, se observó un ligero crecimiento del hongo a los dos días posterior a la inoculación; mientras que en el tratamiento F2+INO, se manifestaron los daños a partir del tercer día y mostró un índice de daño del 10% durante 5 días. Esto sugiere que la aplicación de 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina, evitó el inicio del desarrollo de la pudrición por 2 días. Al final del almacenamiento, el tratamiento Inoculado mostró el porcentaje de daños más alto ($p \leq 0.05$) con valores en índice de daño de 100%; mientras que F2+INO obtuvo un ID de 30% siendo este el más bajo significativamente, con respecto a los otros tratamientos. Estos resultados indican que la aplicación de 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligómeros de quitina redujo el desarrollo de la infección causada por *A. alternata* en un 70% en frutos de tomate.

Troncoso-Rojas *et al.* (2013), realizaron un estudio en el que aplicaron un bioelicitor fúngico a frutos de tomate y observaron un retraso en el inicio de la infección causada por *Fusarium oxysporum* por 3 días, lo cual coincide con lo observado en el presente estudio. Asimismo, Valle-Sotelo (2019) reportaron que la aplicación de 300 $\mu\text{g/mL}$ de fragmentos de quitina de *A. alternata*, redujo en un 78% el desarrollo de la pudrición negra en frutos de tomate inoculados previamente

con *A. alternata*. Sun *et al.* (2018) aplicaron 0.1% de quitina fúngica a frutos de tomate inoculados con *Botrytis cinerea* y no observaron diferencia significativa en la incidencia de la infección causada por el patógeno con respecto al testigo. No obstante, al aumentar la concentración de quitina a 0.5% hubo una disminución del 28% al segundo día, porcentaje menor al observado en el presente estudio. De acuerdo a lo mencionado, es posible que la aplicación de la quitina de origen fúngico con un bajo grado de polimerización obtenida en el presente estudio, tuvo un mayor efecto en el control de la pudrición negra, debido a que al ser reconocida por receptores de membrana indujo una mayor respuesta de resistencia frente a enfermedades patógenas.

Es importante señalar que la molécula de quitina no presenta actividad antifúngica por sí misma, si no por medio de proteínas transmembranales del fruto, iniciando la ruta de señalización hacia el núcleo aumentando la expresión de los genes que codifican para proteínas de defensa tales como las relacionadas a la patogénesis, como fenilalanina amonio liasa.

Parra y Ramírez (2002) reportaron que al aplicar quitina en placas Petri con agar, no se detectó inhibición del crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani*. El efecto antifúngico de la quitina se debe a que esta molécula induce el mecanismo de defensa de las plantas y frutos. Esta inducción ocurre cuando los oligómeros de quitina con elevado porcentaje de acetilación y bajo grado de polimerización (entre 5 y 9 monómeros) son reconocidos por receptores de membrana de las células vegetales, provocando cambios en el pH, producción de especies reactivas de oxígeno, aumento en la síntesis de las moléculas de señalización como etileno, ácido jasmónico, y ácido salicílico, en la fosforilación de las MAP cinasas, un aumento en el nivel de actividad enzimática de enzimas relacionadas a la patogénesis (quitinasa, glucanasa, defensinas, entre otras), y un aumento en la producción de metabolitos secundarios como las fitoalexinas (Abdul *et al.*, 2020; Henry *et al.*, 2021). Los resultados de la presente investigación, indican que la inhibición del desarrollo de la pudrición causada por *A. alternata* en frutos de tomate, se debe en parte a la inducción del metabolismo de los fenilpropanoides en respuesta a la aplicación de los oligómeros de quitina fúngica; sin embargo, es posible que también se indujo la estimulación de otros eventos que contribuyeron a la protección del fruto contra el ataque de *A. alternata*.

7. CONCLUSIONES

Los oligómeros de quitina fúngica aislados a partir de *Alternaria alternata* con un peso molecular de < 1kDa, 76% de acetilación y grado de polimerización estimado de <5, tuvieron un efecto positivo en el metabolismo de los fenilpropanoides aumentando el contenido de los fenoles totales y flavonoides, particularmente en el contenido de los flavonoides rutina, kaempferol-3-O-rutinósido y naringenina. Asimismo, los oligómeros de quitina mostraron actividad antifúngica al reducir un 70% el desarrollo de la infección provocada por *A. alternata* en frutos de tomate tipo bola.

8. RECOMENDACIONES

- Los oligómeros de quitina de *Alternaria alternata*, presentaron buena capacidad elicitora al inducir el mecanismo de defensa en los frutos de tomate; sin embargo, sería importante purificarlos eliminando la mayor cantidad de glucanos y determinar si los oligómeros en forma pura presentan mayor capacidad elicitora.
- Se sugiere optimizar el proceso de extracción de quitina fúngica para lograr un mayor rendimiento.
- Se sugiere analizar la actividad enzimática de la chalcona sintasa, ya que es la enzima precursora de los flavonoides.
- Se sugiere analizar los ácidos fenólicos y flavonoides detectados por HPLC y que no se lograron identificar.

9. REFERENCIAS

- Abdul Malik, N.A.; Kumar, I.S.; Nadarajah, K. 2020. Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. *International Journal of Molecular Science*, 21, 963.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology* 5th edition. San Diego: Academic Press.
- Aguilar-Gastélum, I., Martínez-Téllez, M., Corrales-Maldonado, C., Rivera-Domínguez, M., Vargas-Arispuro, I., y Arellano-Gil, M. 2018. Inducción de respuesta de defensa en plantas de tomate contra Forl por extracto de ajo. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 3(36), 394-413.
- Aidoo, R., Danfoku, R. A., y Mensah, J. O. 2014. Determinants of postharvest losses in tomato production in the Offinso North district of Ghana. *Journal of Development and Agricultural Economics*, 6(8), 338-344.
- Ali, HEM e Ismail, GSM (2014). Calidad de la fruta del tomate influenciada por la salinidad y el óxido nítrico. *Revista turca de botánica*, 38(1), 122-129.
- Ardila, H., Baquero, B., y Martínez, S. 2007. Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi raza 2. *Revista Colombiana de Química*, 36(2), 156-167.
- Arora, V., Ghosh, M.K., Pal, S., y Gangopadhyay, G. 2017. Allele specific CAPS marker development and characterization of chalcone synthase gene in Indian mulberry (*Morus* spp., family Moraceae). *PLoS ONE*, 12(6).
- Badawy, M. E., y Rabea, E. I. (2016). Chitosan and its derivatives as active ingredients against plant pests and diseases. In *chitosan in the preservation of agricultural commodities*. Academic Press, 179-219.
- Baenas, N., García-Viguera, C., y Moreno, D. 2014. Biotic Elicitors Effectively Increase the Glucosinolates Content in *Brassicaceae* Sprouts. *American Chemical Society*, 62(8), 1881-1889.
- Bakir, S., Capanoglu, E., D. Hall., y R.D., de Vos, R.C.H., 2020. Variation in secondary metabolites in a unique set of tomato accessions collected in turkey. *Food Chemistry*, 317(1), 126406.
- Bashir, Z, Shafique, S., Ahmad, A., Shafique, SH., Yasin, NA., Ashraf, Y., Ibrahim, A., Akram, K., y Noreen, S. 2016. Tomato Plant Proteins Actively Responding to Fungal Applications and Their Role in Cell Physiology. *Frontiers in Physiology*, 7, 57.
- Boccardo, N., Segretina, ME., Hernández, I. y Mirkin, FG. 2019. Expression of pathogenesis-related proteins in transplastomic tobacco plants confers resistance to filamentous pathogens under field trials. *Scientific Reports*. 9(1), 2791.
- Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E. O., Acedo-Félix, E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo-Juárez, O. y García-Ortega, A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*,

32(4): 319-326.

- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M. M., y Ruiz, J. M. (2012). Parameters symptomatic for boron toxicity in leaves of tomato plants. *Journal of Botany*, 2012.
- Chang, C. H., Yang, M., Wen, H. y Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10, 178-182.
- Chen, Ch., Hu, W., Zhang, R., y Jiang, A. 2018. Effects of postharvest oligochitosan treatment on fungal diseases and defence responses in Dongxue peach fruit. *Food Science and Technology International*, 24(2), 161-171.
- Cisneros Pérez, I., Curbelo Hernández, C., Andrade Díaz, C., y Giler Molina, J. M. (2019). Evaluación de la extracción enzimática de quitina a partir del exoesqueleto de camarón. *Centro Azúcar*, 46(1), 51-63.
- Claudot, A.C., y Drouet, A. 1992. Preparation and assay of chalcone synthase from walnut tree tissue. *Phytochemistry*, 31, 3377-3380.
- Çolak, N. G., Eken, N. T., Ülger, M., Frary, A., y Doğanlar, S. (2020). Mapping of quantitative trait loci for antioxidant molecules in tomato fruit: Carotenoids, vitamins C and E, glutathione and phenolic acids. *Plant Science*, 292, 110393.
- Colcha-López, L.F. 2021. Agentes antimicrobianos naturales de origen vegetal usados en la conservación de frutas y hortalizas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. Pp 45.
- Correia, A.F.K., Loro, A.C., Zanatta, S., Spoto, M.H.F., y Vieira, T.M.F.S. 2015. Effect of Temperature, Time, and Material Thickness on the Dehydration Process of Tomato. *International Journal of Food Science*, 2015, 1-7.
- Cushnie, T. T. and Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5): 343-356.
- da Silva Souza, MA, Peres, LE, Freschi, JR, Purgatto, E., Lajolo, FM y Hassimotto, NM (2020). Los cambios en los perfiles de flavonoides y carotenoides alteran los compuestos orgánicos volátiles en los tomates cherry morados y anaranjados obtenidos por introgresión de alelos. *Revista de ciencia de la alimentación y la agricultura*, 100 (4), 1662-1670.
- Dabdoub-González, N. (2018). Análisis de metabolitos de tomate alterados en la ruta del ácido jasmónico durante la simbiosis micorrízica con *Rhizophagus irregularis*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.
- Dean, R., Van Kan J., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. y Foster, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414 – 430.
- Del Rocío Urbina-Salazar, A., Inca-Torres, A. R., Aguilar, M. D. P. C., y Palomas, J. B. (2020). Preparación de quitina fúngica a partir de subproductos de hongos comestibles (*Agaricus bisporus*). *Polo del Conocimiento: Revista científico-profesional*, 5(4), 115-140.

- Dixon, R., Achnine, L., Kota, P., Liu, C., Srinivasa, M.S., y Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), 371-390.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., y Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137-145.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., y Grolier, P. (2003). Efectos de los factores ambientales y las técnicas agrícolas sobre el contenido de antioxidantes de los tomates. *Revista de ciencia de la alimentación y la agricultura*, 83(5), 369-382.
- Escobar, Hugo, Ed., y Ed. Lee, R. 2009. Manual de producción de tomate bajo invernadero. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Pp. 180.
- Encinas-Basurto, D., Valenzuela-Quintanar, M. I., Sánchez-Estrada, A., Tiznado-Hernández, M.E., Rodríguez-Félix, A., y Troncoso-Rojos, R. 2017. Alterations in volatile metabolites profile of fresh tomatoes in response to *Alternaria alternata* (Fr) Keissl. 1992 infection, *Chilean Journal of Agricultural Research*, 77(3), 194-201.
- Fagundes, C., Palou, L., Monteiro, A.R., y Pérez-Gago, M.B. 2014. Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings on gray mold development and quality attributes of cold-stored cherry tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 92, 1-8.
- Falcón- Verdugo, L.P. 2019. Fragmentos de quitina fúngica: inductores del mecanismo de defensa en tomate a través de especies reactivas de oxígeno. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora. México. Pp. 92.
- Falcón, A., Costales, Menéndez, D., González, D., y Nápoles, M. 2015. Nuevos productos naturales para la agricultura: las oligosacarinas. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 11-125.
- FAO, 2016. Consultado de: <http://www.fao.org/3/a-i5504s.pdf>
- FAOSTAT. (2019). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma. Cultivos. Consultado de: <https://goo.gl/zNi3Hk>
- FAOSTAT. (2020). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma. Cultivos. Consultado de: <https://goo.gl/zNi3Hk>
- Fossen T. y Verheul, MJ. 2008. The flavonoids of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2436-2441.
- Gadgery, KK y Bahekar, A. (2017). Studies on extraction methods of chitin from crab Shell and investigation of its mechanical properties. *International Journal of Mechanical Engineering and Technology*, 8(2), 220-231
- García, E., Robledo, A., Benavides, A., Solís, S., y González, S. 2018. Efecto de elicitors de origen natural sobre plantas de tomate sometidas a estrés biótico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 20, 4211-4221.
- Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., y Shibuya, N. (2014). Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(3), 404-413.

- Henry-García, Y., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M. E., Baéz-Flores, M. E., Carvajal-Millán, E., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., y Martínez-Robinson, K.G. 2019. Enzymatic treatments as alternative to produce chitin fragments of low molecular weight from *Alternaria alternata*. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(15): 47339.
- INTAGRI. 2017. Tipos y Especialidades de Tomate. Serie Hortalizas Núm. 13. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 4 p. Extraído de <https://www.intagri.com/articulos/hortalizas/tipos-y-especialidades-de-tomate>
- Jadhav, S. B., y Gupta, A. 2016. Studies on application of β -1, 3 glucanase in the degradation of glucans produced by *Botrytis cinerea* and inhibition of fungal growth. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 45-47.
- Kjartansson, GT, Zivanovic, S., Kristbergsson, K. y Weiss, J. (2006). Extracción asistida por sonicación de quitina de conchas de langostinos de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*). *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 54 (9), 3317-3323.
- Koda, S., Taguchi, K., y Futamura, K. (2011). Effects of frequency and a radical scavenger on ultrasonic degradation of water-soluble polymers. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 276-281.
- Kumar, S., Abedin, M. M., Singh, A. K., y Das, S. (2020). Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. In *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture* (pp. 517-532). Springer, Singapore.
- Lattanzio, V. (2003). Polifenoles bioactivos: su papel en la calidad y capacidad de almacenamiento de frutas y hortalizas. *Revista de botánica aplicada*, 77 (5/6), 128-146
- Lafunte, M. T., Zacarías, L., Martínez-Téllez, M. A., Sánchez-Ballesta, M. T., y Dupille, E. (2001). Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 6020-6025.
- Laredo, E., Martínez, J., Iliná, A., Guillen, L., y Hernández, F. 2017. Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(8), 673-683.
- Lárez-Velásquez, C., Rojas-Pirela, M., Chirinos, A., y Rojas-Avelizapa, L. 2019. Nuevos retos en agricultura para los biopolímeros de quitina y quitosano. Parte 1: Efectos beneficiosos para los cultivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales*, 20(3), 118-136.
- Lijima Y, Nakamura Y, Ogata Y, Tanaka K, Sakurai N, Suzuki T, et al. 2008. Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *The Plant Journal*, 54(5), 949-962.
- Liu, D.; Jiao, S.; Cheng, G.; Li, X.; Pei, Z.; Pei, Y.; Yin, H.; Du, Y. (2018). Identification of chitosan oligosaccharides binding proteins from the plasma membrane of wheat leaf cell. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 1083-1090.
- Liu, J., Fang, X., Jiang, M., Cai, Q., y Wu, X. 2019. Chitosan induces resistance to tuber rot in stored potato caused by *Alternaria tenuissima*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 851-857
- Liu, J., Tian, S., Meng, X., y Xu, Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases

and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 300-306.

- López, L., Gutiérrez, P., Bautista, S., Jiménez, L., y Zavaleta, H. 2013. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango “Tommy Atkins” durante el almacenamiento. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 19(3), 315-331.
- Lorente, J. A. G., Cañizares, E., Osorno, H., y Hau, L. (2002). Evaluación de dos alternativas de tratamiento químico para la obtención de quitina a partir de residuos sólidos del camarón. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, (331), 31-34.
- Lu, L., Wang, J., Zhu, R., Lu, H., Zheng, X., y Yu, T. (2015). Transcript profiling analysis of *Rhodosporidium paludigenum* mediated signaling pathways and defense responses in mandarin orange. *Food Chemistry*, 172, 603–612.
- Lu, L., Ji, L., Shi, R., Li, S., Zhang, X., Guo, Q. y Qiao, L. (2019). Dextran as an elicitor of phenylpropanoid and flavonoid biosynthesis in tomato fruit against gray mold infection. *Carbohydrate polymers*, 225, 115236.
- Lucas-Bautista, J., Bautista-Baños, B., Ventura-Aguilar, R., y Gómez-Ramírez, M. 2019. Determinación de quitina en hongos postcosecha y de quitinasas en frutos de papaya “Maradol”. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1), 1-7.
- MAGyP. (2017). Mercado externo del tomate. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Retrieved from <https://goo.gl/jdY7Zj>.
- Martínez-Peña, V.I., Ilyin, A., Álvarez-Reyna, V.D.P., Ramos-González, R., Contreras-Esquivel, J. C., Chávez-González, M. L., y Vásquez-Arroyo, J. (2020). Aprovechamiento de residuo de biomasa fúngica en la obtención de un sistema magnético nanoestructurado para remover arsénico del agua. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 36(2), 383-397.
- Mattila, P. y Kumpulainen, J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(13): 3660-7.
- Mohammed, B., Hussein, RA., y Toama, F. 2019. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by endophytic rhizobacteria. *Energy Procedia*, 157, 171-179.
- Munhuweyi, K., Lennox, C., Meitz-Hopkins, J., Caleb, O., y Opara, U. 2016. Major diseases of pomegranate (*Punica granatum* L.) their causes and management - A review. *Scientia Horticulturae*, (211), 126-139.
- Naoumkina, MA., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L., Dai, X., Zhao, P., y Dixon, R. 2010. Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology*, 11(6), 829-846.
- Nazzaro, F., Fratianni, F. y Coppola, R. (2013). Detección de quórum y fitoquímicos. *Revista internacional de ciencias moleculares*, 14 (6), 12607-12619.
- Navarro-Urbina, E. 2011. Producción de tomate saladette (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo condiciones de invernadero en una unidad de producción chaparrosa, de Villa de Cos, Zacatecas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buena Vista, Saltillo, Coahuila. Pp. 71.
- Oliva, M., Hatan, E., Kumar, V., Galsurker, O., Nisim-Levi, A., Ovadia, R., y Oren-Shamir, M.

- (2020). Increased phenylalanine levels in plant leaves reduces susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Plant Science*, 290, 110289.
- Orzali, L., Forni, C., y Riccioni, L. (2014). Effect of chitosan seed treatment as elicitor of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Seed Science and Technology*, 42(2), 132-149.
- Pacheco, A. A. 2013. Alteraciones en el perfil de terpenoides en olivo (*Olea europaea* L.) como respuesta a la inoculación con *Verticillium dahliae*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. Pp. 92.
- Pane, C., Fratianni, F., Parisi, M., Nazzaro, F., y Zaccardelli, M. 2016. Control of *Alternaria* post-harvest infections on cherry tomato fruits by wild pepper phenolic- rich extracts. *Crop Protection*, (84), 81-87.
- Pastor, F.J., y Guarro, J. 2008. *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(14), 734- 746.
- Pensado, M.I. 2014. Evaluación de Biolet en la resistencia de tomate a *Phytophthora infestans*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de la Coruña. La Coruña, España. Pp. 27.
- Pillai, CK, Paul, W. y Sharma, CP (2009). Polímeros de quitina y quitosano: química, solubilidad y formación de fibras. *Progreso en la ciencia de los polímeros*, 34 (7), 641-678.
- Raybaudi-Mansilla, R.M., Fortuna, R.S., y Belloso, O.M. 2006. *Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas*. I Simposio Ibero-Americano de Vegetales Frescos Cortados, 15-21, San Pedro, SP Brasil.
- Reyes, M. 2016. Control de tizón en tomate industrial mediante un sistema de alerta temprana. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, 71(338), 70.
- Rivas, M. L., y Mühlhause, M. 2014. *Alternaria* spp. *Revista Chilena de Infectología*. 31(5), 605-606.
- Rodriguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., y Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de microbiología*, 47(1), 72-77.
- Rojas, J., Hernández, C., y Trujillo, D. 2014. Effect of the alkaline treatment condition on the tableting performance of chitin obtained from shrimp heads. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 8(7), 211-219.
- Romero-de la Fuente, I. 2009. Metabolismo de los fenilpropanoides y proteínas relacionadas con la patogénesis en el mecanismo de respuesta de uva de mesa ("*Vitis vinífera*" L.CV. Cardinal) a elevadas concentraciones de CO₂ y bajas temperaturas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. Pp. 232.
- Ruelas C., M.E. Tiznado-Hernández, A. Sánchez-Estrada, M.R. Robles-Burgueño and R. Troncoso-Rojas. 2006. Changes in phenolic acid content during *Alternaria alternata* infection in tomato fruit. *Journal of Phytopathology* 154(4), 236-244.
- Ruelas-Villaseñor, C. 2004. Ácidos fenólicos en tomate y su relación con el desarrollo de la pudrición negra. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. Pp. 81.

- SADER.2019. Reporte del mercado de tomate rojo. <https://www.inforural.com.mx › uploads › 2019/06>
- SAGARPA. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. <https://www.gob.mx/agricultura/acciones-y-programas/planeacion-agricola-nacional-2017-2030-126813>
- Samaniego-Gámez, B., Reyes-Ramírez, A., Moreno-Valenzuela, O., y Tun-Suárez, J. 2017. Resistencia sistémica inducida contra virus con la rizobacteria *Bacillus* spp. Revista Protección Vegetal, *1*(32), 10-22.
- Sánchez-Estrada, A., Tiznado-Hernández, M. E., Ojeda-Contreras, A. J., Valenzuela-Quintanar, A. I., y Troncoso-Rojas, R. 2009. Induction of enzymes and phenolic compounds related to the natural defense response of netted melon fruit by a bio-elicitor. Journal of Phytopathology, *157*(1):24-32.
- Sanvicente-Benedico, I. (2015). Caracterización de los antioxidantes naturales presentes en el tomate rosa de Barbastro y determinación de su valor nutritivo y funcional. Universidad de Zaragoza, escuela politécnica superior (Huesca), España.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible, *7*(1), 153-170.
- Shinde, B. A., Dholakia, B. B., Hussain, K., Panda, S., Meir, S., Rogachev, I. 2017. Dynamic metabolic reprogramming of steroidal glycol-alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis may impart early blight resistance in wild tomato (*Solanum Arcanum* Peralta). Plant Molecular Biology, *95*(4–5), 411–423.
- SIAP. (2019). Avance de Siembras y Cosechas-Resumen nacional por cultivo. SERVICIO DE INFORMACION AGROALIMENTARIA Y PESQUERA. Consultado de: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do
- Sierra, D. M. E., Orozco, C. P. O., Rodríguez, M. A. Q., y Villa, W. A. O. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. Scientia et technica, *18*(1), 260-266.
- Slimestad, R. y Verheul, M. (2009). Revisión de flavonoides y otros fenólicos de frutos de diferentes cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista de ciencia de la alimentación y la agricultura, *89*(8), 1255-1270.
- Singleton, V. L y Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture, *16*, 144-158
- Sivan, A., y Chet, I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, *135*(3), 675-682.
- Yahaya, SM. (2019). Review of Post-Harvest Losses of Fruits and Vegetables. Biomedical Journal of Scientific and Technical Research, *13*(4), 10192-10200
- Smith, J.E., Mengesha, B., Tang, H., Mengiste, T., y Bluhm, BH. 2014. Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* involves widespread transcriptional reprogramming. BMC Genomics, *15*(1), 334.
- Squeglia, F., Berisio, R., Shibuya, N., y Kaku, H. 2017. Defense Against Pathogens: Structural

Insights into the Mechanism of Chitin Induced Activation of Innate Immunity. *Current Medicinal Chemistry*, 24(36), 3980–3986.

- Suárez-Peréz, Y., García-Pulpeiro, O. y Cueto-León, M. (2005). Diseño y validación de un nuevo método para estimar reductores hidrosolubles asociados con la quitina. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. *Revista Cubana de Farmacia*, 3(19).
- Sun, C., Fu, D., Jin, L., Chen, M., Zheng, X. y Yu, T. 2018. La quitina aislada de la pared celular de la levadura induce la resistencia de la fruta del tomate a *Botrytis cinerea*. *Carbohydrate Polymers*. 199, 341–352.
- Tan, S., Khor, E., Tan, T. y Wong S. 1998. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, 45, 713-719.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147-157.
- Troncoso-Rojas, R., y Tiznado- Hernández, M.E. 2014. *Alternaria alternata* (black rot, black spot) Postharvest Decay of Fruits and Vegetables: Control Strategies. S. Bautista-Baños (Editor). Elsevier, Inc. USA. 147-188.
- Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., Carvallo, T., González-León, A., Ojeda-Contreras, J., Aguilar-Valenzuela, A., y Tiznado-Hernández, M. E. 2013. A fungal elicitor enhances the resistance of tomato fruit to *Fusarium oxysporum* infection by activating the phenylpropanoid metabolic pathway. *Phytoparasitica*, 41(2):133-142.
- Trouvelot, S., Héloir, M.C., Poinssot, B., Gauthier A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdá, L., Daire, X. y Adrian, M. 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science*. 5, 592.
- Valle-Sotelo, E. 2019. Fragmentos de quitina aislada de *Alternaria alternata* como inductores del mecanismo de defensa enzimático en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. Pp. 72.
- Sanvicente-Benedico, I. (2015). Caracterización de los antioxidantes naturales presentes en el tomate rosa de Barbastro y determinación de su valor nutritivo y funcional. Universidad de Zaragoza, escuela politécnica superior (Huesca), España.
- Vanitha, S. C., Niranjana, S. R., y Umesha, S. (2009). Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host resistance to bacterial wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 157(9), 552-557.
- Wang, A., Lou, B., Xu, T. y Lin, C. (2011). Respuestas de defensa en frutos de tomate inducidas por oligandrina contra *Botrytis cinerea*. *Revista africana de biotecnología*, 10 (22), 4596-4601.
- Wang, F., Feng, G., y Chen, K. 2009. Defense response of harvest tomato fruit to burdock fructooligosaccharide a novel potencial elicitor. *Postharvest Biology and Technology*, 52(1), 110-116.
- Wang, Z., Li, J., Liu, J., Tian, X., Zhang, D., & Wang, Q. (2021). Management of blue mold (*Penicillium italicum*) on mandarin fruit with a combination of the yeast, *Meyerozyma guilliermondii* and an alginate oligosaccharide. *Biological Control*, 152, 104451.

- Wei, Y., Zhou, D., Peng, J., Pan, L., y Tu, K. 2017. Hot air treatment induces disease resistance through activating the phenylpropanoid metabolism in cherry tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(36), 8003 – 8010.
- Weir, T. L., Huff, D. R., Christ, B. J., y Romaine, C. P. (1998). RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia*, 90(5), 813-821.
- Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P., y Hein, I. 2014. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science*, (5), 655.
- Wu, T. (2004). Producción y caracterización de quitina y quitosana fúngica. (Master of Science), University of Tennessee, Knoxville.
- Xue, D., Li, C., Xie, Z., y Staehelin, C. 2019. LYK4 is a component of a tripartite chitin receptor complex in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 70(19), 5507-5516.
- Yang, X., y Jiang, X. 2015. Antifungal activity and mechanism of tea polyphenols against *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology letters*, 37(7), 1463 – 1472.
- Zhao, X., Wang, M., Wang, W., Liu, Q., Li, J., y Yin, H. 2019. The application of chito/chitin oligosaccharides as plant vaccines. *Oligosaccharides of Chitin and Chitosan*, 289-323.
- Zucker M. (1969). Induction of phenylalanine ammonia-lyase in xanthium leaf disks. Photosynthetic requirements and effect of daylength. *J Plant Physiol* 44, 912–922.