

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

ÁCIDOS FENÓLICOS EN TOMATE Y SU RELACIÓN
CON EL DESARROLLO DE LA PUDRICIÓN NEGRA

Por

CARLOS RAÚL RUELAS VILLASEÑOR

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE
ORIGEN VEGETAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

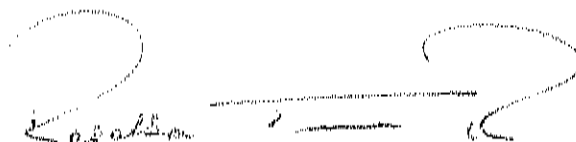
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

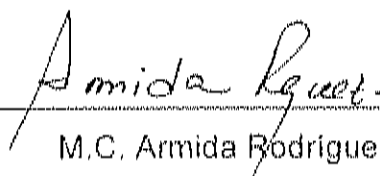
DICIEMBRE 2004

APROBACIÓN

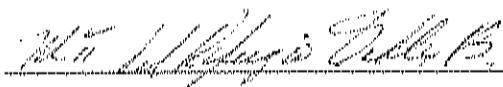
Los miembros del comité designado para revisar la tesis del Ingeniero Bioquímico Carlos Raúl Ruelas Villaseñor, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



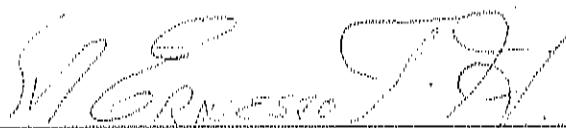
M.C. Rosalba Troncoso Rojas
Directora de Tesis



M.C. Armida Rodríguez Félix



M.C. Ma. del Refugio Robles Burgueño



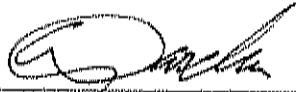
Dr. Martín Tiznado Hernández

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y se agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente.

Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización por escrito del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora, México.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, por la directora de la tesis.



Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director General

DEDICATORIA

A mi esposa Erika

Por ser la fuente de mi existir, la que siempre ha estado a mi lado, por amarme y porque nunca me has dejado caer.....TE AMO CIELO !!

A mis padres Sandra y Raúl

Por nunca dejar de apoyarme, por su incondicional amor y cariño y sobre todo creer en mí...Gracias Doña Furi y Don Rull!!

A mi hermano Mauricio y su esposa Karime

Por que sin el soporte de ustedes hubiera sido muy difícil llegar a donde estoy, además de darme a mi primer sobrino.....mauricio jr.

A Dios

Por que me permitiste culminar un proyecto más en mi vida....gracias señor.

A San Judas Tadeo

Por que me diste calma y paz cuando más lo necesite....muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su beca para la realización de esta tesis de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por permitir la realización de este trabajo en sus instalaciones.

Al la Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal (CAOV), que está a cargo del Dr. Martín Esqueda Valle, por recibirme en su infraestructura.

A mi asesora la M.C. Rosalba Troncoso Rojas por seguir creyendo en mí, por su invaluable paciencia y conocimiento ¡Muchas Gracias!

A mi comité de tesis M.C. Ma. del Refugio Robles Burgueño, Dr. Martín Tiznado Hernández y M.C. Armida Rodríguez Félix, por otorgarme un poquito de sus conocimientos.

A todo el personal de la CAOV, agradezco la colaboración de los M.C. Javier Ojeda, M.C. Reynaldo Cruz, M.C. Alfonso Sánchez, M.C. Alberto Sánchez, M.C. Jorge Mercado, M.C. Luis Robles, M.C. Elizabeth Peralta, Q.B. Ma. del Carmen Granados, QB. Olivia Briceño y QB. Francisco Soto por su ayuda en el manejo de técnicas y muestreos.

Al QB. Francisco Vázquez Ortiz por su valioso apoyo en la realización de la cromatografía líquida y por estar ahí cuando lo necesite, Gracias Güero!!

A las super VIP's Bárbara, Bego, Claudia (Riquis), Chayito, Lili y Majo por hacer de los momentos difíciles lo más divertido posible.....muchas gracias plebes!!.

A la Coordinación de Docencia, a la Dra. Ana Ma. Calderón de la Barca, Héctor Galindo y Ana Isabel Escobedo por su gran apoyo durante mi estancia en el programa de posgrado.

A todo el personal de la biblioteca, en especial a Luis Conde (Luizao) y Gerardo Reyna, ya que ustedes me sacaron de muchos apuros en la revisión bibliográfica.

A Alfonso Aguilar por su ayuda en el manejo de equipo de computo, la utilización del software y por la impresión de este trabajo.

Al M.C. Humberto González, por ayudarme a comprender la estadística de una manera más sencilla y aplicada....Gracias Queche!!

A mis compañeros de generación, Alejandra Barraza, Alejandro Pedraza, Alexis López, Alma Rosa López, Ana Luque, Andrés Mendoza, Angélica Pérez, Bárbara Velasco, Begonia Silva, Claudia Galindo, Edith Valbuena, Fernando Ayala, Fernando Barredo, Gabriela Alcalá, Ilce Espinoza, Imelda Monroy, Iván Jiménez, Javier Rodríguez, Karla Jara, Liliana Rodríguez, Marco Antonio López, María José Macías, Mario Beltrán, Noe Ontiveros, Pablo Ayala, Raquel Huerta, Rodolfo Cisneros, Rosario Vega y Victoria Ruvalcaba porque bueno o malo todos aprendimos algo de todos.

A Ilce y Javier por compartir experiencias y sueños, además de ser mis padrinos de boda, gracias a ustedes, ya que siempre estuvieron para apoyarnos.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Hongos y Productos Hortícolas: Amparo Meza, Andrés Ochoa, Aldo Gutiérrez y Citlalli Harris gracias por hacer un ambiente de trabajo más agradable.

A la Dra. María Luisa García por su invaluable amistad, cariño y respeto brindado tanto para mí como a mi esposa....gracias nina!!.

Y como siempre no puedo dejar de agradecer a mis grandes amigos (Hermanos) Juan Francisco Félix (Orejón), Gildardo Morales (Compadre), Flavio Moyeda (Cochón) y Oscar Gordillo (Fly), ya que sin ellos mi vida no hubiera sido la misma.

*Fueron entonces los niños y los viejos los sabios del reino y los jóvenes el acto, la acción, el regocijo de consejos y haceres. No se culpó más al espontáneo, ni fue mal interpretado. Los colores fueron los que solo en sueños. " **No recuerdo a bien cuando sucedió todo esto, sin embargo supe siempre que lo compartí, no estaba solo**". De todos ellos no recuerdo más que su mirada y sus perfiles que de hito en hito en mi memoria se grabaron. Sonreímos tantas veces juntos que no me parecen extrañas sus risas, tu risa. De aquellos que quedan las horas que ahora son fábulas y cuentos, pequeños milagros que dan los grandes remedios. No marcó el tiempo en vano sus líneas y espacios, que me acuso de olvidarme con frecuencia de todo aquello. Y son estas líneas para ayudarme a recordar como son también tu mirada, tu perfil y tu sonrisa, porque al compartir no estoy solo y tú tampoco. Quisiera platicarte tantas cosas, pero son aromas, son colores que se soñaron, dolor de pies cansados. Nunca entonces preguntaron porque era el estar y la vivencia y la única respuesta. Y las pasiones salieron a las calles disfrazadas de nombres; hombres que llegaron hasta el mar y se rompieron para bailar, bailar y bailar por horas y horas esperando a los héroes, sin saber que los héroes estaban ahí llenos de deseo. Ese deseo animal que ata a las personas para siempre y nunca deja caer a los amantes. Aquellos amantes que se cobijaron ante Dios y juraron amar, amar y amar hasta la última gota y en todas partes hasta la muerte, con locura, con suavidad, lentamente dejando que los cielos se vaciaran sobre la tierra, y se bebieron las lluvias, nunca entonces pudo errarse el camino, pues era uno, el mismo. Todo en un solo día que no acabo con la noche ni con el día y para quienes no lo comprendían había llegado la nueva era.....*

Los Amantes de Lola (1991).

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Importancia Económica del Tomate y su Manejo Poscosecha.....	2
Enfermedades Micóticas Poscosecha del Tomate.....	4
Desarrollo de enfermedades micóticas.....	5
Taxonomía de <i>Alternaria alternata</i>	6
Podrición negra.....	9
Mecanismos de Defensa de Tejidos Vegetales en Respuesta al Ataque por Fitopatógenos.....	12
Síntesis y metabolismo de ácidos fenólicos.....	14
Actividad Antimicótica de los Ácidos Fenólicos.....	16
Mecanismo de Acción de los Ácidos Fenólicos.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	23
General.....	23
Particulares.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Material Vegetal.....	24
Preparación del Inóculo.....	24
Efecto de la Inoculación con <i>A. alternata</i> sobre el Contenido de Ácidos Fenólicos en Frutos de Tomate.....	24
Extracción de Ácidos Fenólicos.....	27
Análisis Cromatográfico de los Ácidos Fenólicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	27

Identificación de ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de frutos de tomate sanos e infectados por <i>A. alternata</i>	28
Cuantificación de ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de frutos de tomate sanos e infectados por <i>A. alternata</i>	30
Elaboración de curvas de calibración.....	30
Actividad Antimicótica <i>In Vitro</i> de Ácidos Fenólicos.....	30
Diseño Experimental.....	33
Efecto de la inoculación con <i>A. alternata</i> sobre el contenido de ácidos fenólicos en frutos de tomate.....	33
Actividad antimicótica <i>in vitro</i> de ácidos fenólicos.....	34
RESULTADOS.....	35
Análisis Cromatográfico de los Ácidos Fenólicos por CLAR.....	35
Curvas de calibración.....	35
Identificación de ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de frutos de tomate sanos e infectados por <i>A. alternata</i>	38
Cuantificación de ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de frutos de tomate sanos e infectados por <i>A. alternata</i>	41
Actividad Antimicótica de Ácidos Fenólicos.....	60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Producción, volumen y valor de las exportaciones de tomate rojo en el periodo de 1991-2003.....	3
2. Contenido de ácido clorogénico en hojas sanas e infectadas de manzanas cv. "Golden Delicious Weinsberg" y "Golden Delicious Clone B".....	20
3. Distribución de lotes (Tratamientos) de la inoculación de frutos de tomate con esporas de <i>A. alternata</i>	25
4. Condiciones del gradiente de elusión para la detección de ácidos fenólicos.....	29
5. Volúmenes para la elaboración de la mezcla de estándares comerciales de ácidos fenólicos.....	31
6. Distribución de los tratamientos para determinar la actividad antimicótica de los ácidos fenólicos.....	32
7. Tiempos de retención (t_R) y coeficientes de regresión (R^2) de estándares de ácidos fenólicos.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esporas de <i>Alternaria alternata</i> y su crecimiento en agar papa dextrosa.....	8
2. Proceso de infección de <i>Alternaria alternata</i>	10
3. Infección de <i>Alternaria alternata</i> en frutos de tomate.....	11
4. Síntesis de fenoles en tejidos vegetales.....	15
5. Estructura de diferentes ácidos fenólicos.....	17
6. Mecanismo de acción de los fenoles.....	22
7. Diagrama de flujo del bioensayo.....	26
8. Cromatograma (CLAR) de estándares de ácidos fenólicos.....	36
9. Cromatograma (CLAR) de los ácidos fenólicos en epicarpio (a) y mesocarpio (b) de tomate sano.....	39
10. Cromatograma (CLAR) de los ácidos fenólicos en epicarpio (a) y mesocarpio (b) de tomate infectado.....	40
11. Contenido de ácido vanílico en epicarpio de tomate sano e infectado por <i>A. alternata</i> durante almacenamiento a 25°C.....	42

12. Contenido de ácido vanílico en mesocarpio de tomate sano e infectado por <i>A. alternata</i> durante almacenamiento a 25°C.....	44
13. Contenido de ácido caféico en epicarpio de tomate sano e infectado por <i>A. alternata</i> durante almacenamiento a 25°C.....	47
14. Contenido de ácido caféico en mesocarpio de tomate sano e infectado por <i>A. alternata</i> durante almacenamiento a 25°C.....	48
15. Contenido de ácido clorogénico en epicarpio de tomate sano e infectado por <i>A. alternata</i> durante almacenamiento a 25°C.....	51
16. Contenido de ácido clorogénico en mesocarpio de tomate sano e infectado por <i>A. alternata</i> durante almacenamiento a 25°C.....	52
17. Contenido de ácidos fenólicos libres totales en epicarpio de tomate sano e infectado por <i>A. alternata</i> durante almacenamiento a 25°C.....	55
18. Contenido de ácidos fenólicos libres totales en mesocarpio de tomate sano e infectado por <i>A. alternata</i> durante almacenamiento a 25°C.....	57
19. Porcentaje de efectividad de los fenoles (%EF) a una concentración de 25 mM sobre la germinación de esporas de <i>Alternaria alternata</i>	61
20. Porcentaje de efectividad de los fenoles (%EF) a una concentración de 50 mM sobre la germinación de esporas de <i>Alternaria alternata</i>	63
21. Porcentaje de efectividad de los fenoles (%EF) a una concentración de 100 mM sobre la germinación de esporas de <i>Alternaria alternata</i>	65

22. Porcentaje de efectividad de los fenoles (%EF) a una concentración de 200 mM sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata*..... 66

23. Porcentaje de efectividad de los fenoles (%EF) a una concentración de 500 mM sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata*..... 68

RESUMEN

En tomate existen varias dificultades en su manejo poscosecha entre los que destacan los daños causados por patógenos; sobresaliendo entre estos, el hongo *Alternaria alternata* (pudrición negra). Las plantas responden a la invasión por patógenos realizando cambios en su metabolismo, para sintetizar una variedad de compuestos implicados en los mecanismos de defensa. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos, que han sido reconocidos como potentes inhibidores de hongos en plantas bajo condiciones de laboratorio. El objetivo del presente trabajo fue analizar el perfil y el contenido de ácidos fenólicos en frutos de tomate como respuesta a la infección causada por *A. alternata*. Se utilizaron tomates rojos maduros cv, "Pinto", inoculados con una solución de *A. alternata* (4.32×10^6 esporas/mL) y se almacenaron durante 10 días a 25°C. Se separó y liofilizó el epicarpio y mesocarpio de los frutos. Se identificaron y cuantificaron los ácidos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se evaluó la actividad antimicótica in vitro de los ácidos fenólicos identificados en epicarpio y mesocarpio de tomate a concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 500mM tanto de forma individual como combinada sobre la germinación de esporas de *A. alternata*. Los resultados obtenidos indican la presencia de ácido vanílico, caféico y clorogénico tanto en epicarpio como en mesocarpio (sano e infectado) de frutos de tomate. Asimismo, el contenido de ácidos fenólicos libres fue mayor en el epicarpio infectado que en el epicarpio sano ($P \leq 0.05$); mientras que entre el mesocarpio sano e infectado no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$). Los extractos de epicarpio y mesocarpio fueron los que presentaron los porcentajes de inhibición de esporas arriba del 90%, con respecto a los ácidos fenólicos comerciales ($P \leq 0.05$). Individualmente los ácidos vanílico, clorogénico y caféico inhibieron la germinación por abajo del 86%. Siendo el ácido vanílico el que presentó los menores porcentajes de inhibición de esporas ($P \leq 0.05$); no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición del ácido clorogénico y caféico ($P > 0.05$). Sin embargo, al mezclar los tres ácidos fenólicos, se observó un efecto sinérgico en su actividad antimicótica, al presentar una efectividad mayor (85%-90%) con respecto a los ácidos fenólicos evaluados en forma individual ($P \leq 0.05$). Los resultados presentados en este trabajo, sugieren que ciertos ácidos fenólicos libres participan de una manera activa en el mecanismo de defensa de frutos de tomate, hacia hongos como *A. alternata*.

al presentar una efectividad mayor (85%-90%) con respecto a los ácidos fenólicos evaluados en forma individual ($P < 0.05$). Los resultados presentados en este trabajo, sugieren que ciertos ácidos fenólicos libres participan de una manera activa en el mecanismo de defensa de frutos de tomate, hacia hongos como *A. alternata*.

INTRODUCCIÓN

El tomate como la mayoría de los frutos, presenta un contenido elevado de agua (94-95%) que lo hace altamente perecedero (Jones *et al.*, 1993). En el tomate existen varios problemas de manejo postcosecha entre los que destacan los daños causados por fitopatógenos, siendo los hongos los principales agentes causantes de deterioro. Entre los principales hongos que afectan este fruto, se encuentran: *Alternaria* sp. (pudrición negra), *Botrytis* sp. (moho gris) y *Phytophthora* sp. (Suslow y Cantwell, 2000). Las infecciones por hongos pueden ocurrir durante la cosecha, manejo, almacenamiento, transporte y mercadeo, o después de que el consumidor ha comprado el producto (Báez-Sañudo *et al.*, 1998). Cuando un hongo fitopatógeno entra en contacto con algún órgano de una planta, se requiere de un conjunto de factores favorables, como humedad, temperatura, luz y patogenicidad del mismo para penetrar e infectar el tejido. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en frutos maduros, en algunos frutos jóvenes la enfermedad no se desarrolla, debido a la presencia de sustancias tóxicas para el hongo, impidiendo su germinación y crecimiento (Umaña-Rojas, 1998).

Las plantas responden a la invasión por fitopatógenos realizando cambios en su metabolismo, para sintetizar una variedad de compuestos implicados en el mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos (Matern y Kneusel, 1988; Dixon, 2001). Entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos que son uno de los principales metabolitos asociados con la resistencia contra microorganismos patógenos (Kosuge, 1969; Vidhyasekaran, 1997). Los ácidos fenólicos se han reconocido como potentes inhibidores de hongos en plantas bajo condiciones de laboratorio (DeWit y Kodde, 1981; Brindle *et al.*, 1983; Adesanya *et al.*, 1986; Southerton y Deverall, 1990; Cahill y McComb, 1992). Sin embargo, se conoce muy poco sobre el contenido de los ácidos fenólicos en frutos de tomate y si el tipo y contenido de éstos se modifica como respuesta al ataque de hongos fitopatógenos. Por lo que, en el presente trabajo se evaluaron los cambios en el perfil y en el contenido de ácidos fenólicos en frutos de tomate como respuesta a la infección causada por *Alternaria alternata*.

ANTECEDENTES

Importancia Económica y Manejo Poscosecha del Tomate

El tomate es uno de los productos hortícolas mexicanos más importantes (Chauvet y Massieu, 2001). La actividad hortofrutícola nacional genera 1'220,000 empleos, de los cuales 970 mil son directos (almácigos, preparación de terrenos, siembra, aplicación de agroquímicos, recolección, selección y empaque) y 250 mil son indirectos (distribución, transportación, semillas, material de empaque, agroquímicos y comercialización). El cultivo de esta hortaliza es un negocio de alta rentabilidad y es sumamente especulativo, si se combinan altos rendimientos con buenos precios en la temporada (Agroenlinea, 2001). La producción, volumen y valor de las exportaciones en el periodo de 1991-2003 se presentan en el **cuadro 1**.

Uno de los aspectos más importantes en cuanto a la derrama económica que genera este cultivo, es el uso intensivo de mano de obra que contribuye en buena medida al ingreso de las familias jornaleras. De esta manera se estima que para la producción de 75 000 has. de tomate se emplean alrededor de 172 mil jornaleros (Agroenlinea, 2001).

Las tecnologías para el manejo poscosecha son imprescindibles para mantener la calidad y propiedades nutrimentales con que se cosechan frutas y hortalizas. El deterioro de frutas y hortalizas en la etapa poscosecha es un grave problema que ocasiona cuantiosas pérdidas a productores, comerciantes y consumidores (Aragón, 1991).

El tomate se cosecha y se deposita en cajas y/o cubetas de plástico que son de fácil manejo, para después ser vaciados a contenedores de 500-5,000 Kg donde ocurren grandes pérdidas debido principalmente al golpeteo entre los frutos. De aquí son llevados a la empacadora donde se les realiza un lavado con agua clorinada (150-175 ppm); se da un rocío con agua y son limpiados con cepillos blandos, descartándose aquellos tomates dañados y sobremaduros (Báez-Sañudo, 1998).

Cuadro 1.- Producción, volumen y valor de las exportaciones de tomate rojo en el periodo 1991-2003.

Año	Producción (toneladas)	Volumen (miles de toneladas)	Valor (millones de dólares)
1991	1 860 350	392 157	428 381
1992	1 413 295	423 322	261 774
1993	1 692 651	219 261	166 895
1994	1 368 291	487 562	394 974
1995	1 935 470	458 555	394 568
1996	1 948 080	717 276	585 611
1997	1 875 697	754 299	539 850
1998	2 138 898	687 637	523 405
1999	2 385 535	759 128	638 145
2000	2 136 617	670 202	541 535
2001	2 284 145	689 997	466 199
2002	1 989 990	724 016	552 200
2003	2 148 130	1 182 655	902 000

Fuente: Agroenlinea, (2001); FAO, (2004).

Los tomates son clasificados por tamaño y color, colocados en cajas de cartón para el mercado internacional y en cajas de madera para el mercado nacional. Se almacenan a temperaturas entre 5-12°C con 85-90% de humedad relativa para su posterior distribución. Sin embargo, se debe de tener cuidado de no bajar la temperatura por debajo de los 5°C debido a que los frutos presentan daño por frío. Este desorden en los frutos de tomate se manifiesta como zonas acuosas, hendiduras, manchas, pardeamientos, inhibición o retraso en la maduración, decoloración interna, senescencia acelerada, producción de etileno y cambios en el sabor (Báez-Sañudo, 1998; Krarup, 2001). Se ha reportado que tomates en estado verde maduro almacenados a 12°C con 10% de oxígeno alcanzan una vida de anaquel de 67 días (Hobson y Davies, 1971); mientras que frutos rojos maduros alcanzan una vida de anaquel de 1 a 3 semanas a 10°C (Wills *et al.*, 1998).

Enfermedades Micóticas Poscosecha del Tomate

Las enfermedades en frutas y hortalizas provocadas por microorganismos son una causa importante de pérdidas poscosecha dependiendo de la estación, región y prácticas de manejo. Se estima que estas pérdidas pueden llegar hasta el 50% de la cosecha (Aragón, 1991; Suslow y Cantwell, 2000). Las principales fuentes de contaminación de frutas y hortalizas son: recipientes utilizados para la recolección, agua utilizada para preenfriamiento y limpieza, la atmósfera del centro de acopio, cepillos y bandas transportadoras del producto a través de su empaque ó cualquier tipo de daño mecánico que pueda favorecer su contaminación (Umaña-Rojas, 1998). Esto permite el desarrollo de lesiones y pudriciones en la superficie del tomate ocasionadas principalmente por hongos fitopatógenos como *Alternaria alternata* (pudrición negra), *Botrytis* sp. (pudrición por moho gris), *Phytophthora* sp., *Geotrichum* sp. (pudrición ácida) y *Rhizopus* sp. (pudrición algodonosa) (Snowdon, 1990).

Desarrollo de enfermedades micóticas

Los hongos fitopatógenos tienen la particularidad de esporular sobre tallos, hojas y partes florales senescentes; siendo llevadas a partes florales y frutos por la acción del viento y lluvias (Umaña-Rojas, 1998). Los hongos han desarrollado diversas estrategias de invasión para penetrar las distintas barreras que las hojas, tallos y raíces les han puesto; exhibiendo así, diferentes grados de especialización (Knogge, 1996). Por ejemplo, hifas del hongo *Cladosporium fulvum* incrementan en diámetro inmediatamente después de pasar a través de un estoma. Hongos vasculares como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* desarrollan y acumulan hifas primeramente antes de intentar penetrar a la célula de la planta (Mendgen *et al.*, 1996).

Durante el proceso de infección ocurre primeramente una adhesión de las esporas a la cutícula de los frutos mediante interacciones hidrofóbicas, seguida por la secreción de una película que protege a la espora y su tubo germinativo (Carver *et al.*, 1995). Si las condiciones son propicias, el tubo germinativo y la hifa se hinchan mediante la adición de glicoproteínas y polisacáridos (quitina, glucanos y melanina) a su pared celular formando un apresorio y así perforar la cutícula del fruto inmaduro (Knogge, 1996). La infección queda en estado latente debido a elevados niveles de compuestos antifúngicos presentes en el hospedero y se activa cuando estos compuestos bajan en concentración (Vidhyasekaran, 1997).

Otra forma de penetración de los hongos es por la secreción de enzimas como las cutinasas que degradan la capa más externa del fruto y otras enzimas como celulasas, pectinasas, hemicelulasas y proteasas. (Mendgen *et al.*, 1996; Vidhyasekaran, 1997). Pascholati *et al.* (1993), reportaron que *Colletotrichum graminicola* posee en la matriz extracelular de sus conidias distintas enzimas como cutinasas y esterases las cuales se ha demostrado que le ayudan a adherirse y degradar la cutícula de las hojas (Deissing *et al.*, 1992).

Así mismo, conidias de *Erysiphe graminis* (agente causal de pudrición en cebada) liberan un líquido el cual contiene cutinasas, que como se mencionó anteriormente, le ayudan a deteriorar la pared celular de la planta y así facilitar la penetración (Kunoh *et al.*, 1990).

Por otra parte, existe otro tipo de hongos que penetran los tejidos a través de fuerza mecánica (presión). Tal es el caso de *Magnaporthe grisea* y *Colletotrichum* sp. los cuales incorporan a la pared de sus apresorios, una capa de melanina para generar una presión más fuerte que le permita penetrar la cutícula del hospedero. En apresorios de *M. grisea* se ha logrado medir una presión de 8.0 MPa (Howard *et al.*, 1991). En el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum musae*, agentes causales de deterioro en productos hortícolas como tomate, aguacate, mango, papaya, plátano, entre otros, utilizan como señal la hormona etileno para germinar y ramificarse a través del tejido (Flaishman y Kolattukudy, 1994).

Se ha visto que *A. alternata* posee ambos mecanismos de penetración, ya que posee las enzimas necesarias para degradar las paredes celulares de plantas y frutos, y también produce la formación de apresorios para atravesar las cutículas mediante fuerza mecánica (Rotem, 1998).

Taxonomía de *Alternaria alternata*

El hongo *Alternaria alternata* puede ser encontrado en un amplio rango de materiales y productos. Como especies saprófitas pueden deteriorar alimentos y forrajes produciendo micotoxinas. Asimismo, pueden reducir el rendimiento de cosechas y afectar diferentes productos hortícolas durante su almacenamiento (Andersen, 2001).

A. alternata es la especie más saprófita del género. Sus conidias se desarrollan en forma de cadenas largas y sus septas pueden crecer tanto longitudinal como transversalmente (Pitt y Hocking, 1999). Produce cadenas de 10

o más conidios muy ramificadas a partir de conidióforos cortos; la ramificación de los conidios surge de conidióforos secundarios desde células conidiales basales o apicales (Andersen, 2001).

Su crecimiento óptimo es de 25 a 28°C, sin embargo, se ha reportado que el hongo creció a temperaturas mínimas de -5 a 6.5°C y máximas de 36°C. *A. alternata* puede crecer en un amplio rango de pH (2.7-8.0), siendo su pH óptimo entre 4 y 5.4. La temperatura óptima de esporulación es de 27°C pero es inhibida por debajo de 15°C o arriba de 33°C. La actividad de agua mínima para su desarrollo es 0.88 y la óptima casi 1.00. Su desarrollo se ve reducido a la mitad en una atmósfera con mas de 15% de CO₂ o con menos de 2.8% de O₂ (Hasija, 1970; Pitt y Hocking, 1999).

Su crecimiento en agar papa dextrosa al principio es de color blanco como algodón, pero se vuelve de un color verde olivo oscuro con un borde blanco dentro de las primeras 48 horas. Después, la colonia se extiende por toda la placa, con una esporulación abundante volviéndose de un color casi negro. Sus conidióforos son de color verde olivo a café y septado. Las conidias son de un color olivo claro o café oscuro, usualmente con tres o cinco septas (**Figura 1**) (Jones *et al.*, 1993).

Este hongo es capaz de producir distintas toxinas como el ácido tenuazóico, alternariol monometil eter, altenuena, altertoxina I y II, las cuales han sido encontradas en tomates, manzanas (Ozcelic *et al.*,1990), naranjas, limones (Stinson, 1981) y cebada (Sanchis *et al.*,1993). Ya sea como *A. alternata* o *A. tenuis* ha sido reportado como el principal fitopatógeno en frutos de tomate (Jones *et al.*,1993; Pitt y Hocking, 1999). También ha sido reportado en berenjenas y pimientos, (Snowdon, 1990), manzanas y plátanos almacenados en atmósferas modificadas (Wade *et al.*, 1993); Además es capaz de infectar vegetales frescos como coliflor, pepino, melones, chícharos y papas (Snowdon, 1990).

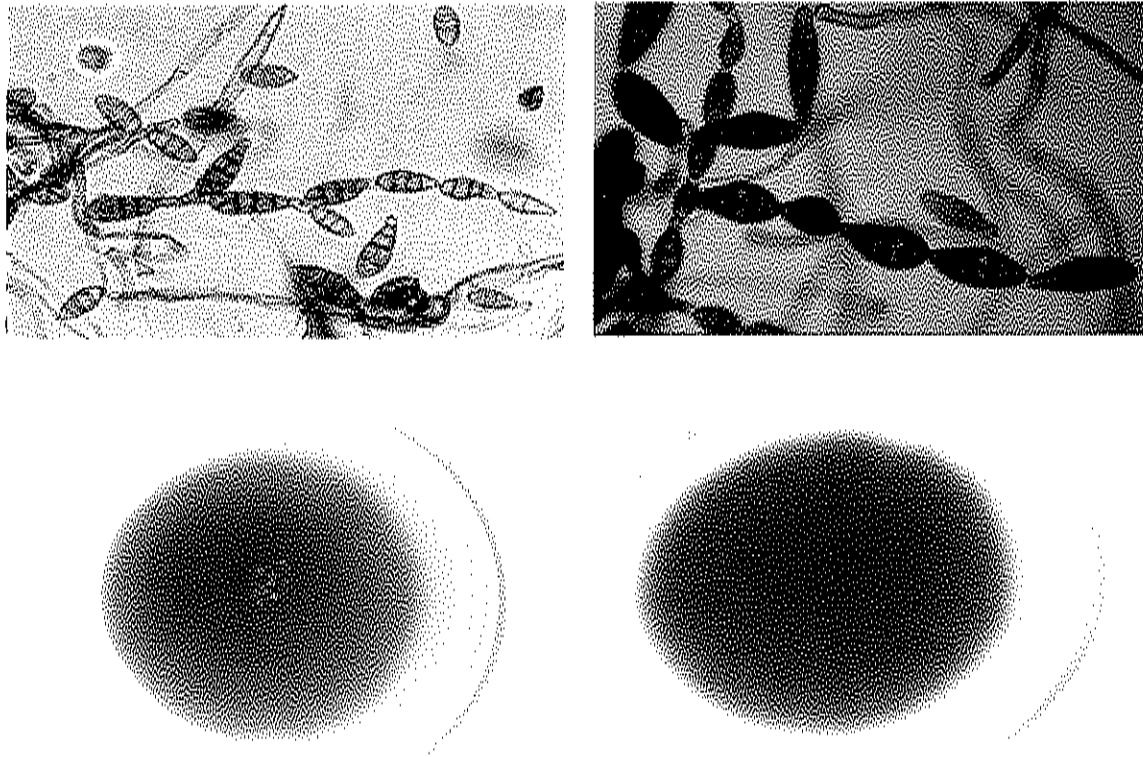


Figura 1. Esporas de *Alternaria alternata* y su crecimiento en agar papa dextrosa.

Pudrición negra

La pudrición negra es causada por el hongo *A. alternata* que es muy común encontrarlo en aire y suelo, donde puede sobrevivir por lo menos 13 meses en los residuos de tomates infectados (**Figura 2**). La temperatura óptima para el desarrollo de este hongo es aproximadamente 28°C; sin embargo puede crecer a temperaturas frías (7 y 10°C), las cuales son recomendadas para el almacenamiento de tomates maduros (Snowdon, 1990).

El proceso de infección comienza cuando las esporas son llevadas por el viento hacia frutos sanos o cuando los frutos tienen contacto con el suelo infestado. La pudrición puede empezar mediante heridas causadas por insectos, al término de la floración, por debilitamiento del tejido, después de lluvias o una sobre irrigación (Jones *et al.*, 1993) ó por cualquier tipo de daño mecánico que sufra el fruto durante su manejo (Umaña-Rojas, 1998).

Esta enfermedad se caracteriza por manifestarse en tomates completamente maduros o "estresados". El estrés se debe a cambios bruscos de temperatura durante el tiempo de cosecha o cuando están expuestos directamente a la luz del sol (Jones *et al.*, 1993).

Las lesiones comienzan como zonas hundidas o áreas aplanadas y algunas veces con apariencia acuosa. Tiene márgenes definidos extendiéndose hacia el centro de los frutos. El exterior de las áreas infectadas son de color café oscuro o negro, mientras que dentro de las cavidades del tejido son de color gris oscuro o negro (Goulg, 1991).

Cuando los frutos son almacenados bajo condiciones de humedad alta, las lesiones se vuelven densas de un color gris oscuro, verde olivo o negro indicando la presencia de conidióforos y esporas (Jones *et al.*, 1993). La mayoría de las lesiones se encuentran alrededor de la cicatriz peduncular, aunque también se pueden desarrollar en cualquier parte del fruto, dependiendo del tipo de daño que sufrió el fruto (**Figura 3**) (Snowdon, 1990).

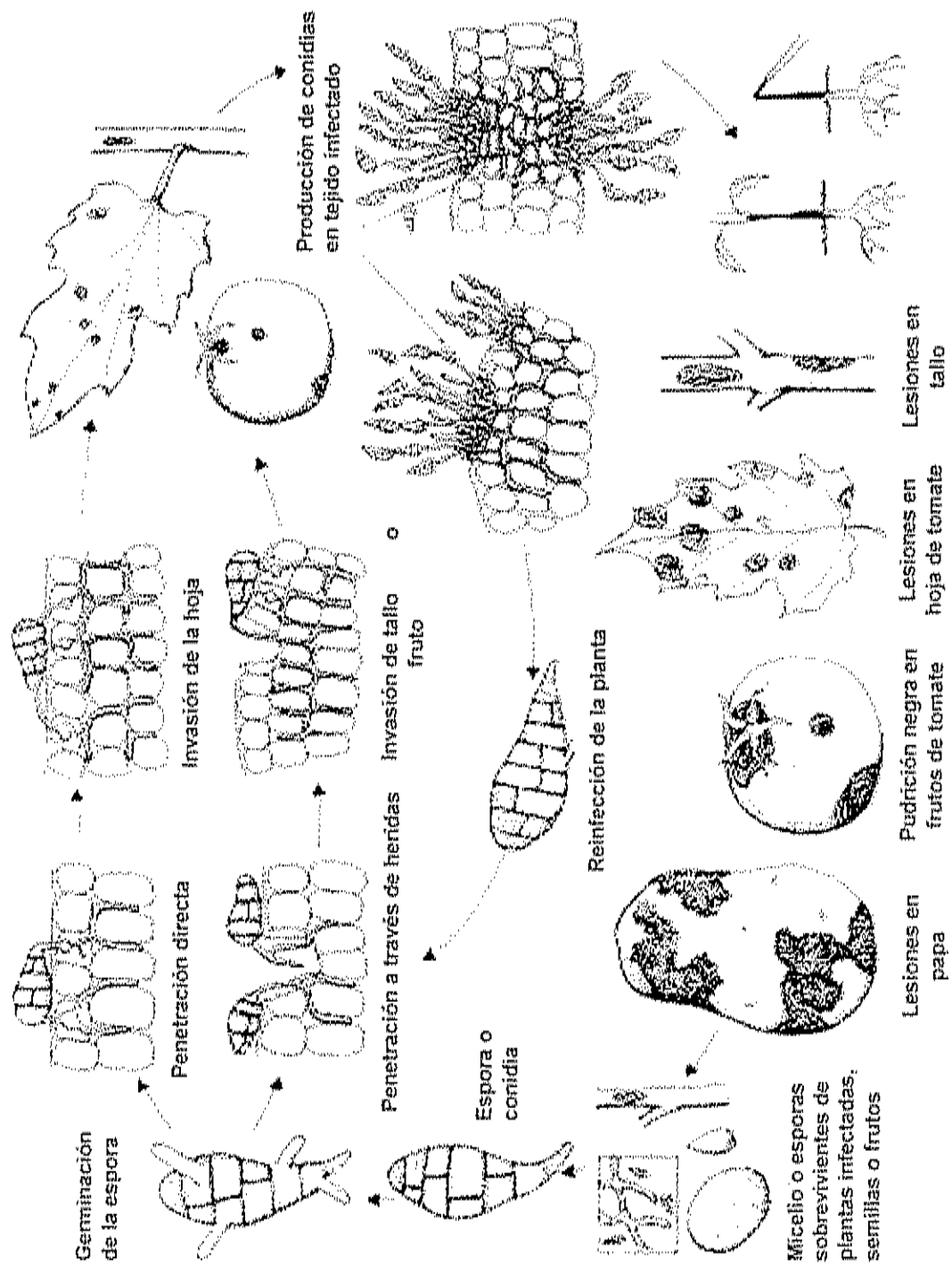


Figura 2. Proceso de infección de *Alternaria alternata*.

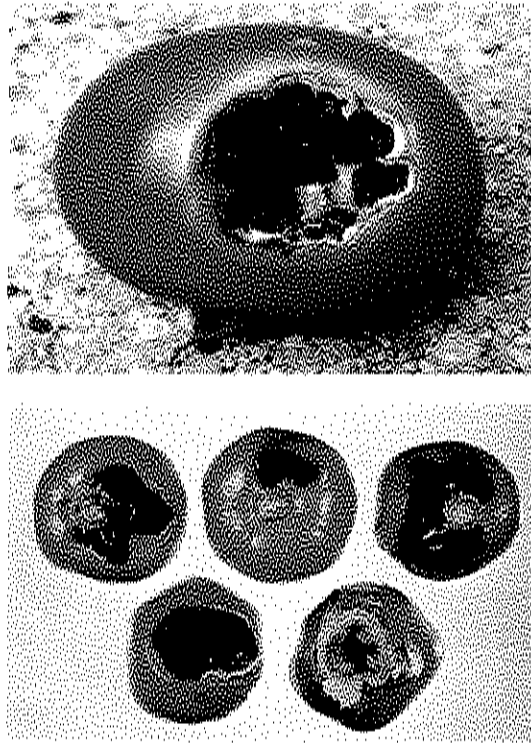


Figura 3. Infección por *Alternaria alternata* en frutos de tomate.

Mecanismos de Defensa en Tejidos Vegetales en Respuesta al Ataque por Fitopatógenos

Las plantas se encuentran expuestas al ataque por bacterias, virus y hongos. Debido a esto, cada planta sintetiza una variedad de compuestos antimicrobianos que matan al fitopatógeno o restringen su desarrollo intracelular (Snyder y Nicholson, 1990). Éstos compuestos son metabolitos secundarios que provienen del metabolismo normal de la planta, pero que no son esenciales para su funcionamiento. La mayoría de ellos son derivados de fenilpropanoides y de otros caminos metabólicos de ácidos grasos ó alcaloides (Vidhyasekaran, 1997; Dixon, 2001). Éstos pueden estar presentes en su forma activa o ser almacenados como precursores inactivos, los cuales serán convertidos a su forma activa por medio de enzimas en respuesta al ataque por fitopatógenos u otro tipo de estrés (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

En general, casi todos los compuestos antimicrobianos se encuentran en vacuolas y otro tipo de organelos en plantas sanas. Sin embargo, la liberación de los compuestos antimicrobianos en nivel o tipo hacia un hongo fitopatógeno varía dependiendo del tipo de planta (hospedero), edad del cultivo y condiciones ambientales (Osbourn, 1996).

Después de que los hongos penetran en las plantas, éstas activan su segunda línea de defensa, produciendo suficientes cantidades de compuestos para inhibir el proceso de infección (Matern y Kneusel, 1988). Esta producción comienza por una elevada síntesis *de novo* de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), ácido cinámico 4-hidrolasa (Ca4H), 4-cumarato Coa ligasa (4CL), chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI) y requiere por lo menos de seis a diez horas para alcanzar su máximo rango (Dixon, 1986; Collinge y Slusarenko, 1987).

Estos compuestos inhibitorios de microorganismos patógenos constituyen un grupo muy heterogéneo de sustancias, que incluyen: isoflavonoides (Leguminosas), estilbenos (Vitáceas y Leguminosas), cumarinas, fenoles (Solanáceas), dihidroxifenantrenos, sequiterpenos (Solanáceas), diterpenos y

poliacetilenos (Ebel, 1986; Vidhyasekaran, 1997; Dixon, 2001). Sin embargo, una misma planta puede tener diferentes tipos de fitoalexinas. Por ejemplo, en tomate se han identificado poliacetilenos como el falcarindiol y falcarinol, y el sequiterpeno risitina (DeWit y Kodde, 1981) y varios compuestos fenólicos mencionados previamente (Buta y Spaulding, 1997).

Snyder y Nicholson (1990), observaron la producción de apigeninidina y luteolinidina, una clase de flavonas en plántulas de sorgo (*Sorghum vulgare*) en respuesta a la infección por *Colletotrichum graminicola* acumulándose en las células expuestas al ataque del fitopatógeno formando vesículas de color rojo oscuro. Éstas migraron al sitio adjunto del apresorio, se unieron y liberaron su contenido en las células hospederas. En el caso de las dicotiledóneas se ha visto que las fitoalexinas son producidas en células sanas, que después son liberadas y acumuladas en el tejido infectado (Brindle *et al.*, 1983; Ebel, 1986).

Diversos investigadores estudiaron la producción de metabolitos de defensa en cebolla (*Allium cepa*) inoculada con distintas cepas de *Botrytis*, encontrando la producción de nueve compuestos antimicóticos llamados tsibulinas. Las tsibulina 1 y 2 no fueron detectadas en extractos de tejido sano fresco, congelado o deshielado. Pero al inocular los bulbos con *Botrytis allii* y *Botrytis cinerea* (10^3 - 10^5 conidia/mL) se observó un incremento en la producción de estos dos compuestos (Dmitriev *et al.*, 1988; Dmitriev *et al.*, 1990). En la planta *Cassia obtusifolia* se observó un incremento en el contenido del flavonoide 2-(*p*-hidroxifenoxi)-5,7-dihidroxicromona como respuesta a la infección por *Alternaria cassiae*. Al aplicar este flavonoide de manera *in vitro* a concentraciones de 0.3 mM se observó una inhibición del crecimiento de *Alternaria cassiae* (Sharon *et al.*, 1992).

En la década de los ochentas, Hahn *et al.* (1985) observaron que en raíces de frijol soya resistentes a *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, se acumulaba la fitoalexina gliceolina después de dos horas de inoculación. Mientras, que en plantas susceptibles al fitopatógeno la acumulación de gliceolina se daba después de doce horas después de inoculación.

En otro estudio, Krämer *et al.* (1984), evaluaron la actividad antimicótica *in vitro* de cuatro isoflavonas de frijol soya (György-isoflavona, daidzeína, gliciteína y formononetina) a diferentes concentraciones sobre el crecimiento micelial de *Apergillus ochraceus*, *Penicillium digitatum* y *Fusarium culmorum*. Los autores observaron que la concentración de 8×10^{-4} mol/L inhibió el crecimiento de *A. ochraceus*; sin embargo, en los otros fitopatógenos se observó un estímulo en su crecimiento.

La presencia de compuestos fenólicos en las plantas o su síntesis en respuesta a una infección, ha sido asociada con la resistencia de las mismas hacia hongos fitopatógenos (Kosuge, 1969). Gayoso *et al.* (2004), reportaron un incremento en el contenido de ácidos fenólicos libres en raíces (de 250 a 366 $\mu\text{g/g}$ peso fresco) y hojas (de 649 a 1280 $\mu\text{g/g}$ peso fresco) de chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) después de cinco días posteriores a la inoculación con *Phytophthora capsici*.

Síntesis y metabolismo de ácidos fenólicos

Los fenoles en las plantas están representados por un amplio rango de estructuras químicas y se caracterizan por tener un núcleo bencénico en el cual se sustituye como mínimo un hidrógeno por un hidroxilo. En su síntesis participa la ruta del ácido siquímico (**Figura 4**) (Macheix *et al.*, 1990).

Esta ruta se inicia en los cloroplastos por condensación de eritrosa-4-fosfato con fosfoenolpiruvato (FEP), y por diversas reacciones se obtiene el ácido siquímico. La incorporación de una segunda molécula de FEP conduce a la formación de fenilalanina, que por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) se transforma en el ácido transcinámico. Posteriormente, el ácido cinámico es convertido en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático. La acción de una coenzima A ligasa lo transforma en *p*-cumaroil coenzima A, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal (Salisbury y Ross, 1994; Palazón *et al.*, 2003).

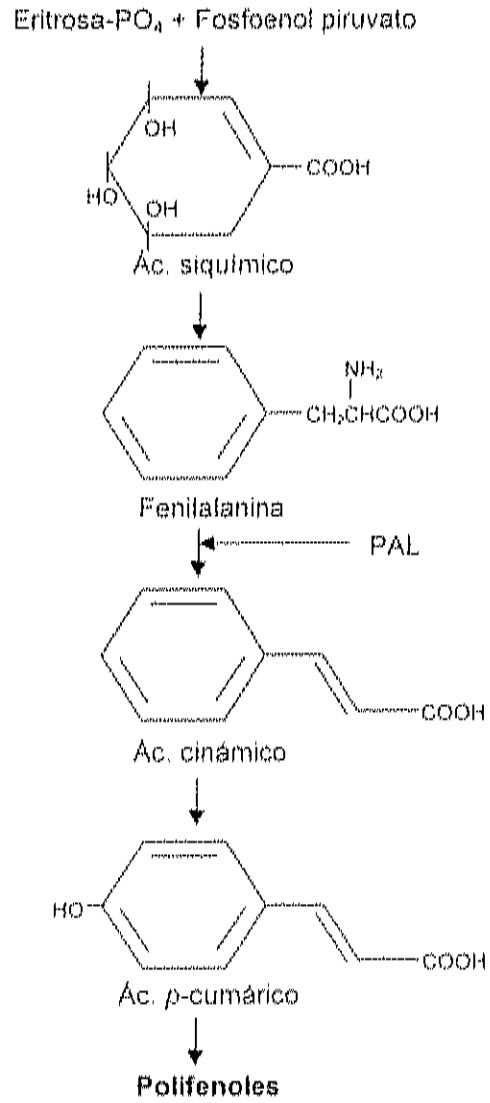


Figura 4. Síntesis de fenoles en tejidos vegetales (Palazón *et al.*, 2003).

Dentro de los compuestos fenólicos existen dos grandes grupos: los ácidos fenólicos y los flavonoides (isoflavonoides, flavonas, flavonoles, antocianinas y taninos). Se diferencian principalmente en que los ácidos fenólicos tienen un anillo único al que se le unen diversos grupos sustituyentes como hidroxilo, carboxilo y metilo, mientras que los otros están formados por más de dos anillos fenólicos (Croteau *et al.*, 2000).

Los ácidos fenólicos son derivados hidroxilados del ácido benzóico y del ácido cinámico. Los ácidos derivados del benzóico son el ácido protocatéico, gálico, vanillico, hidroxibenzóico y siringico. Mientras que los ácidos derivados del cinámico son caféico, ferúlico, *o*-cumárico, sináptico, y *p*-cumárico (**Figura 5**) (Mattila y Kumpulainen, 2002). Los compuestos fenólicos tienen gran capacidad de reaccionar con ácidos orgánicos y azúcares para obtener compuestos como ácidos fenólicos, flavonas y antocianinas o bien, con ellos mismos para formar polímeros (taninos) (Martínez de Toda, 2003).

En tomate los fenoles se han asociado principalmente al desarrollo de 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 *p*-cumárico, vanillico, caféico, ferúlico, hidroxibenzóico y clorogénico (Hobson y Davies, 1971; Buta y Spaulding, 1997; Mattila y Kumpulainen, 2002).

Actividad Antimicótica de los Ácidos Fenólicos

Los fenoles se encuentran localizados tanto en vacuola como en las paredes celulares de los frutos y se han relacionado con la resistencia a hongos fitopatógenos (Vidhyasekaran, 1997). En ciertos cultivos como papa, se ha reportado que el ácido clorogénico y el ácido caféico inhibieron el crecimiento de *Streptomyces scabies* (Johnson y Schaal, 1957). En hojas de tabaco también se han encontrado estos dos fenoles (Reuveni y Cohen, 1978). Se ha demostrado la actividad antimicótica del ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico sobre *Puccinia recondita* (Southerton y Deverall, 1990).

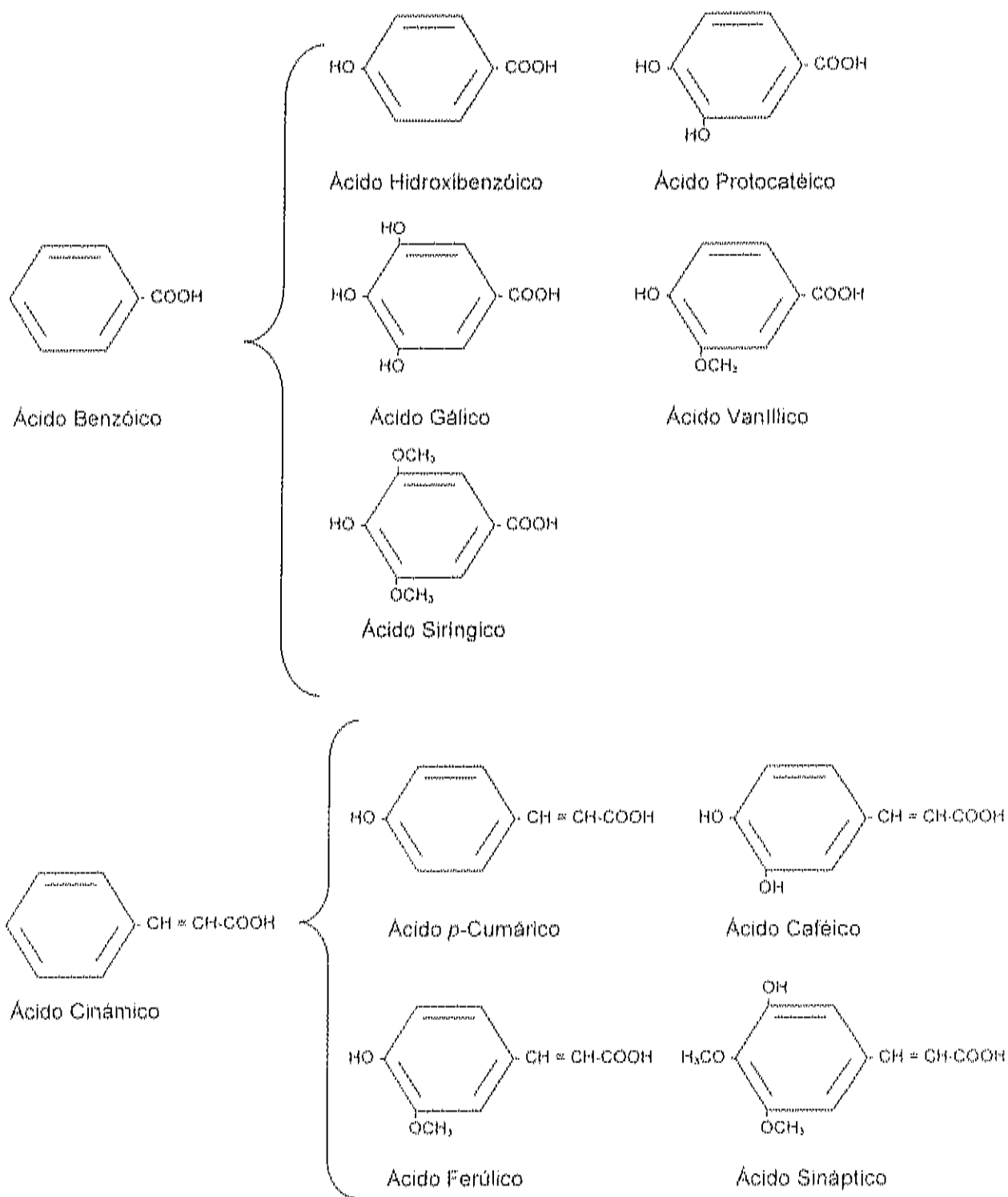


Figura 5. Estructura de diferentes ácidos fenólicos (Mattila y Kumpulainen, 2002).

Treutter y Feucht (1990), reportaron que el ácido clorogénico en manzana ayudó a la prevención de lesiones causadas por hongos. Años más tarde, Cahill y McComb en 1992, comprobaron que en raíces de eucalipto, los ácidos cinámico, *p*-cumárico, vanillico, ferúlico y caféico inhibieron por completo el crecimiento micelial *in vitro* de *Phytophthora cinnamomi*, a una concentración de 10 mM.

También se ha reportado que el ácido protocatéico es uno de los compuestos que previenen la enfermedad manchada en ciertas variedades de cebollas moradas, la cual es causada por *Colletotrichum circinans*. Este ácido se encuentra presente en las escamas del cuello de cebollas resistentes al fitopatógeno, pero está ausente en cebollas susceptibles y cuando se extrae y aplica directamente sobre el fitopatógeno, impide tanto la germinación de esporas como el crecimiento micelial *in vitro* (Salisbury y Ross, 1994).

Curir *et al.* (2003), evaluaron la composición de los ácidos fenólicos en dos variedades de clavel; "Roland" resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y la otra susceptible, "Gloriana". Los autores encontraron la presencia de los ácidos protocatéico y vanillico en los tejidos sanos e infectados de ambos cultivares, pero en distintas concentraciones. Además, reportaron una concentración de ácido protocatéico de 1.8 mg/g peso seco en el tejido sano del cultivar "Gloriana"; mientras que en el tejido infectado la concentración de este ácido aumentó a 4.5 mg/g p.s. En el caso del ácido vanillico, se reportó una concentración de 1.3 mg/g p.s. en tejido sano, la cual aumentó a 2.9 mg/g p.s. al inocular las plantas con *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. Este mismo comportamiento se observó en la variedad "Roland", en la cual la concentración del ácido protocatéico fue de 1.9 mg/g p.s. en tejido sano y 4.5 mg/g en tejido infectado; mientras que la concentración del ácido vanillico en tejido sano fue de 1.5 mg/g p.s. y 1.8 mg/g p.s. en tejido infectado. Por lo que los autores concluyeron que este aumento en el contenido de del ácido protocatéico y vanillico sea un mecanismo de defensa hacia *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*. Sin embargo, en el ensayo *in vitro*, el ácido protocatéico solamente logró disminuir un 2% el crecimiento micelial del fitopatógeno y el vanillico un 6%, a una concentración de 50 μ mol/L.

Recientemente, Mikulic-Petkovsek *et al.* (2003), estimaron el contenido de ácido clorogénico en hojas de manzana de las variedades "Golden Delicious Weinsberg" y "Golden Delicious Clone B", como respuesta a su infección con *Venturia inaequalis*, agente causal de la sarna en árboles de manzano, durante los meses de junio a septiembre del mismo año. Ellos observaron que las hojas infectadas presentaron concentraciones más elevadas de ácido clorogénico en contraste con las hojas sanas (**Cuadro 2**).

Existe evidencia que los isoflavonoides, otros derivados de los ácidos fenólicos, también tienen propiedades antimicóticas (Vidhyasekaran, 1997). La isoflavona biochanina A y sus isoflavononas mostraron una actividad antimicótica alta contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* a concentraciones de 0.8 mM (Weidenborner *et al.*, 1990). Adesanya *et al.* (1986), evaluaron *in vitro* la actividad antimicótica de diferentes isoflavononas, pterocarpanos e isoflavanos contra *Cladosporium cucumerinum*. Los más efectivos fueron los pterocarpanos e isoflavanos, debido posiblemente al radical dimetilalil que tienen en su estructura. Estas diferencias en sensibilidad se deben a que cada compuesto tiene una función diferente en la planta. Los isoflavonoides son capaces de atacar a hongos fitopatógenos afectando la porosidad de su membrana, inhibiendo ciertas enzimas o afectando directamente la transcripción del ADN (Adesanya *et al.*, 1986).

En el caso del tomate, solamente se han realizado estudios en planta. Retig y Chet (1974), aplicaron catecol a plantas de tomate y observaron una síntesis elevada en los fenoles totales, así como la eliminación de los síntomas causados por la infección de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Asimismo, Carrasco *et al.*, (1978) aplicaron ácido quínico y fenilalalina a plantas de tomate susceptibles al ataque de hongos fitopatógenos, encontrando un aumento, en los niveles de compuestos fenólicos y en su resistencia contra *Fusarium oxysporum*.

Cuadro 2. Contenido del ácido clorogénico en hojas sanas e infectadas de manzanas cv. "Golden Delicious Weinsberg" y "Golden Delicious Clone B".

Fecha	G.D. Weinsberg (mg/g peso fresco)		G. D. Clone B (mg/g peso fresco)	
	Sano	Infectado	Sano	Infectado
Junio	0.0860	0.4584	0.0670	0.1949
Julio	0.0943	0.8336	0.0544	0.2416
Agosto	0.2325	0.9660	0.0090	0.5309
Septiembre	0.2488	0.9955	0.0252	0.5814

Fuente: Mikulic-Petkovsek *et al.*, (2003).

También se ha comprobado que los fenoles oxidados son mucho más potentes contra fitopatógenos, siendo las enzimas peroxidasa y polifenol oxidasa (PPO) las encargadas de este proceso metabólico (Vidhyasekaran, 1997). En plantas de tomate resistentes y susceptibles a *Fusarium oxysporum*, se observó un incremento en la actividad de peroxidasas después de 24 h de inoculación. En cambio, la actividad de PPO se incrementó rápidamente en las plantas resistentes, pero no se encontró ningún aumento en su actividad en las plantas susceptibles. Después, a las plantas susceptibles se les aplicó etefón (análogo del etileno), observando un aumento en la actividad de las dos enzimas e incrementando así, significativamente su resistencia a *Fusarium oxysporum* (Retig, 1974).

Mecanismo de Acción de los Ácidos Fenólicos sobre Microorganismos Patógenos

El mecanismo de acción de los ácidos fenólicos en la inhibición de microorganismos aún no es claro. Varios autores proponen que la actividad antimicótica de los fenoles ocurre cuando éstos son reducidos, dando lugar a la formación de fenolatos y especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 , OH^- y O_2^-) (Figura 6) (Avern'yanov *et al.*, 1993).

Estas especies reactivas de oxígeno actúan directamente (1) en la inactivación de enzimas al romper los enlaces disulfuros de los aminoácidos que conforman a la proteína; (2) rompimiento de las cadenas de ácido desoxiribonucleico (ADN) al romper los puentes hidrógeno de la doble cadena (ácidos nucleicos) y afectar así la transcripción del ADN del fitopatógeno, y (3) peroxidación de lípidos perturbando la integridad de la membrana celular del hongo (Adesanya *et al.*, 1986; Avern'yanov *et al.*, 1993; Mizutani, 1999).

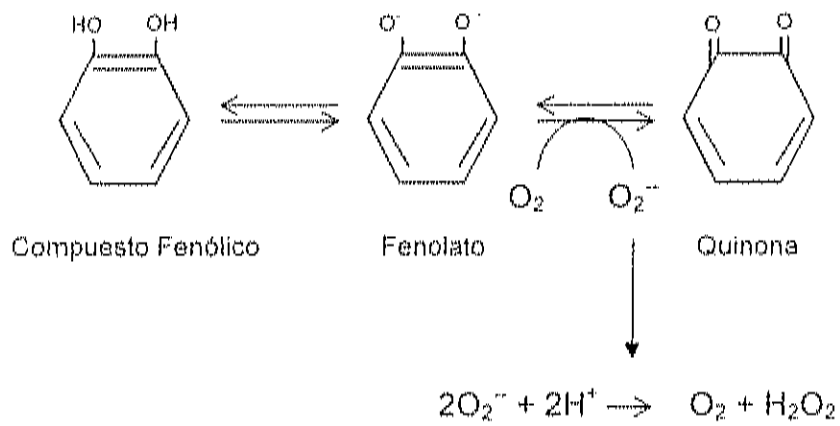


Figura 6. Mecanismo de acción de los fenoles (Mizutani, 1999).

JUSTIFICACIÓN

Actualmente no existen reportes en la literatura acerca del comportamiento de los ácidos fenólicos en frutos de tomate como respuesta a la infección causada por el hongo *Alternaria alternata*, solamente existen estudios realizados *in vitro* y enfocados a plantas. Así como tampoco, hay reportes acerca de la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata* por efecto de los ácidos fenólicos. Además, que en la actualidad se esta tratando de comprender mejor los mecanismos de defensa de los frutos para buscar alternativas viables al uso de compuestos fungicidas sintéticos.

HIPÓTESIS

En frutos de tomate ocurre un cambio en el perfil y en el contenido de ácidos fenólicos como respuesta a la infección causada por *Alternaria alternata*.

OBJETIVOS

General

Identificar y cuantificar los ácidos fenólicos en frutos de tomate sanos e infectados por *Alternaria alternata*.

Particulares

- Identificar y cuantificar en base a estándares comerciales los ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de tomate sano e infectado.
- Establecer si existen diferencias en el perfil y en el contenido de ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de tomate sano e infectado.
- Evaluar la actividad antimicótica *in vitro* de los extractos metanólicos de epicarpio y mesocarpio de tomate, así como la de los ácidos fenólicos identificados en frutos de tomate, sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron frutos de tomate en estado rojo maduro del cultivar "Pinto" procedentes de Estación Bamao, Sinaloa. Los frutos se colocaron en cajas de cartón enceradas y se transportaron al laboratorio de control de calidad de frutas y hortalizas del CIAD, A.C.

Preparación del Inóculo

Se utilizó una cepa de *Alternaria alternata* aislada previamente de tomates infectados. Se preparó una suspensión de esporas utilizando colonias en agar papa dextrosa (APD) de *A. alternata* con 8-10 días de crecimiento. Se les añadió 10 mL de agua destilada estéril, se raspó la superficie con una espátula estéril de plástico para desprender las esporas del micelio. La suspensión formada se tomó con una pipeta estéril y se pasó a un tubo de ensaye. Se determinó la concentración de esporas utilizando la cámara de Neubauer, de acuerdo al método descrito por French y Herbert (1982).

Efecto de la Inoculación con *A. alternata* sobre el contenido de Ácidos Fenólicos en Frutos de Tomate

Los frutos fueron seleccionados aleatoriamente de acuerdo a su color, tamaño y forma, desechándose los que presentaron daños físicos. Los frutos seleccionados se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm y se dividieron en dos lotes de 60 frutos cada uno.

Se inoculó un lote con una suspensión de esporas de *A. alternata* (4.32×10^6 esporas/mL) y el otro lote se consideró como testigo (**Cuadro 3**). Los lotes se mantuvieron durante 10 días a una temperatura de 25°C y una humedad relativa de 90-92 %, para favorecer el desarrollo de la enfermedad (**Figura 7**).

Cuadro 3. Distribución de lotes (Tratamientos) de la inoculación de frutos de tomate con esporas de *A. alternata*.

Tratamiento	Composición del Tratamiento
Tomates sanos	<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="781 940 1040 972">• Epicarpio sano<li data-bbox="781 1014 1073 1045">• Mesocarpio sano
Tomates infectados	<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="781 1087 1105 1119">• Epicarpio infectado<li data-bbox="781 1161 1133 1192">• Mesocarpio infectado

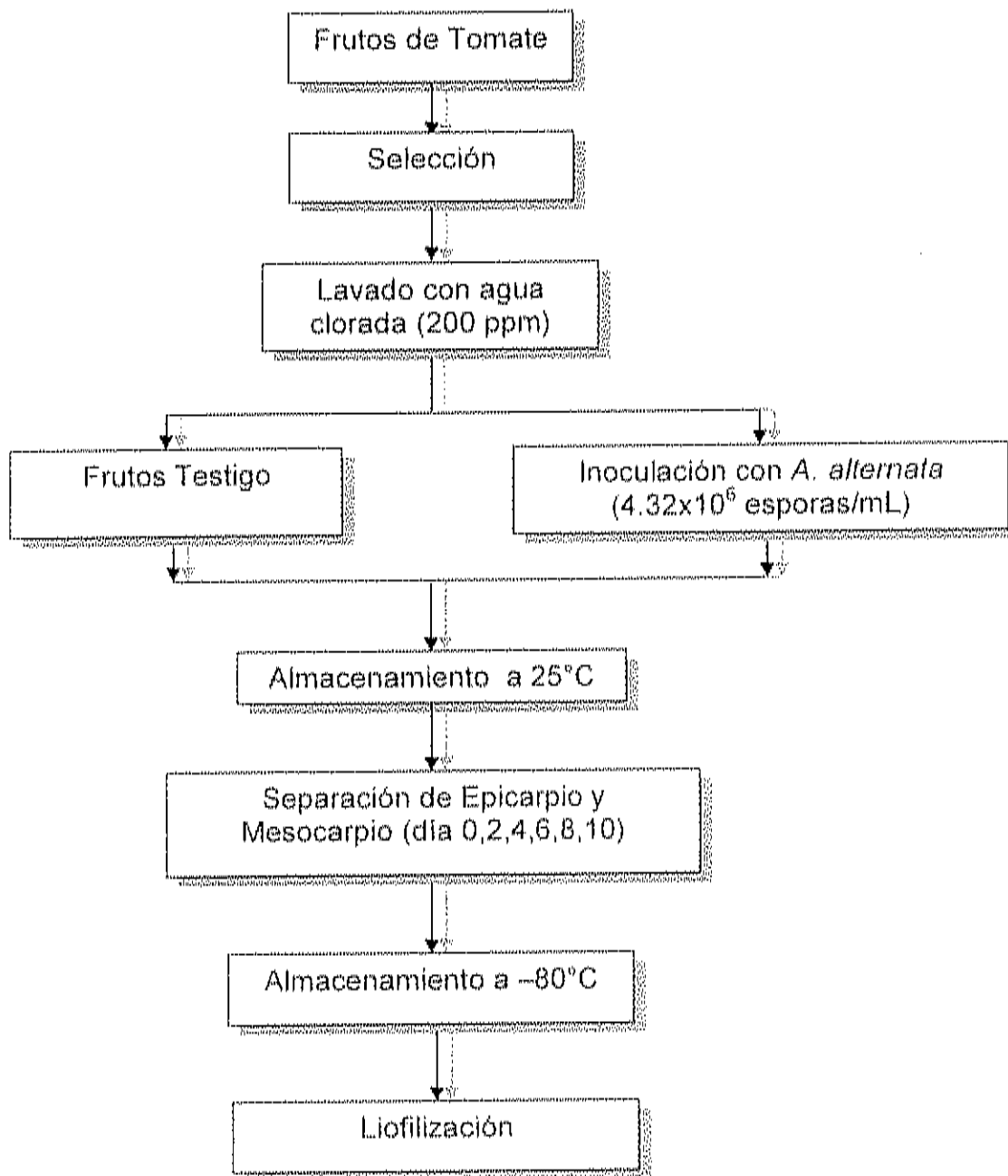


Figura 7.- Diagrama de flujo del experimento.

Se realizaron muestreos cada dos días tomando cinco frutos de cada lote separando el epicarpio y mesocarpio de los frutos, desechando las semillas y el material locular. Las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico y almacenadas a -80°C en un ultracongelador (Revco Technologies, USA). Las muestras fueron liofilizadas mediante un liofilizador de charolas (Freezemobile UNITOP 600L).

Extracción de Ácidos Fenólicos

Los ácidos fenólicos se extrajeron de acuerdo a la metodología propuesta por Mattila y Kumpulainen (2002), que consistió en pesar 0.3 g tanto de epicarpio como mesocarpio liofilizado en tubos de vidrio de 50 mL, se homogenizó con una solución extractora que consistió en 7 mL de metanol (conteniendo 2g/L de 2,3-ter-butyl-4-hidroxianizol) y una solución al 10 % de ácido acético (85:15 v/v). Se sonicó durante 30 min y se llevó a un volumen final de 10 mL con agua grado HPLC. Posteriormente, se filtró el extracto mediante filtros Millipore de 13 mm de diámetro y con un tamaño de poro de $0.2\ \mu\text{m}$. Los extractos se guardaron en tubos Eppendorf cubiertos con papel aluminio a -80°C .

Análisis Cromatográfico de los Ácidos Fenólicos por Cromatografía de Alta Resolución (CLAR)

Se utilizaron estándares comerciales de ácidos fenólicos de la marca Sigma Chemical (St. Louis, Mo.). Los ácidos fueron: gálico, protocatéico, hidroxibenzóico, vanillico, clorogénico, caféico, ferúlico, *p*-cumárico, sináptico, *o*-cumárico y cinámico. En una balanza analítica (Ohaus, Explorer, USA) se pesaron 0.01 g de cada ácido fenólico, los cuales fueron disueltos con 5 mL de metanol y aforando a 10 mL con buffer de acetato de amonio a pH 5.4, obteniendo una concentración de $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Posteriormente, las soluciones se filtraron por separado a través de filtros

Millipore de 13 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 0.2 μm , a viales de vidrio color ámbar.

El análisis por CLAR consistió en inyectar 20 μL del extracto de tomate en un cromatógrafo de líquidos (Varian 9012, USA) con detector UV visible (Varian 9050, USA) equipado con una columna Phenomenex PLRP-S de 5 μm tamaño de partícula (150 x 4.6 mm diámetro interno) y una precolumna C-18.

Para la separación de los ácidos fenólicos se utilizó un gradiente de elución (**Cuadro 4**) con una fase móvil de buffer de acetato de amonio a pH 5.4 (solvente A) y metanol (solvente B). La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y la detección fue a una longitud de onda de 280 nm (Angerosa *et al.*, 1995, modificado por Baquedano, 2002).

Identificación de ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de frutos de tomates sanos e infectados por *A. alternata*

Los ácidos fenólicos fueron identificados por comparación de su tiempo de retención y de sus características espectrales de absorción con respecto a los estándares comerciales. La confirmación de los ácidos fenólicos identificados en las muestras se llevó a cabo por cromatografía de líquidos acoplada a detección por masas, utilizando un sistema cromatográfico Agilent 1100 que consta de una bomba cuaternaria, degasificador en línea, automuestreador, horno para columna y un detector de arreglo de diodos acoplado a un espectrómetro de masas Agilent trampa de iones modelo VL y fuente de iones por electro spray (Agilent Technology, Inc. Ca. USA).

Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que se utilizaron para la identificación y cuantificación. Las condiciones para la detección por espectrometría de masas fueron: presión del nebulizador 65 psi, flujo de gas de secado de 11 L / min y una temperatura de secado de 350°C.

Cuadro 4. Condiciones del gradiente de elución para la separación de los ácidos fenólicos.

Tiempo (min)	% B (Metanol)	% A (Buffer)
0	12	88
8	24	76
22	24	76
23	36	64
35	48	52
45	48	52

Fuente: modificado de Angerosa *et al.*, 1995, para este estudio.

Cuantificación de ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de frutos de tomates sanos e infectados por *A. alternata*

La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración de cada uno de los estándares de ácidos fenólicos comerciales en un rango de 0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Chen *et al.*, 2001). Los resultados se expresaron como $\text{mg}/100 \text{ g}$ de peso seco de epicarpio y mesocarpio de tomate.

Elaboración de curvas de calibración

Se prepararon once estándares de ácidos fenólicos a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se realizó una mezcla de los once estándares de ácidos fenólicos con los volúmenes reportados en el **cuadro 5** y del volumen final de la mezcla (720 μL) se tomaron 500 μL y se aforaron a 1 mL con 250 μL de metanol y 250 μL de acetato de amonio. A partir de las cuales se hicieron diluciones seriadas 1:1 hasta que el área de los picos de cada uno de los estándares no fue detectada por el equipo; iniciándose con la dilución de menor concentración. El volumen de inyección fue de 20 μL , efectuándose por triplicado.

Actividad Antimicótica *In Vitro* de los Ácidos Fenólicos

La actividad antimicótica de los ácidos fenólicos se determinó *in vitro* sobre la germinación de las esporas de *A. alternata* de acuerdo a la metodología propuesta por Mari *et al.* (1993) y Blachinski *et al.* (1996). Se utilizaron diferentes concentraciones de extractos metanólicos de epicarpio y mesocarpio de tomate sano. Estas se determinaron en base al contenido promedio de ácidos fenólicos presentes en un mL de extracto. Asimismo, se utilizaron diferentes concentraciones de estándares comerciales de los ácidos fenólicos identificados en epicarpio y mesocarpio (**Cuadro 6**). Cada tratamiento se adicionó a 3 tubos de ensayo conteniendo previamente 8 mL de una suspensión de esporas de *A. alternata* (5×10^4 esporas/mL).

Cuadro 5. Volúmenes para la elaboración de la mezcla de estándares comerciales de ácidos fenólicos.

Estándar	Volumen ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Ác. Gálico	80
Ác. Protocatéico	80
Ác. Hidroxibenzóico	120
Ác. Vaníllico	120
Ác. Clorogénico	40
Ác. Caféico	40
Ác. Ferúlico	40
Ác. <i>p</i> -Cumárico	40
Ác. Sináptico	80
Ác. <i>o</i> -Cumárico	40
Ác. Cinámico	40
Total	720 μL

Fuente: Baquedano, 2002.

Cuadro 6. Distribución de los tratamientos para determinar la actividad antimicótica de los ácidos fenólicos.

Composición del Tratamiento	Volumen	Concentración
	(μL)	(mM)
Agua (Testigo)	8 000	---
Solución extractora	250	---
Extracto metanólico de epicarpio sano	---	25 y 50
Extracto metanólico de mesocarpio sano	---	25 y 50
Metanol	250	---
Ácido Vanílico	---	25, 50, 100, 200 y 500
Ácido Clorogénico	---	25, 50, 100, 200 y 500
Ácido Caféico	---	25, 50, 100, 200 y 500
Mezcla de ácido vanílico, clorogénico y caféico	---	25, 50, 100, 200 y 500

De forma simultánea se utilizó un testigo, añadiendo agua destilada estéril y como controles positivos se utilizaron metanol y solución extractora [metanol (conteniendo 2g/L de 2,3-ter-butyl-4-hidroxianizol) y una solución al 10 % de ácido acético (85:15 v/v)]. Se realizaron 4 repeticiones por tubo de ensaye.

Se determinó el número de esporas germinadas y no germinadas a las 3 horas de aplicado el tratamiento, tomando un mL de cada tubo de ensaye y colocándolo en una cámara de Neubauer para hacer el conteo mediante observación al microscopio. Se consideró una espora germinada si el tubo germinativo era por lo menos igual de largo que lo ancho de la espora (Blachinski *et al.*, 1996). Se determinó el porcentaje de efectividad de los ácidos fenólicos (% EF) sobre la inhibición de la germinación de esporas de *A. alternata* utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ EF} = \frac{\text{no. de esporas totales} - \text{no. de esporas germinadas}}{\text{no. de esporas totales}} \times 100$$

Diseño Experimental

Efecto de la inoculación con *A. alternata* sobre el contenido de ácidos fenólicos en frutos de tomate

Para llevar a cabo el análisis de datos se utilizó un diseño de experimentos completamente aleatorio con arreglo factorial, donde el factor A fue la inoculación con esporas de *A. alternata* (tomates sanos y tomates infectados) y el factor B fueron los días de muestreo (día 0, 2, 4, 6, 8 y 10). La variable de respuesta fueron los ácidos fenólicos tanto en epicarpio como en mesocarpio. Para determinar el efecto de los factores sobre las variables de respuesta se realizó un análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Análisis Cromatográfico de los Ácidos Fenólicos por CLAR

La utilización del gradiente reportado en el **cuadro 4** permitió una óptima separación de los estándares comerciales de los once ácidos fenólicos utilizados en este trabajo (**Figura 8**). Los tiempos de retención son mostrados en el **cuadro 7**, y son comparados con los reportados por Baquedano (2002). En este cuadro se puede observar que los t_R obtenidos en este estudio no concuerdan con los presentados por Baquedano (2002), aunque este autor utilizó un gradiente que se muestra a continuación: fase móvil de metanol/acetato de amonio pH 5.4 con una proporción de 12 % y 88 % respectivamente al tiempo cero, para llegar a una proporción de 24:76 a los 8 minutos, cambiando esta proporción a 36:64 hasta los 32 minutos de corrida; manteniendo esta proporción hasta el minuto 33; cambiando de 48:52 durante 9 minutos y finalmente cambiar la proporción de 60:40 al minuto 43 y continuar con esta proporción durante 9 minutos, haciendo un tiempo total de corrida de 52 minutos. Estas diferencias en tiempos de retención de los estándares de ácidos fenólicos se deben principalmente a que en nuestro estudio se utilizó una columna de una matriz de poliacetileno divinil benceno, mientras que el autor reporta una columna a base de sílica (Si-C18). Asimismo, se puede observar que los ácidos fenólicos evaluados por Baquedano (2002) empezaron a detectarse a partir de los 3 minutos y terminar a los 33 minutos; mientras que los reportados en nuestro estudio empezaron a eluir después de los 5 minutos de corrida y terminar a los 40 minutos.

Curvas de calibración

Las curvas de calibración realizadas para cada uno de los estándares de ácidos fenólicos presentaron un coeficiente de regresión (R^2) de 0.9895 a 0.9998 (**Cuadro 7**). Los valores de R^2 obtenidos en este estudio coinciden con los reportados por Baquedano (2002), los cuales estuvieron en un rango de 0.9524 a 1.0.

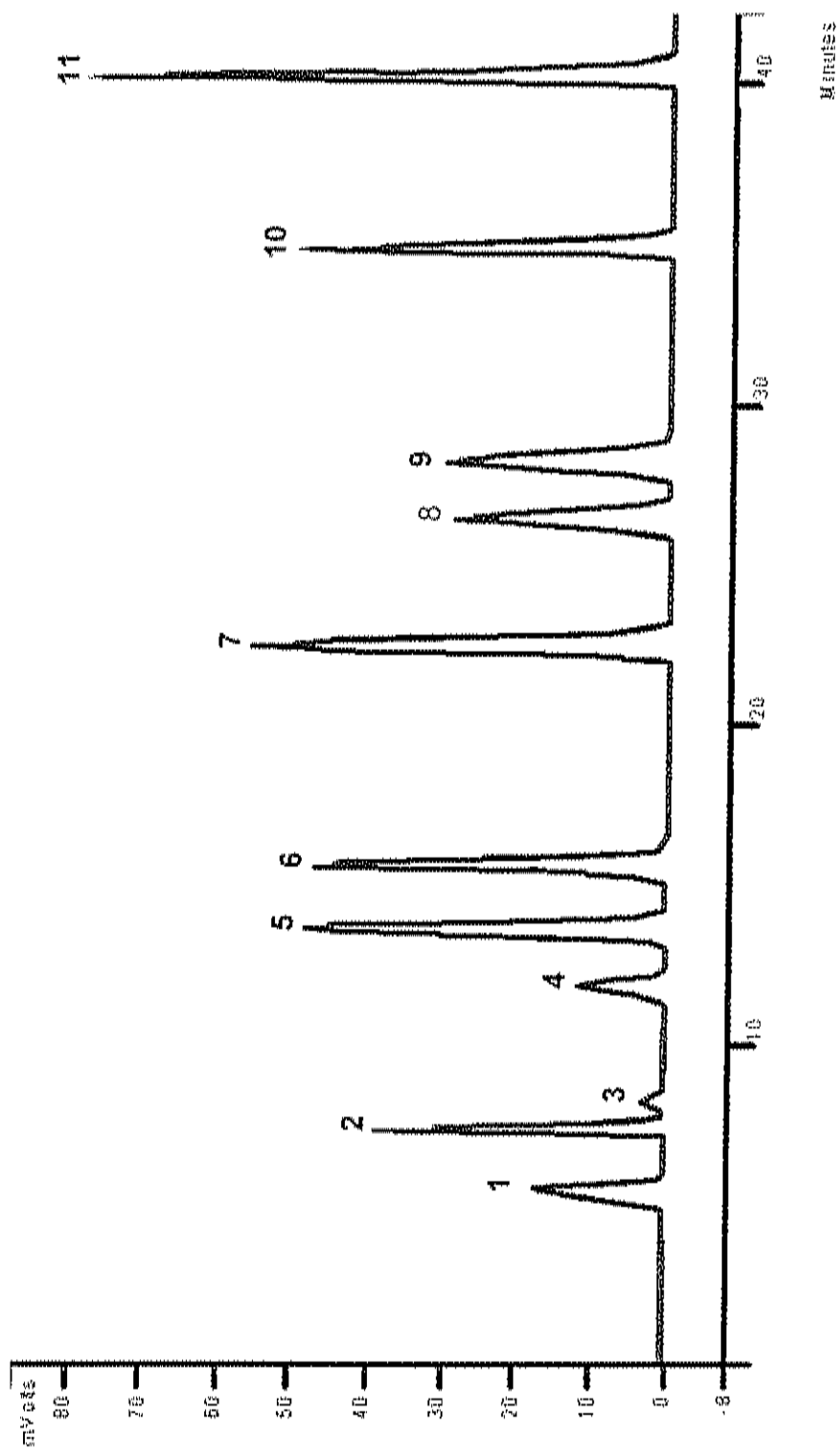


Figura 8.- Cromatograma de la separación de once estándares de ácidos fenólicos (1:Gálico, 2:Protocatéico, 3: Hidroxibenzoico, 4:Vanillico, 5:Clorogénico, 6: Caféico, 7:Ferúlico, 8:p-Cumárico, 9:Sináptico, 10:o-Cumárico y 11:Cinámico).

Cuadro 7.- Tiempos de retención (t_R) y coeficientes de regresión (R^2) de estándares de ácidos fenólicos.

No. de Pico	Estándar	t_R (min)	$t_{R'}$ (min)	R^2
1	Ácido Gálico	5.39	3.2	0.990
2	Ácido Protocatéico	7.28	3.8	0.9998
3	Ácido Hidroxibenzóico	8.14	5.9	0.9895
4	Ácido Vanílico	11.77	---	0.9938
5	Ácido Clorogénico	13.52	6.9	0.9996
6	Ácido Caféico	15.50	7.43	0.9997
7	Ácido Ferúlico	22.28	11.2	0.9996
8	Ácido <i>p</i> -Cumárico	26.23	13.3	0.9981
9	Ácido Sináptico	28.02	14.4	0.9985
10	Ácido <i>o</i> -Cumárico	36.64	20.1	0.9995
11	Ácido Cinámico	39.96	32.8	0.9987

$t_{R'}$ = tiempo de retención obtenido por Baquedano (2002).

Cuadro 7.- Tiempos de retención (t_R) y coeficientes de regresión (R^2) de estándares de ácidos fenólicos.

No. de Pico	Estándar	t_R (min)	$t_{R'}$ (min)	R^2
1	Ácido Gálico	5.39	3.2	0.990
2	Ácido Protocatéico	7.28	3.8	0.9998
3	Ácido Hidroxibenzóico	8.14	5.9	0.9895
4	Ácido Vaníllico	11.77	---	0.9938
5	Ácido Clorogénico	13.52	6.9	0.9996
6	Ácido Caféico	15.50	7.43	0.9997
7	Ácido Ferúlico	22.28	11.2	0.9996
8	Ácido <i>p</i> -Cumárico	26.23	13.3	0.9981
9	Ácido Sináptico	28.02	14.4	0.9985
10	Ácido <i>o</i> -Cumárico	36.64	20.1	0.9995
11	Ácido Cinámico	39.96	32.8	0.9987

$t_{R'}$ = tiempo de retención obtenido por Baquedano (2002).

Identificación de ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de frutos de tomate sano e infectado por *A. alternata*

Los análisis cromatográficos realizados tanto en epicarpio como en mesocarpio de tomate (sano e infectado), revelaron la presencia de varios picos bien definidos; tres de los cuales fueron identificados como ácido vanílico, ácido clorogénico y ácido caféico (**Figura 9 y 10**), de acuerdo a los tiempos de retención de los estándares de los ácidos fenólicos utilizados. Asimismo, los tres ácidos fenólicos fueron confirmados por adición de estándar y en base a sus espectros de masas comparados con los espectros de los estándares comerciales.

El perfil de los ácidos fenólicos libres identificados en los diferentes tejidos de tomate sano e infectado durante los 10 días de almacenamiento, fue aparentemente el mismo, por lo que la infección causada por *Alternaria alternata*, y el tiempo de almacenamiento a 25°C, no tuvieron un efecto en el tipo de estos compuestos en el fruto de tomate.

Se ha reportado que la presencia de determinado ácido fenólico es debido a la variedad del cultivo, condiciones ambientales (clima y temperatura) e inclusive el tipo de suelo. Por ejemplo, en España, Martínez-Valverde *et al.* (2002), identificaron la presencia de los ácidos fenólicos libres y conjugados: clorogénico, caféico, *p*-cumárico y ferúlico en 9 variedades de frutos tomate: "Rambo", "Señor", "Ramillete", "Liso", "Pera", "Canario", "Durina", "Daniella" y "Remate".

En otro estudio, Buta y Spaulding (1997), reportaron la presencia de los ácidos clorogénico y *p*-cumárico (libres) en frutos de tomate de las variedades "Alisa Craig" y "Pik-Red", los cuales provenían de invernadero. Asimismo, Hobson y Davies (1971) y Dewit y Kodde (1981) identificaron la presencia de los ácidos clorogénico, caféico, *p*-cumárico y ferúlico en frutos de tomate, sin embargo, no indican la variedad de los mismos. De la misma manera, Mattila y Kumpulainen (2002), demostraron la presencia de los ácidos vanílico, hidroxibenzóico, *p*-cumárico, ferúlico, caféico y clorogénico en frutos de tomate cultivados en Finlandia, siendo estos últimos ácidos en forma libre y conjugada.

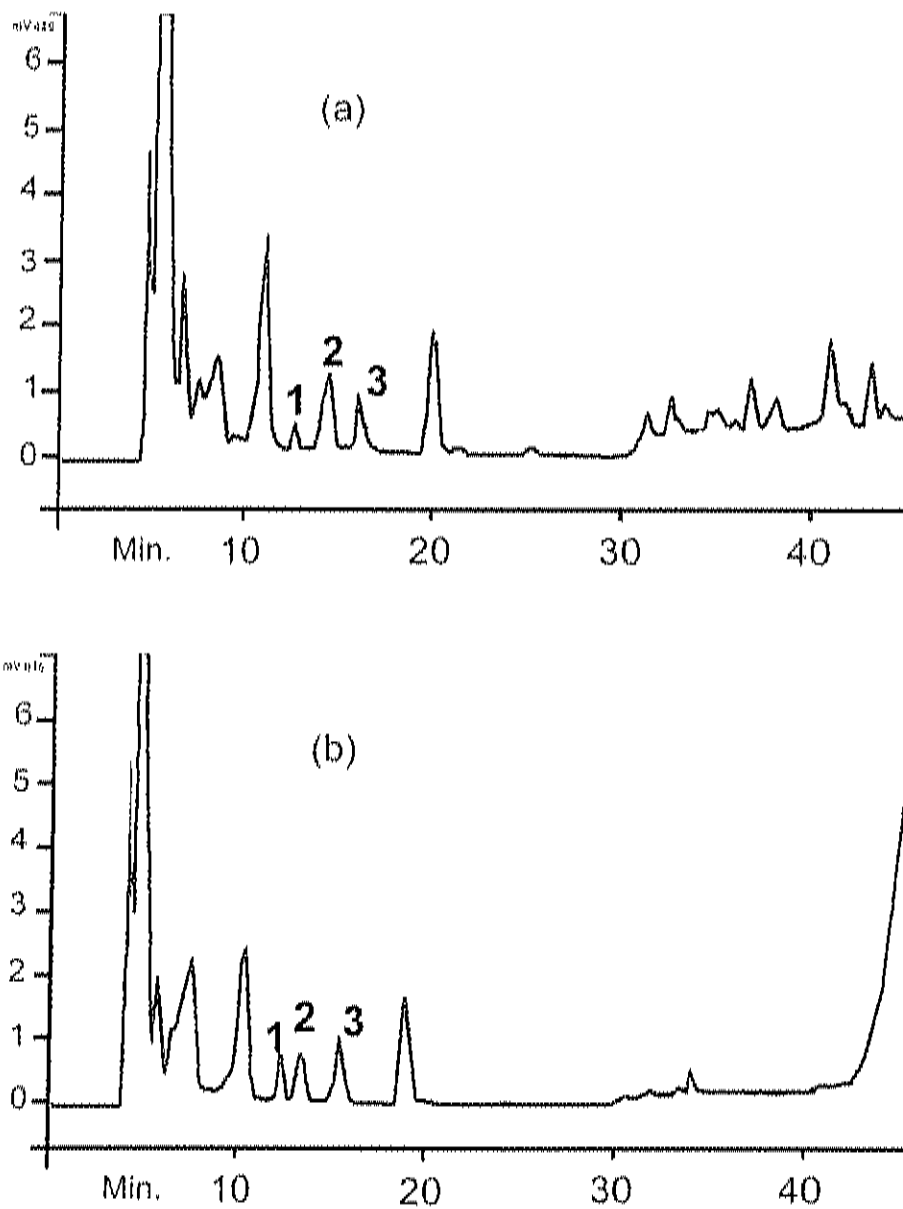


Figura 9. Cromatograma (CLAR) de los ácidos fenólicos en epicarpio (a) y mesocarpio (b) de tomate sano (1: vanílico, 2: clorogénico y 3: caféico).

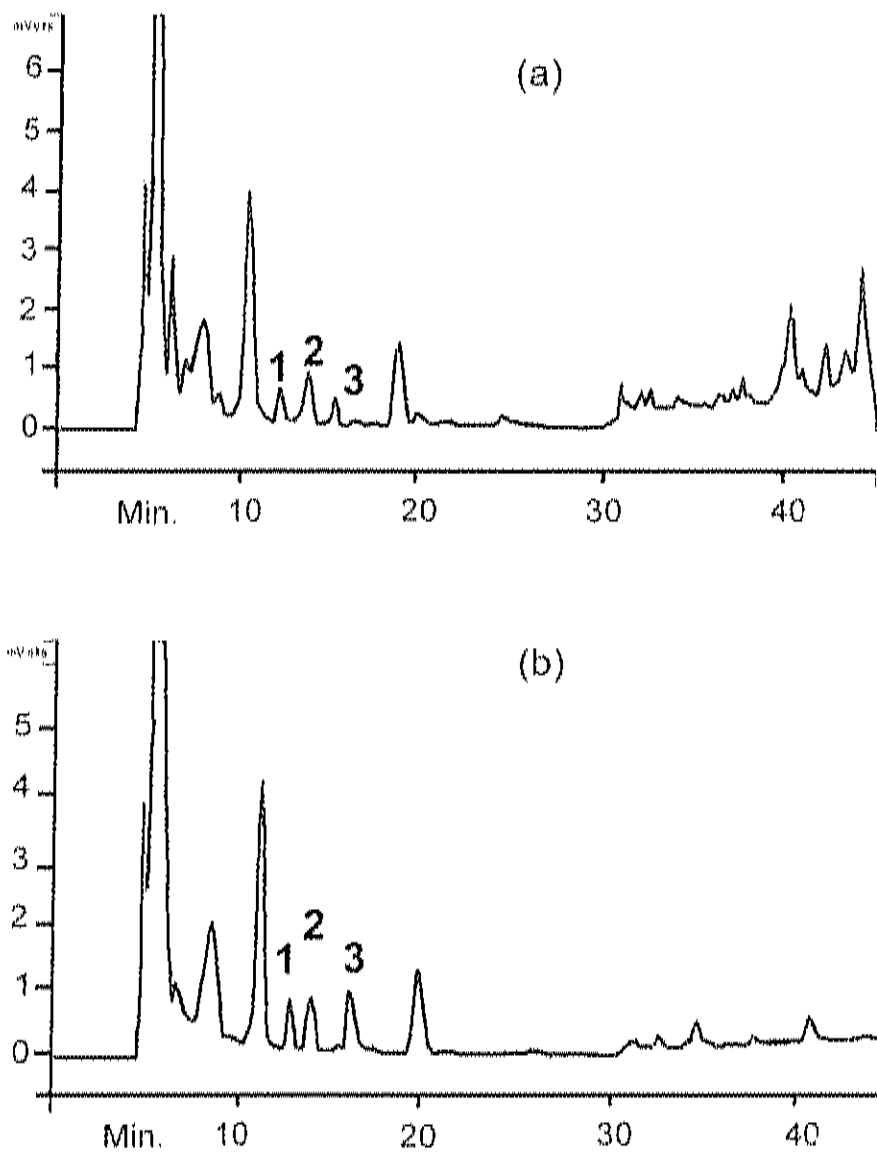


Figura 10. Cromatograma (CLAR) de los ácidos fenólicos en epicarpio (a) y mesocarpio (b) de tomate infectado (1: vanílico, 2: clorogénico y 3: caféico).

Cuantificación de ácidos fenólicos en epicarpio y mesocarpio de frutos de tomate sanos e infectados por *A. alternata*

Los resultados del análisis de varianza factorial A x B, mostraron que la interacción de ambos factores para cada uno de los ácidos fenólicos evaluados, tanto en epicarpio como en mesocarpio de tomate, fue significativa ($P \leq 0.05$), por lo que los ácidos fenólicos previamente identificados en ambos tejidos de la variedad "Pinto", presentaron diferencias en su contenido, observándose un comportamiento distinto con respecto a la infección causada por el patógeno *Alternaria alternata*.

El contenido de ácido vanílico expresado como mg/100g peso seco (p.s.), en epicarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata*, durante el almacenamiento a 25°C, se muestra en la **figura 11**. Se puede observar que el epicarpio sano presentó una concentración inicial de 33.42 mg/100 g p. s., la cual aumentó a 41.76 mg/100 g p.s. de ácido vanílico a los 2 días de almacenamiento, no existiendo diferencias entre ellas. Este contenido disminuyó en los siguientes días de evaluación, observándose un contenido de 27.44, 26.43, 29.09 y 15.18 mg/100g p.s., a los 4, 6, 8 y 10 días, respectivamente. Al comparar este comportamiento con el ácido vanílico en el epicarpio de los tomates infectados, se pudo observar que al día 0 presentó un contenido de 27.80 mg/100 g p.s., el cual no fue diferente significativamente con respecto al epicarpio sano. Este contenido aumentó a 43.29 mg/100 g p.s. a los 2 días de almacenamiento, coincidiendo con el aumento observado en el epicarpio sano. El contenido observado a los dos días en epicarpio infectado, se mantuvo constante durante los días 4, 6 y 8, con valores de ácido vanílico de 45.4, 49.25 y 42.70 mg/100g p.s., respectivamente, los cuales fueron mayores significativamente ($P \leq 0.05$) con respecto al contenido presentado por el epicarpio sano.

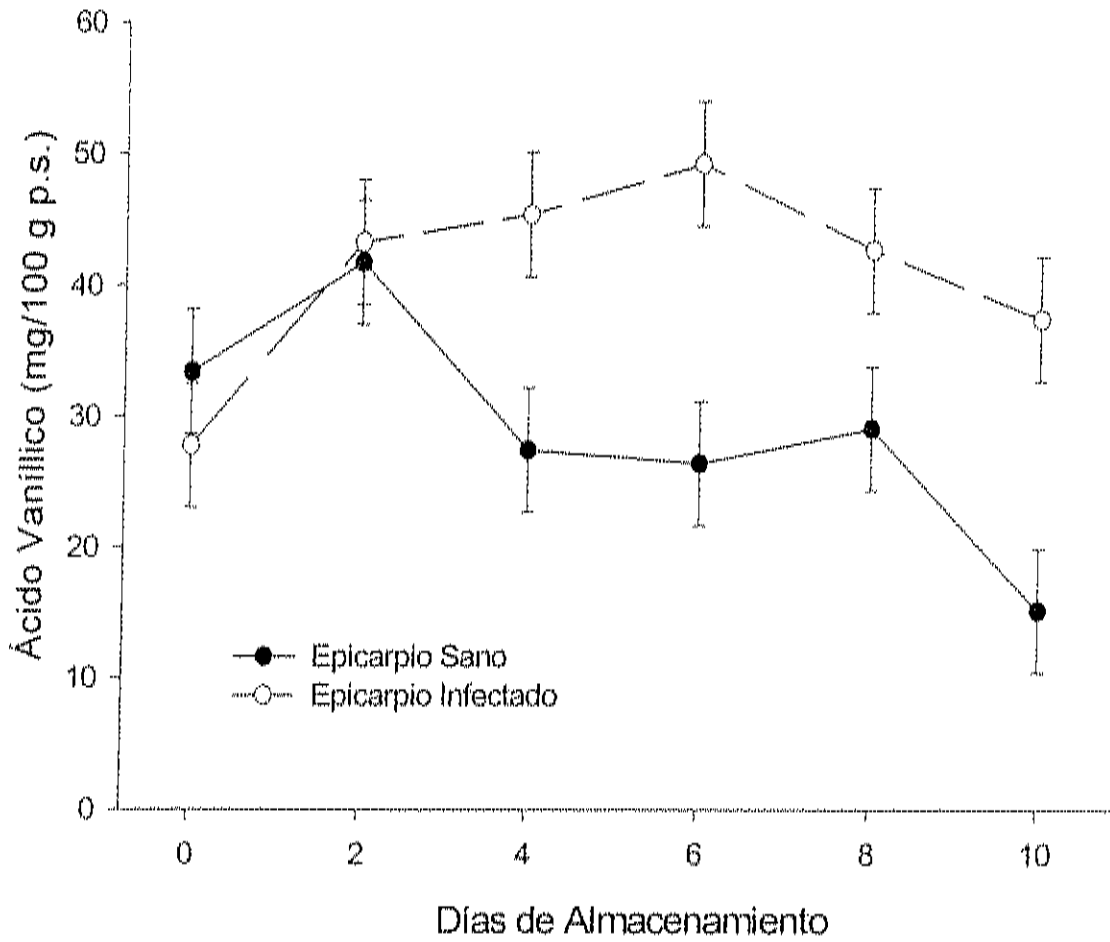


Figura 11. Contenido de ácido vanílico en epicarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata* durante el almacenamiento a 25°C.

La mayor concentración del ácido vanílico en el epicarpio de los tomates sanos se registró en el día 2 con 41.76 mg/100g p.s.; mientras que en el epicarpio infectado se registró la mayor concentración de éste ácido fenólico en el día 6 (49.25 mg/100g p.s.). Sin embargo, al comparar el contenido del día 6 del epicarpio infectado con los demás días, no se encontraron diferencias significativas con respecto al contenido presentado en los días 2, 4 y 8 de almacenamiento ($P > 0.05$).

En general se puede apreciar que durante el almacenamiento a 25 °C, el contenido del ácido vanílico en el epicarpio de los tomates infectados fue mayor con respecto al contenido de este ácido fenólico registrado en el epicarpio de los tomates sanos. En el epicarpio de los tomates sanos se observó una tendencia a disminuir durante el almacenamiento; mientras que en el epicarpio infectado se observó un aumento en el contenido de este ácido a partir del día 4, coincidiendo este incremento con el desarrollo de la pudrición en el fruto (datos no mostrados). Es posible que este aumento en el contenido del ácido vanílico sea una respuesta al estrés causado por la infección provocada por el hongo *Alternaria alternata*.

En la **figura 12** se puede observar el contenido del ácido vanílico en el mesocarpio de tomate sano e infectado por *Alternaria alternata* durante el almacenamiento a 25°C. El contenido de este ácido en el mesocarpio sano se mantuvo constante durante los primeros 6 días de almacenamiento, para posteriormente disminuir, observándose a los 10 días un contenido de 23.04 mg/100 g p.s. Este mismo comportamiento se observó en el mesocarpio infectado, el cual presentó a los 0 y 10 días un contenido de 37.54 y 25.59 mg/100 g p.s., respectivamente. No existieron diferencias significativas en el contenido de ácido vanílico en el mesocarpio de los tomates sanos con respecto al mesocarpio de los tomates infectados durante los 10 días de almacenamiento; con excepción del día 8, cuando el mesocarpio infectado presentó un contenido de ácido vanílico de 45.53 mg/100 g p.s., significativamente mayor ($P \leq 0.05$) al contenido de este ácido fenólico en mesocarpio sano (24.83 mg/100g p.s.).

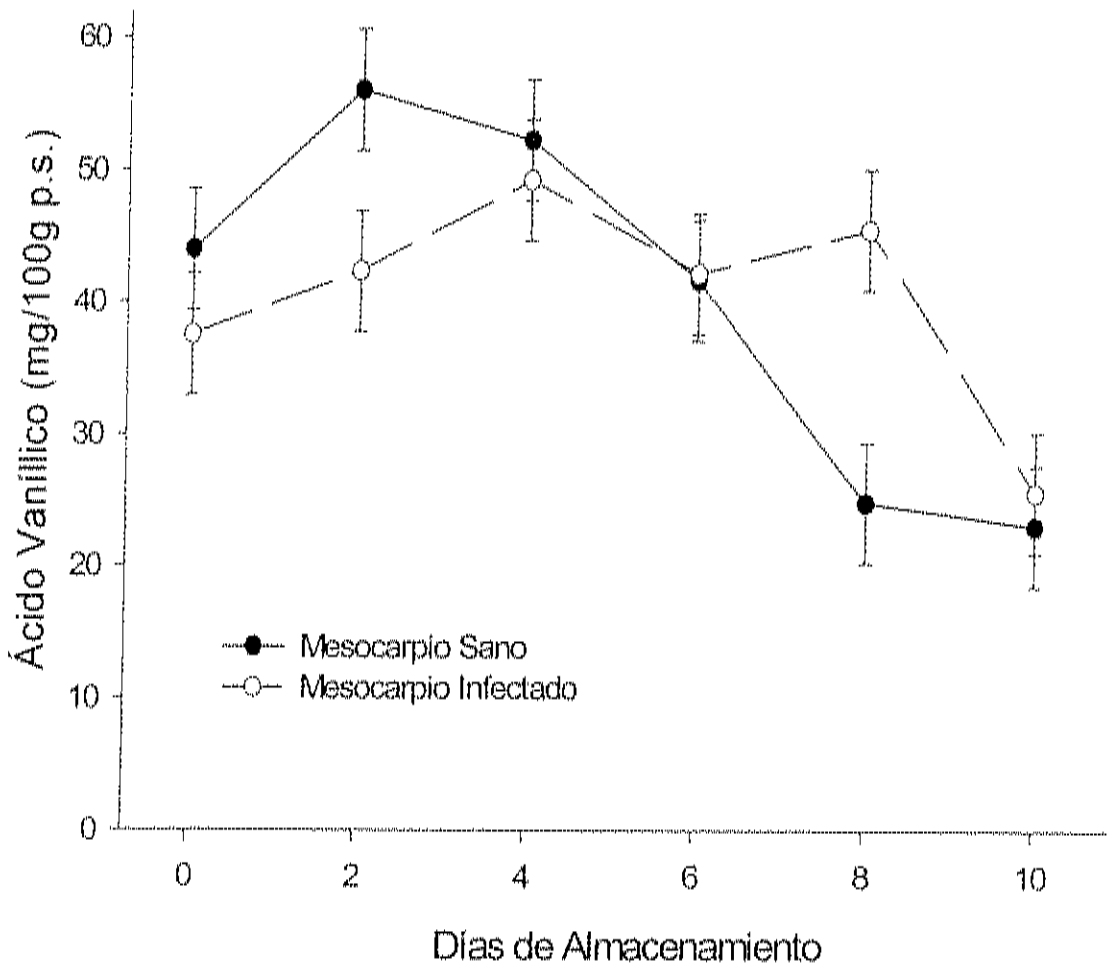


Figura 12. Contenido de ácido vanílico en mesocarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata* durante el almacenamiento a 25°C.

Así mismo, se puede observar que al término del almacenamiento a 25°C (día 10) se presentó la menor concentración de ácido vanílico tanto en epicarpio como en mesocarpio en frutos sanos e infectados con *A. alternata*. Esto puede deberse a que los tomates se encontraban demasiado infectados por el hongo *A. alternata*.

En general, se puede observar que el contenido del ácido vanílico fue mayor en el mesocarpio, tanto sano como infectado, con respecto al epicarpio sano, lo cual permite especular que en el mesocarpio se está llevando a cabo una mayor síntesis de éste ácido para posteriormente ser transportado hacia el primer sitio de infección, que es el epicarpio. Esto coincide con el estudio realizado por Snyder y Nicholson (1990), quienes observaron en sorgo la acumulación de metabolitos de defensa (apigeninidina y luteolinidina) debida a la infección por *Colletotrichm graminicola*. Estos se acumularon en las células infectadas por el fitopatógeno formando vesículas coloreadas que después migraron al sitio adjunto del apresorio, donde se unieron y liberaron su contenido en las células infectadas. Además, en dicotiledóneas, se ha demostrado que las fitoalexinas son producidas en células sanas, para después liberarse y acumularse en el tejido infectado (Brindle *et al.*, 1983; Ebel, 1986).

No existe información publicada hasta el momento sobre el comportamiento del ácido vanílico en frutos de tomate, como respuesta a la infección causada por *Alternaria alternata*. Sin embargo, en otros tejidos se ha observado un aumento en el contenido de este ácido como respuesta al ataque por patógenos. En un estudio realizado por Curir *et al.* (2003), se determinó la presencia del ácido vanílico en dos variedades de clavel; una resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* ("Roland") y la otra susceptible ("Gloriana"). Los autores reportaron una concentración de 1.3 mg/g p.s. en tejido sano de la variedad "Gloriana", la cual aumentó a 2.9 mg/g p.s. al infectar las plantas con *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* ($P \leq 0.05$) lo cual coincide con nuestro estudio. Sin embargo, en la variedad "Roland", no observaron diferencias significativas en la concentración de este ácido en los diferentes tejidos ($P > 0.05$).

El contenido de ácido caféico en tomates sanos e infectados por *A. alternata*, durante el almacenamiento a 25°C, se presenta en la **figura 13**. Se puede observar que en el epicarpio del tomate sano, no se encontró una tendencia clara en el contenido de este ácido, registrándose fluctuaciones durante el almacenamiento, con un contenido inicial y final de 8.04 y 3.70 mg/100g p.s., respectivamente.

En cambio, en el epicarpio del tomate infectado, se observó un contenido inicial del ácido caféico de 7.57 mg/100g p.s., el cual disminuyó al día 2 y se mantuvo constante hasta el día 6 de almacenamiento, para posteriormente incrementarse hasta el día 10, alcanzando un contenido de 8.66 mg/100g p.s., siendo éste significativamente mayor ($P \leq 0.05$) con respecto al epicarpio sano.

El comportamiento del ácido caféico observado en el epicarpio infectado, fue diferente al observado en el ácido vanílico en este mismo tejido, en el cual se observó un incremento que coincidió con el desarrollo de la infección causada por el patógeno. En el caso del ácido caféico, no se observó un incremento durante el almacenamiento como respuesta a los signos de deterioro, por *A. alternata* ($P > 0.05$).

El contenido de ácido caféico en mesocarpio de tomate sano e infectado por *Alternaria alternata*, durante almacenamiento a 25°C, se presenta en la **figura 14**. No se puede observar un comportamiento claro en el contenido de este ácido durante el almacenamiento, tanto en el mesocarpio de tomate sano como en el infectado. Al igual que en el epicarpio de tomate sano, en el mesocarpio de tomate sano se observó una fluctuación en el contenido del ácido caféico, registrándose un contenido inicial y final de 14.48 y 7.65 mg/100g p.s. respectivamente, los cuales fueron estadísticamente diferentes entre ellos ($P \leq 0.05$).

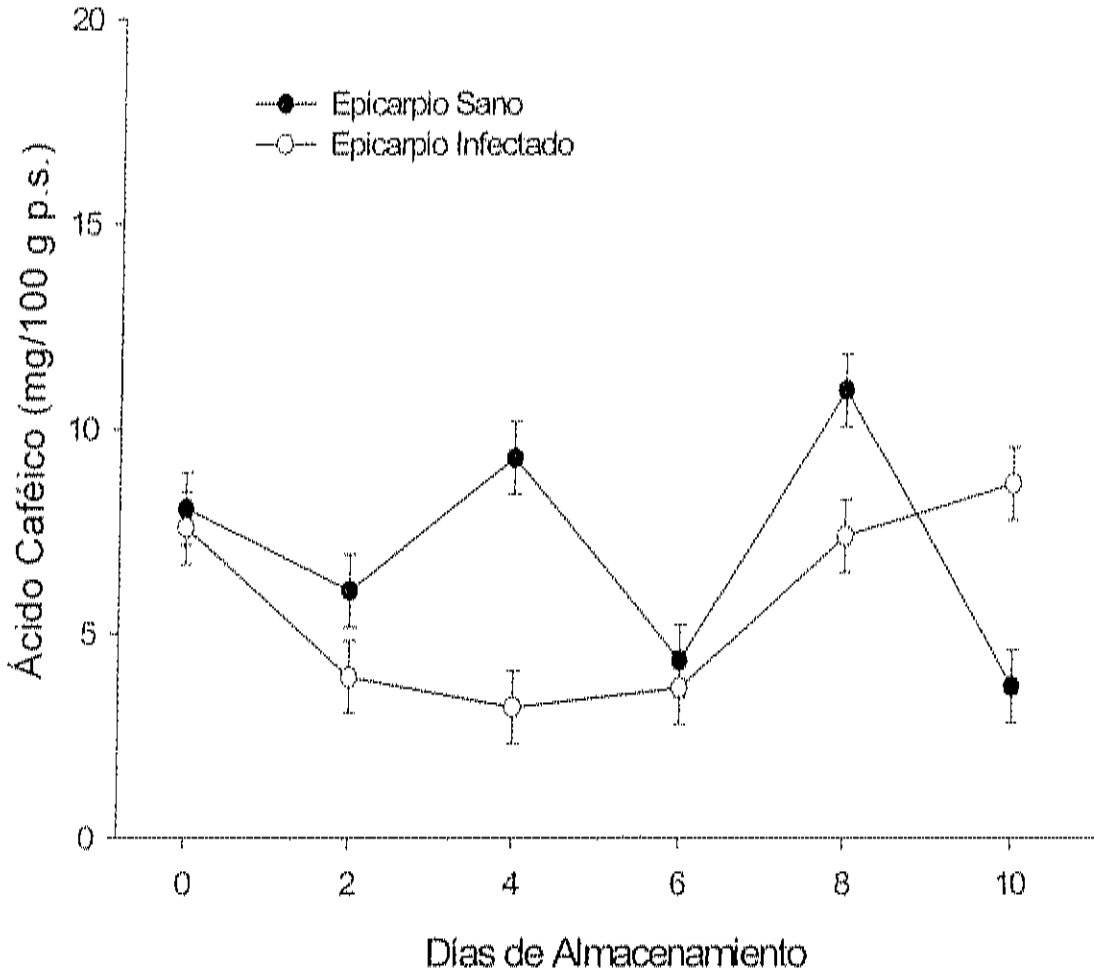


Figura 13. Contenido de ácido caféico en epicarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata* durante el almacenamiento a 25°C.

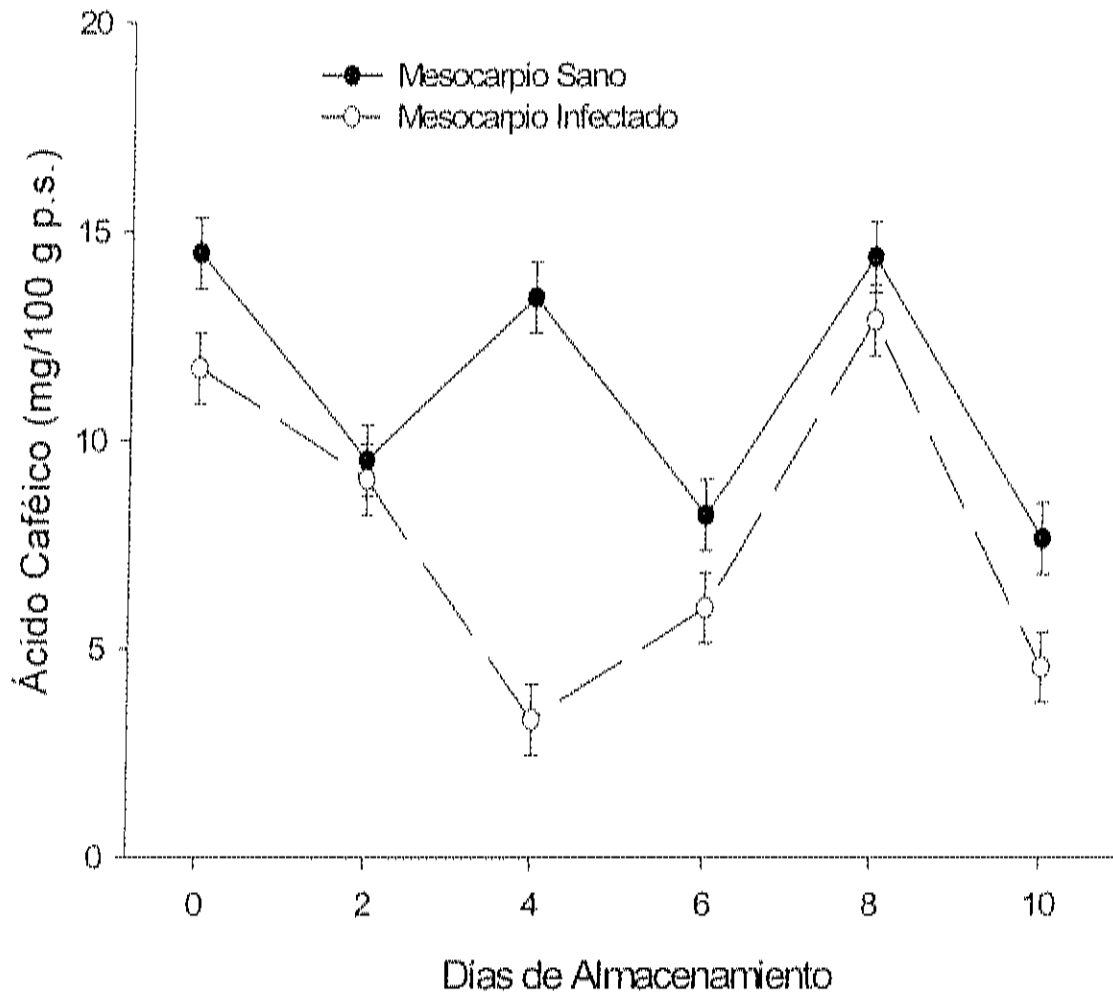


Figura 14. Contenido de ácido caféico en epicarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata* durante el almacenamiento a 25°C.

El mismo comportamiento se observó en el mesocarpio de tomate infectado, en el cual se registró una fluctuación en el contenido de este ácido durante el almacenamiento, registrándose un contenido inicial y final de 11.73 y 4.55 mg/100g p.s., siendo estos estadísticamente diferentes entre ellos y menores significativamente con respecto al mesocarpio de tomate sano ($P \leq 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los valores más altos en mesocarpio sano, los cuales se presentaron en los días 0, 4 y 8, con 14.48, 13.42 y 14.38 mg/100g p.s., respectivamente. En el caso del mesocarpio infectado, se observó un incremento en el contenido de ácido caféico a los 8 días de almacenamiento, registrándose un contenido 12.88 mg/100g p.s., siendo éste significativamente mayor con respecto a los 2, 4, 6 y 10 días; sin embargo, no fue estadísticamente diferente con respecto al mesocarpio sano al día 8. En general, no se observó un comportamiento claro en el contenido del ácido caféico tanto en epicarpio infectado como en mesocarpio infectado de tomate, con respecto a ambos tejidos sanos, por lo que se puede pensar que la infección provocada por *A. alternata*, no alteró el contenido del ácido caféico como respuesta al ataque del patógeno.

El aumento en el contenido de ácido caféico en tejidos vegetales como respuesta a la infección causada por patógenos, no es muy clara. Marculescu *et al.* (2001), evaluaron el contenido de ácido caféico en tres variedades de *Chrysanthemum balsamita* L., planta que se ha asociado con resistencia hacia *Nectria haematococca*. Los autores reportaron en la variedad resistente "Camphora" una concentración de 9.7 mg/g y de 16.1 y 6.4 mg/g para las variedades susceptibles "Carvona" y "Thujona", respectivamente. Los autores concluyeron que la resistencia hacia ese hongo patógeno no es debido a la presencia del ácido caféico, sino que existen otros compuestos o proteínas relacionadas a la patogénesis, las cuales podrían encontrarse en mayor proporción en la variedad resistente.

El contenido del ácido clorogénico en epicarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata*, durante almacenamiento a 25°C, se presenta en la **figura 15**. Se puede observar que tanto el epicarpio sano como el infectado, presentan un comportamiento similar. Inicialmente (día 0), en el epicarpio sano se registró un contenido de ácido clorogénico de 16.55 mg/100g p.s.; mientras que en el epicarpio infectado fue de 14.66 mg/100 g p.s., el cual no fue diferente significativamente con respecto al tejido sano ($P>0.05$). El contenido de ácido clorogénico disminuyó a los 2 días de almacenamiento en ambos tejidos (9.25 y 8.61 mg/100g p.s., para epicarpio sano e infectado respectivamente) y se mantuvo constante hasta el término del almacenamiento (10 días). No se observaron diferencias significativas en el contenido del ácido clorogénico registrado a los 2, 4, 6, 8 y 10 días y entre tratamientos. En general, se puede apreciar que no existieron diferencias estadísticas ($P>0.05$) en el contenido de este ácido en el epicarpio al infectar los frutos de tomate con el hongo *Alternaria alternata*, ya que el contenido en el epicarpio sano e infectado fue similar.

En la **figura 16** se muestra el contenido del ácido clorogénico en mesocarpio de frutos de tomate sano e infectado por *A. alternata*, durante el almacenamiento a 25°C. Se puede apreciar que el contenido del ácido clorogénico en el mesocarpio de los tomates sanos se mantuvo constante durante el periodo de almacenamiento, con un contenido inicial y final de 10.31 y 9.67 mg/100g p.s., respectivamente. Sin embargo, al igual que en el epicarpio sano, al día 2 se registró una disminución en el contenido de este ácido (5.48 mg/100g p.s.), siendo diferente estadísticamente con respecto a los otros días evaluados ($P\leq 0.05$). Esta disminución puede ser debido a las diferencias en el estado fisiológico de los frutos de tomate utilizados en este estudio, ya que en cada punto de muestreo se utilizaron diferentes tomates.

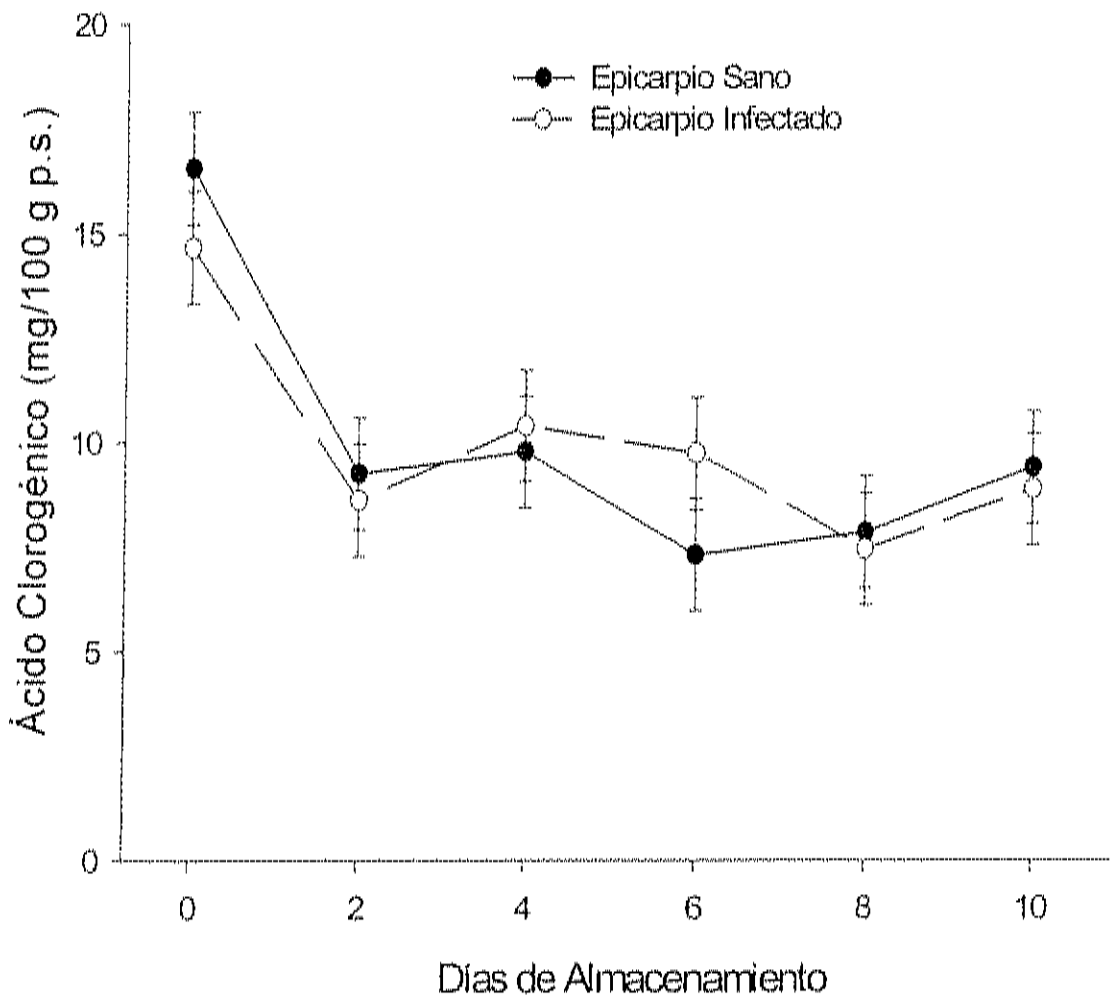


Figura 15. Contenido de ácido clorogénico en epicarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata* durante el almacenamiento a 25°C.

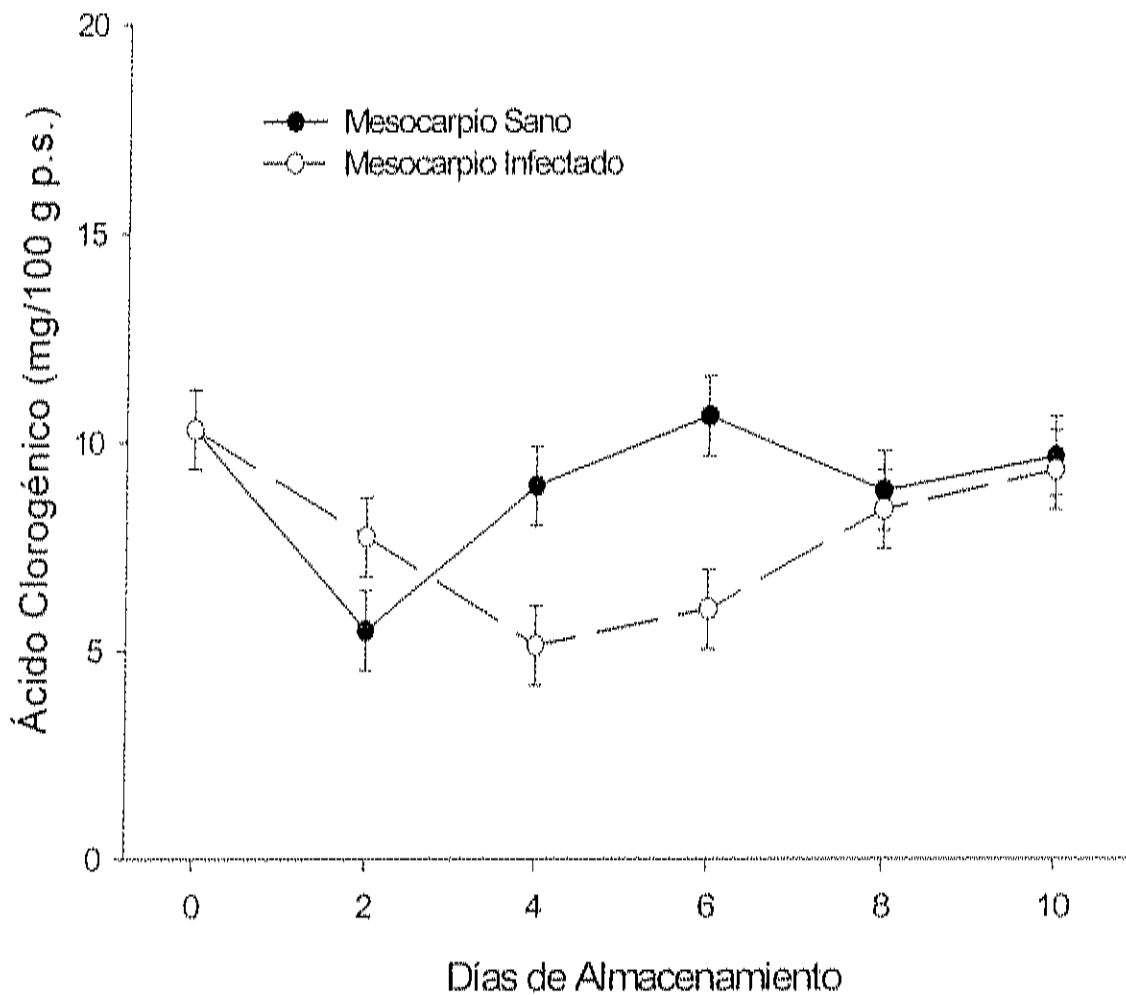


Figura 16. Contenido de ácido clorogénico en mesocarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata* durante el almacenamiento a 25°C.

El contenido del ácido clorogénico registrado en el mesocarpio infectado fue similar al observado en el mesocarpio sano. En el tejido infectado se registró un contenido inicial y final de 10.30 y 9.32 mg/100g p.s., no observándose diferencias significativas entre estos días (0 y 10 días) y con respecto al mesocarpio sano ($P>0.05$). Sin embargo, el contenido de este ácido en el mesocarpio infectado, al igual que en mesocarpio sano, disminuyó a los 2 días de almacenamiento, observándose un contenido de 7.72 mg/100g p.s., el cual fue estadísticamente diferente con respecto al día 0, pero no con respecto al mesocarpio sano a ese mismo día. Este contenido observado al día 2 en mesocarpio infectado se mantuvo constante hasta los 6 días, para posteriormente incrementarse hasta el término del almacenamiento. En general, el contenido del ácido clorogénico en mesocarpio infectado fue igual o menor con respecto al mesocarpio sano, por lo que este ácido no se incrementó en el tejido como una respuesta a la infección causada por *Alternaria alternata*.

Por otro lado, estos resultados no coinciden con lo reportado en la literatura, con respecto al incremento en el contenido del ácido clorogénico como respuesta al ataque por patógenos. Mikulic-Petkovsek *et al.* (2003), estimaron el contenido de ácido clorogénico en hojas de manzana de las variedades resistentes "Topaz", "Gold Rush" y "Goldstar" a *Venturia inaequalis* y "Golden Delicious Weinsberg" y "Golden Delicious Clone B" variedades susceptibles, durante los meses de junio a septiembre del mismo año. Ellos observaron que la variedad "Gold Rush" fue la que presentó diferencias significativas respecto a las demás variedades al obtener el mayor contenido de ácido clorogénico en todos los meses evaluados (junio, julio, agosto y septiembre) con 0.29, 0.77, 0.78 y 1.03 mg/g respectivamente. En cambio, la variedad "Golden Delicious Clone B" fue la que presentó el contenido más bajo, con 0.067, 0.054, 0.009 y 0.025 mg/g, respectivamente; mientras que no existieron diferencias significativas entre el contenido del ácido clorogénico de las variedades restantes ("Topaz", "Goldstar" y "Golden Delicious Weinsberg"). El contenido del ácido clorogénico en las hojas infectadas fue estadísticamente mayor al encontrado en las hojas sanas de ambas variedades (**Cuadro 2**).

En otro estudio, Marculescu *et al.* (2001) evaluaron la composición del ácido clorogénico en tres variedades de *Chrysanthemum balsamita* L; "Camphora", resistente a *Nectria haematococca* y "Carvona" y "Thujona" como variedades susceptibles. Los autores reportaron una concentración de 3.8 mg/g peso fresco (p.f.) del ácido clorogénico en el tejido cv. "Camphora y Thujona"; mientras que en la variedad "Carvona" la concentración de este ácido aumentó a 4.0 mg/g peso fresco; sin embargo, no fueron estadísticamente diferentes. Los autores concluyeron que la resistencia hacia ese hongo no es debido al ácido clorogénico, sino a existen otros compuestos o proteínas relacionadas a la patogénesis, las cuales podrían estar en mayor proporción en la variedad resistente.

Estudios previos señalan que el contenido de los ácidos fenólicos en frutos de tomate está influenciado por la variedad. Martínez-Valverde *et al.* (2002), reportaron diferencias significativas en el contenido de ácidos fenólicos en nueve variedades de frutos de tomate, siendo las variedades "Ramillete", "Pera" y "Canario" las que presentaron la mayor concentración de ácido caféico con 13, 12.34 y 12.85 mg/kg p.f., respectivamente; mientras que las variedades "Señor" y "Liso" presentaron las concentraciones más bajas con 1.39 y 1.44 mg/kg p.f., respectivamente. Asimismo, las variedades "Rambo", "Señor", "Ramillete" y "Liso", presentaron el mayor contenido de ácido clorogénico, con 27.91, 32.84, 26.07 y 32.79 mg/Kg p.f., respectivamente; mientras que las variedades "Pera" y "Daniella", presentaron la menor concentración, con 14.31 y 14.68 mg/Kg p.f., respectivamente. En nuestro estudio, el tomate variedad "Pinto" presentó un contenido de ácido vanillico mayor con respecto a los ácidos clorogénico y caféico, lo cual puede deberse a las características de la variedad utilizada.

En la **figura 17** se puede apreciar el contenido de ácidos fenólicos libres totales presentes en epicarpio de tomate sano e infectado con *A. alternata*, durante el almacenamiento a 25°C. Se puede apreciar que en los primeros dos días de almacenamiento no existieron diferencias significativas entre el epicarpio sano y el infectado ($P>0.05$); sin embargo, a los 4 días de almacenamiento se observó un contenido de ácidos fenólicos totales en el epicarpio infectado (58.99 mg/100g p.s.), significativamente mayor con respecto al epicarpio sano (46.52 mg

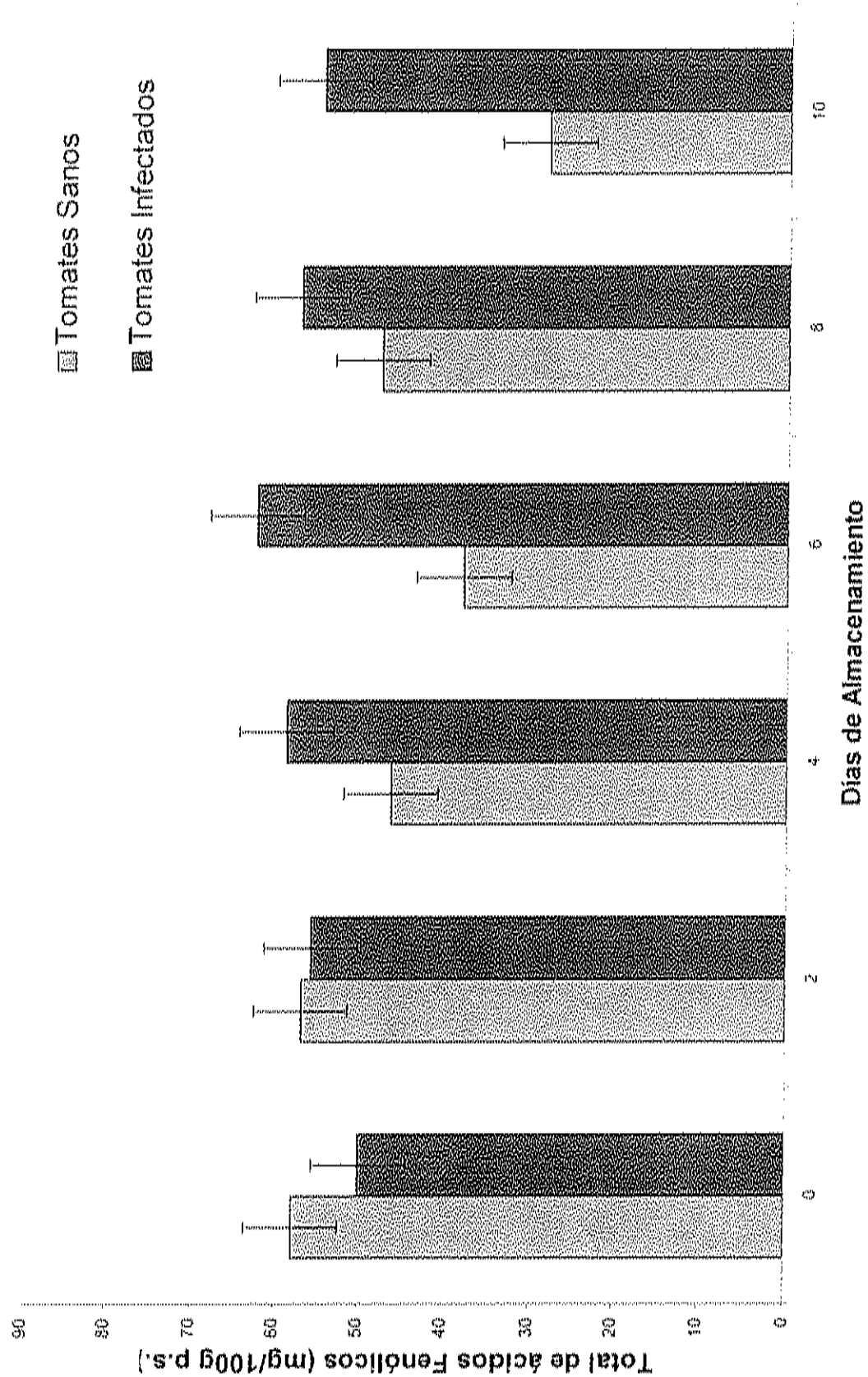


Figura 17. Contenido total de ácidos fenólicos en epicarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata*, durante almacenamiento a 25°C.

/100g p.s.). Este mismo comportamiento se presentó en el día 6, en donde se observó un contenido de 63 mg/100g p.s. en epicarpio infectado, el cual fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) con respecto al epicarpio sano (38 mg/100g p.s.). Sin embargo, en el día 8 no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el contenido de ácidos fenólicos libres presentes en el tejido sano e infectado; mientras que a los 10 días de almacenamiento el contenido de ácidos fenólicos totales en el epicarpio infectado fue 55 mg/100g p.s. significativamente mayor ($P \leq 0.05$) al epicarpio sano con 28.28 mg/100g p.s.

Se puede observar que, en general, el contenido de ácidos fenólicos totales en epicarpio sano, tendió a disminuir durante el almacenamiento; mientras que en el epicarpio infectado hubo una ligera tendencia a incrementar hasta el día 6, lo cual marca las diferencias estadísticas encontradas entre el epicarpio sano e infectado a los 4 y 6 días de almacenamiento. Este comportamiento puede ser debido probablemente a que a partir del día 4 posterior a la inoculación, cuando la enfermedad fue más evidente en los frutos, el tomate respondió al ataque de *A. alternata* produciendo una mayor cantidad de ácidos fenólicos en comparación con los frutos sanos.

El contenido de ácidos fenólicos libres totales presentes en mesocarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata*, durante el almacenamiento a 25°C, se puede observar en la **figura 18**. En general se puede observar que el contenido total de ácidos fenólicos presentes en mesocarpio fue mayor con respecto al epicarpio, al observarse un contenido de 40.35 a 74.71 mg/100g p.s. en mesocarpio; mientras que en el epicarpio fue de 28.27 a 57.06 mg/100g p.s. El comportamiento observado en el mesocarpio sano fue diferente al observado en el epicarpio sano, ya que el contenido de ácidos fenólicos totales en el mesocarpio se mantuvo constante durante los primeros 4 días de almacenamiento, con un contenido promedio de 71.51 mg/100g p.s., para después disminuir hasta el término del almacenamiento, con un contenido de 40.34 mg/100g p.s. Un comportamiento similar se observó en el mesocarpio infectado, en el cual el contenido de ácidos fenólicos totales se mantuvo constante durante los primeros 6 días de almacenamiento, con un contenido promedio de 57.69 mg/100g p.s.

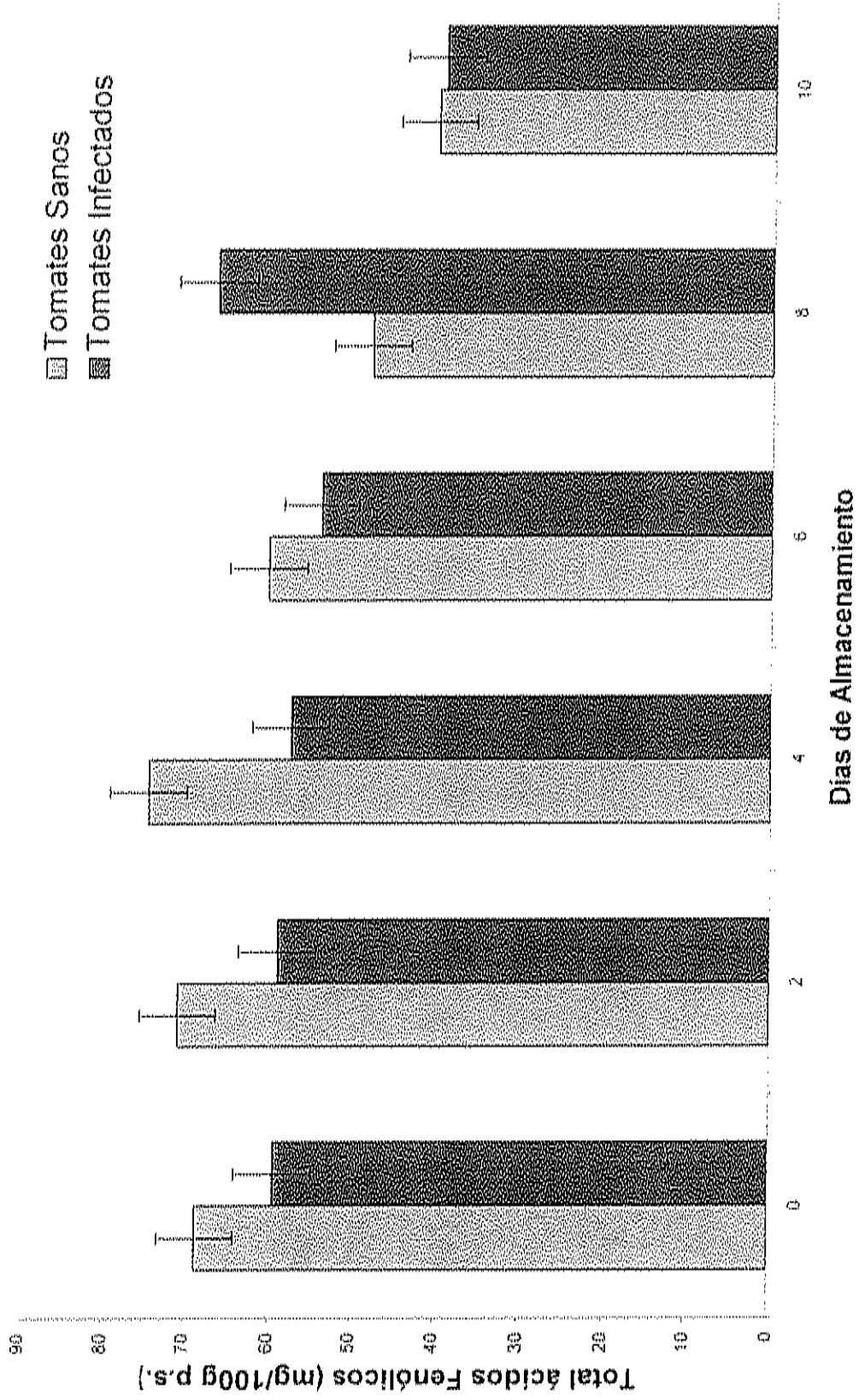


Figura 18. Contenido total de ácidos fenólicos en mesocarpio de tomate sano e infectado por *A. alternata*, durante almacenamiento a 25°C.

Al comparar el contenido de los ácidos fenólicos entre los tratamientos, se observó que a los 2 y 4 días, el contenido en mesocarpio infectado (59.17 y 59.70 mg/100g p.s., respectivamente) fue significativamente menor con respecto al contenido en el mesocarpio sano (68.78 y 71.08 mg/100g p.s., respectivamente) ($P \leq 0.05$). Sin embargo, a los 8 días, el contenido de los ácidos fenólicos en mesocarpio infectado, se incrementó a 66.8 mg/100g p.s., lo cual representa un aumento del 39% en el contenido total de estos ácidos en el mesocarpio infectado con respecto al mesocarpio sano (48.06 mg/100g p.s.), siendo diferentes significativamente ($P \leq 0.05$). Este incremento pudo ser debido a que posiblemente en este día el tejido infectado respondió el estrés provocado por el hongo *A. alternata* al sintetizar de *novo* los ácidos fenólicos libres.

Asimismo, estos resultados coinciden con los publicados por Mahmood y Saxena (1986), quienes encontraron que al infectar 11 variedades de plántulas de tomate con el nemátodo *Rotylenchulus reniformis*, el contenido de fenoles totales se incrementó en todas las variedades y también el contenido total de ácidos fenólicos (mg/100 mg de p.s.) respecto a las plantas control. Lo anterior, los llevó a concluir que el incremento en el contenido de compuestos fenólicos está relacionado con el mecanismo de defensa de las plantas hacia cualquier ataque por patógenos.

Años más tarde, Brignolas *et al.* (1995) evaluaron el contenido de 5 compuestos fenólicos: (+)-catequina y taxifolin-glicósido (flavonoide); astringenina, resveratrol e isorhapontina (estilbenos) en árboles piceas (*Picea abies* Karst.) inoculados con el hongo *Ophiostoma polonicum*. Los autores observaron un aumento significativo ($P \leq 0.05$) en el contenido de (+)-catequina acorde a los días de evaluación (0, 6 y 12) con respecto al testigo sin inocular. No así en el contenido de taxifolin-glicósido, astringenina, resveratrol e isorhapontina, los cuales presentaron valores similares en los tejidos sanos e infectados.

Recientemente, Von Roepenack-Layahe *et al.*, (2003) determinaron en plantas de tomate el contenido de dos compuestos fenólicos implicados en el mecanismo de defensa hacia patógenos. Las plantas fueron inoculadas con el hongo *Cladosporium fulvum* y se cuantificó el contenido de *p*-

cumariolnoradrenalina y *p*-cumaroilactopamina. Los autores observaron que el contenido del primer compuesto aumentó significativamente a las 21 horas postinóculo (30 nmol/100mg p.s.) con respecto a las plantas no inoculadas (2.5 nmol/100mg p.s.). Mientras que el segundo metabolito presentó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) respecto al testigo, a partir de las 9 horas de haberse realizado la inoculación alcanzando el máximo contenido a las 21 horas, para después descender a las 24 horas. Sin embargo, aunque los valores de ambos compuestos disminuyeron drásticamente, continuaron siendo diferentes estadísticamente en relación a las plantas testigo.

Gayoso *et al.* (2004), reportaron un incremento a los cinco días en el contenido de ácidos fenólicos libres (expresados como $\mu\text{g/g}$ peso fresco) presentes en raíces y hojas de chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) infectadas con *Phytophthora capsici*, con respecto a plantas sanas. Los autores encontraron diferencias significativas en el día 7 al comparar el contenido de ácidos fenólicos libres en tallos y hojas sanas e infectadas.

Por otra parte, Bily *et al.*, (2003) evaluaron el contenido de los ácidos fenólicos *p*-cumárico y ferúlico en el pericarpio de granos de dos plantas híbridas de maíz, "Funks G-4106", variedad resistente a *Fusarium graminearum* y "Pioneer 3905" variedad susceptible. Los autores reportaron que al inocular estos granos no existieron diferencias entre ellos, en cuanto al contenido de ácido *p*-cumárico, ya que la variedad "Funks G-4106" presentó un contenido de 1.05 mg/g y la susceptible de 1.16 mg/g. Sin embargo, en el caso del contenido de ácido ferúlico, sí existió una diferencia en cuanto a su contenido, ya que el pericarpio de los granos de la variedad resistente presentó un contenido de 20.63 mg/g, el cual fue significativamente mayor con respecto a los granos de la variedad susceptible, con 17.96 mg/g.

Los autores concluyeron, que el ácido ferúlico en los granos de maíz resistentes es un factor de resistencia contra *Fusarium graminearum*, ya que se ha comprobado que este ácido fenólico tiene actividad fungistática contra este hongo a una concentración de 650 ppm (Assabgui *et al.*, 1993). Por lo que este trabajo concuerda con nuestros resultados, debido a que en nuestro estudio no todos los

ácidos fenólicos se incrementaron como respuesta a la infección causada por el hongo *Alternaria alternata*.

Los resultados de este estudio sugieren que los ácidos fenólicos juegan un papel muy importante en el mecanismo de defensa de frutos de tomate asociado a microorganismos patógenos, como es el caso de *Alternaria alternata*.

Actividad Antimicótica *In Vitro* de los Ácidos Fenólicos

La actividad antimicótica *in vitro* de los extractos metanólicos de epicarpio y mesocarpio de tomate comparados con los ácidos fenólicos comerciales a una concentración de 25 mM, sobre la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata*, expresada como porcentaje de efectividad (% EF), se presenta en la **figura 19**. Se puede apreciar que el ácido vanílico fue el que presentó el menor porcentaje de efectividad más bajo (EF) con 67.71% de esporas no germinadas; mientras que el ácido caféico y el ácido clorogénico presentaron un porcentaje de efectividad de 76.96 y 79.27, los cuales fueron mayores con respecto al ácido vanílico ($P \leq 0.05$), así como con respecto a la mezcla de los ácidos fenólicos y los extractos metanólicos de tomate. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con agua, metanol, ácido caféico y ácido clorogénico ($P > 0.05$).

En cambio, los tratamientos mezcla 25 mM, solución extractora (metanol:2,3-ter-butyl-4-hidroxianizol: ácido acético), extracto metanólico de epicarpio y extracto metanólico de mesocarpio de tomate, presentaron los porcentajes de efectividad de 86.31, 85.53, 87.10 y 90.84 respectivamente, los cuales fueron significativamente mayores con respecto a los otros tratamientos ($P \leq 0.05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los extractos metanólicos de tomate (epicarpio y mesocarpio) y la solución extractora, por lo que se puede suponer que la actividad antimicótica observada en los extractos, se debe a los compuestos que forman la solución extractora, más que a los compuestos que pudieron ser extraídos de ambos tejidos del tomate.

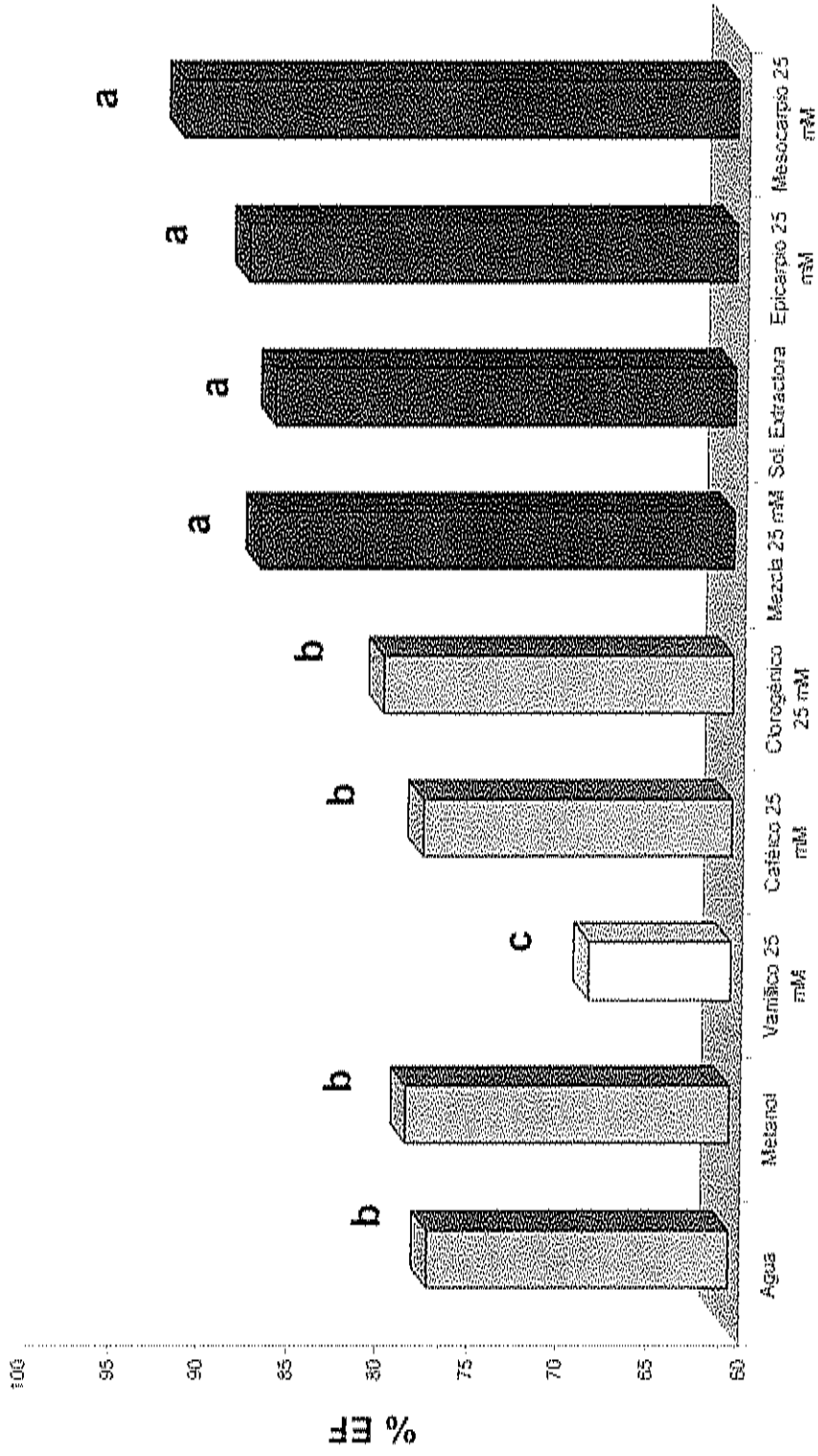


Figura 19. Porcentaje de efectividad de los fenoles (%EF) a una concentración de 25 mM sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata*.

Asimismo, se puede observar que el tratamiento con agua presentó un porcentaje de efectividad de 76.56 %. Esto es debido a que la germinación de esporas inició a las 2 horas de incubación, por lo que a las 3 horas en que fue determinada la actividad, no se presentó un 100% de germinación de esporas, sino solo el 25% aproximadamente, por lo que en este caso en particular, no es precisamente porcentaje de inhibición de esporas, sino que son las esporas que a ese tiempo germinaron.

En la **figura 20** se presenta el porcentaje de efectividad de los fenoles a una concentración de 50mM, sobre la germinación de esporas de *A. alternata*. Se puede observar que al aumentar la concentración de los distintos tratamientos de 25mM a 50 mM, también se aumentó el porcentaje de efectividad de los fenoles (EF). Los tratamientos agua y metanol presentaron porcentajes de esporas no germinadas de 76.56 y 77.75, los cuales fueron estadísticamente menores con respecto a los demás tratamientos. También se puede observar que el ácido vanílico presentó el menor porcentaje de efectividad (79.59) con respecto a los diferentes ácidos fenólicos evaluados individualmente y con respecto a los extractos metanólicos de epicarpio y mesocarpio de tomate ($P \leq 0.05$).

Los tratamientos con extractos de epicarpio y mesocarpio de tomate fueron más efectivos con respecto a los ácidos fenólicos comerciales tanto en mezcla como individualmente, en inhibir la germinación de esporas de *A. alternata*, los cuales presentaron porcentajes de efectividad de 90 y 93% respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ambos extractos ($P > 0.05$). Esta efectividad observada en los extractos metanólicos de tomate puede ser debida no solo a los ácidos fenólicos que previamente fueron identificados, sino también a otros compuestos que pudieron ser extraídos durante el proceso, como isoflavonoides, flavonas, flavonoles, y otros que también pueden presentar un efecto antimicótico.

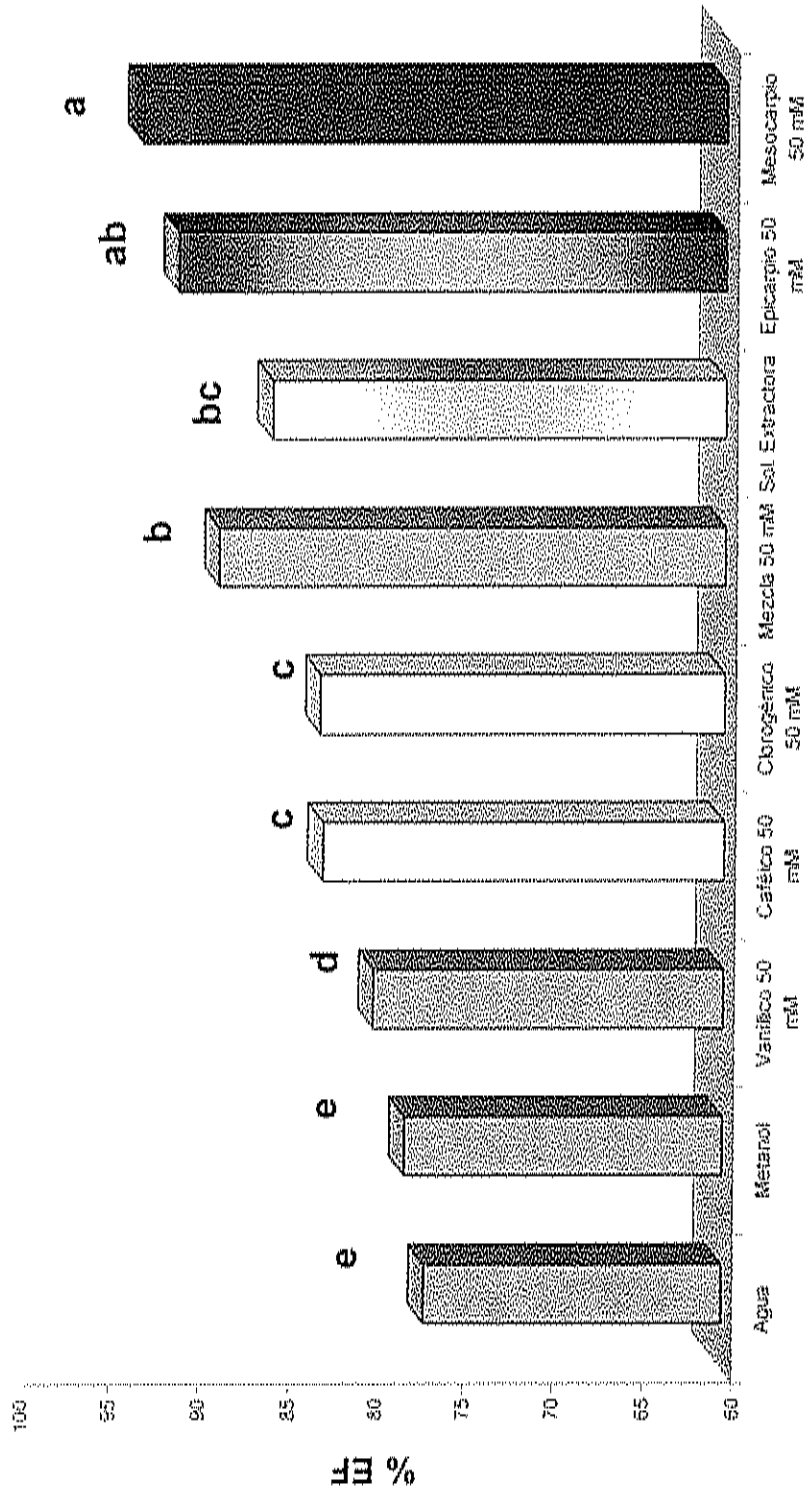


Figura 20. Porcentaje de efectividad de los fenoles (%EF) a una concentración de 50 mM sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata*.

La actividad antimicótica *in vitro* de los extractos metanólicos de tomate comparados con los ácidos fenólicos comerciales a una concentración de 100 mM, sobre la inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria alternata*, expresada como porcentaje de efectividad (% EF), se presenta en la **figura 21**. Se puede apreciar que nuevamente el ácido vanílico presentó el menor porcentaje de efectividad (78.71), con respecto a los ácidos caféico, clorogénico y a la mezcla de los ácidos fenólicos. No se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de efectividad del ácido vanílico y los tratamientos agua y metanol ($P>0.05$).

En el caso de los tratamientos con ácido caféico y clorogénico, estos presentaron una inhibición de la germinación de esporas del 84%, siendo diferentes estadísticamente con respecto a los otros tratamientos ($P\leq 0.05$). Asimismo, se puede observar, que la mezcla de ácidos fenólicos presentó un porcentaje de inhibición o efectividad de 89.78, el cual fue significativamente mayor con respecto a los demás tratamientos, lo cual puede indicar que la mezcla de los ácidos vanílico, caféico y clorogénico, presentaron un efecto sinérgico, al inhibir en mayor porcentaje la germinación de esporas de *A. alternata*.

El porcentaje de efectividad de los ácidos fenólicos a una concentración de 200 mM, sobre la germinación de esporas de *A. alternata*, se presenta en la **figura 22**. En esta figura se puede observar que los ácidos fenólicos a esta concentración, presentaron un comportamiento similar al observado a una concentración menor (100 mM). De los tres ácidos fenólicos evaluados individualmente, el ácido vanílico presentó el menor porcentaje de efectividad sobre las esporas de *A. alternata*; sin embargo, no fue diferente significativamente ($P>0.05$) con respecto a los controles agua y metanol, por lo que se puede suponer que este ácido fenólico en particular, no tuvo un efecto antimicótico.

En cambio, los ácidos caféico y clorogénico presentaron porcentajes de inhibición de 86.21 y 85.79, respectivamente, los cuales fueron significativamente mayores a los tratamientos ácido vanílico, agua y metanol ($P\leq 0.05$).

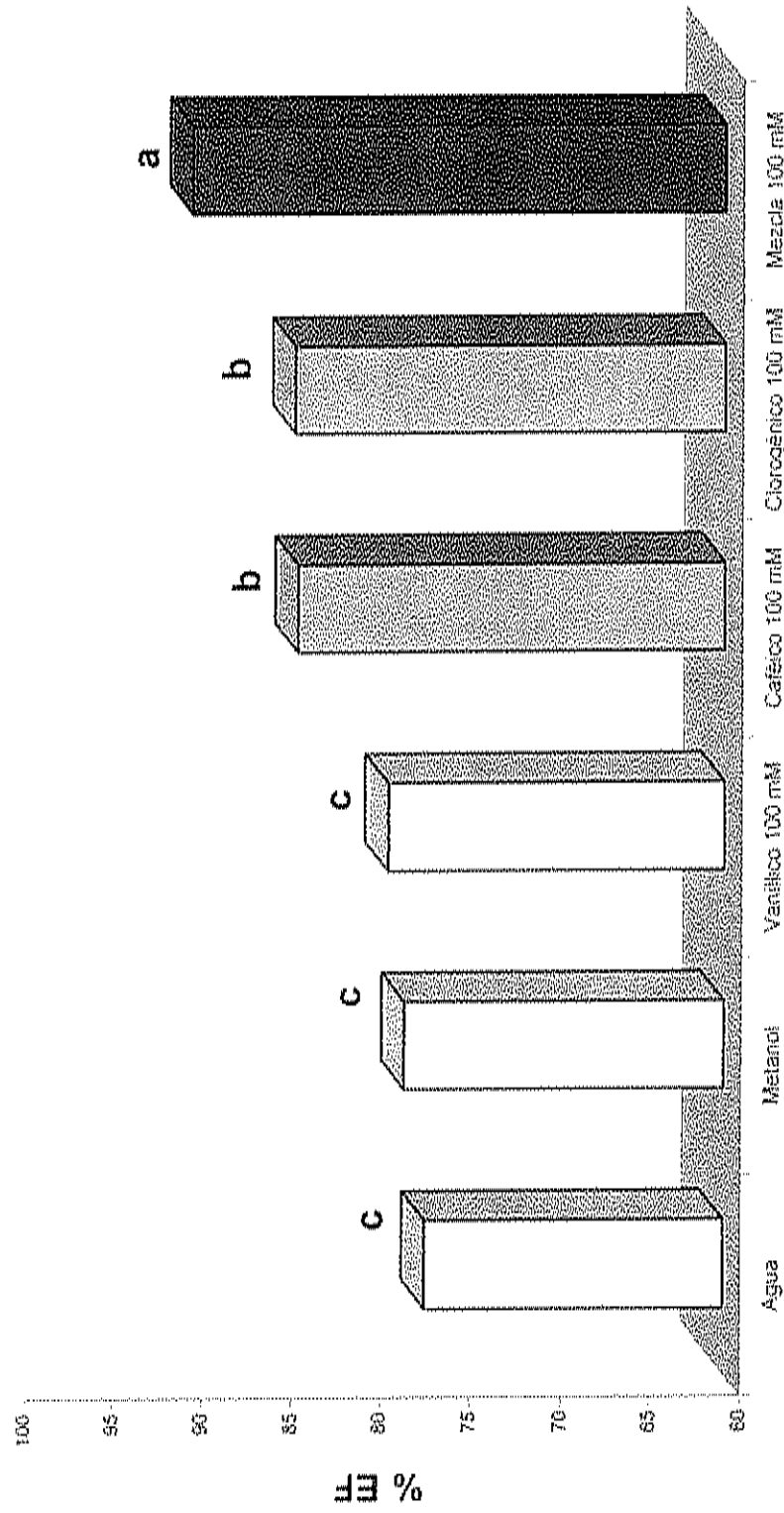


Figura 21. Porcentaje de efectividad de los fenoles (%EF) a una concentración de 100 mM sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata*.

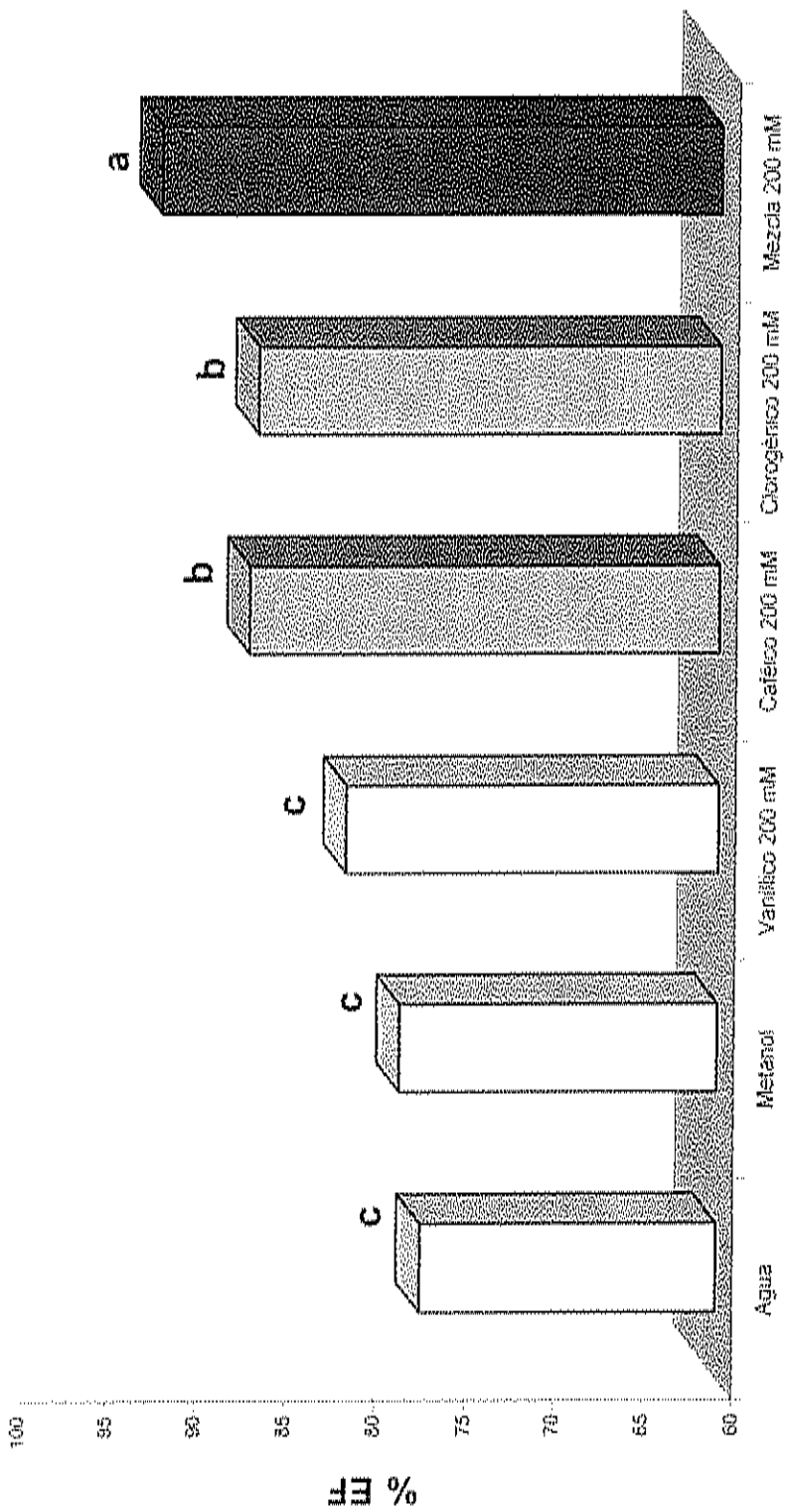


Figura 22. Porcentaje de efectividad de los fenoles (%EF) una concentración de 200 mM sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata*.

La mezcla de los ácidos fenólicos fue la más efectiva en inhibir la germinación de esporas, la cual presentó un porcentaje de efectividad de 91.3, lo cual coincide con los resultados obtenidos de los ácidos fenólicos a una concentración de 100 mM.

La **figura 23** muestra que los porcentajes de efectividad de los ácidos fenólicos a una concentración de 500 mM, sobre la germinación de esporas de *A. alternata*. Se puede observar que a esta concentración, los ácidos vanillico, caféico y clorogénico presentaron porcentajes de efectividad de 82.79, 86.91 y 88.20, los cuales no fueron estadísticamente diferentes entre ellos ($P>0.05$), pero si fueron diferentes significativamente con respecto a los tratamientos agua y metanol, los cuales presentaron los porcentajes de inhibición más bajos (76.55 y 77.75 %, respectivamente) ($P\leq 0.05$). Nuevamente, la mezcla de los ácidos fenólicos presentó el mayor porcentaje de efectividad con respecto a los otros tratamientos, observándose un EF del 93.24% el cual fue estadísticamente diferente a los demás tratamientos ($P\leq 0.05$).

Al analizar los porcentajes de efectividad de los ácidos fenólicos comerciales y extractos metanólicos de tomate en las diferentes concentraciones evaluadas, se puede observar que a medida que fue aumentando la concentración, también aumentó el porcentaje de efectividad, siendo la concentración de 500 mM en la cual se presentaron los porcentajes de efectividad más altos. Asimismo, la mezcla de los ácidos fenólicos a una concentración de 500 mM, presentó el mayor porcentaje de efectividad con respecto a los ácidos fenólicos evaluados en forma individual, al inhibir en mayor porcentaje la germinación de esporas de *A. alternata*.

Se puede observar que los extractos metanólicos del mesocarpio fueron los que presentaron los mejores resultados al obtener un EF por encima del 90% en ambas concentraciones (25 y 50 mM). No fue posible evaluar los extractos metanólicos de tomate a concentraciones mayores de 50 mM, debido a que el volumen requerido para obtener las concentraciones de 100, 200 y 500 mM era muy alto en comparación con los demás tratamientos, lo cual podría tener un efecto sobre el porcentaje de efectividad.

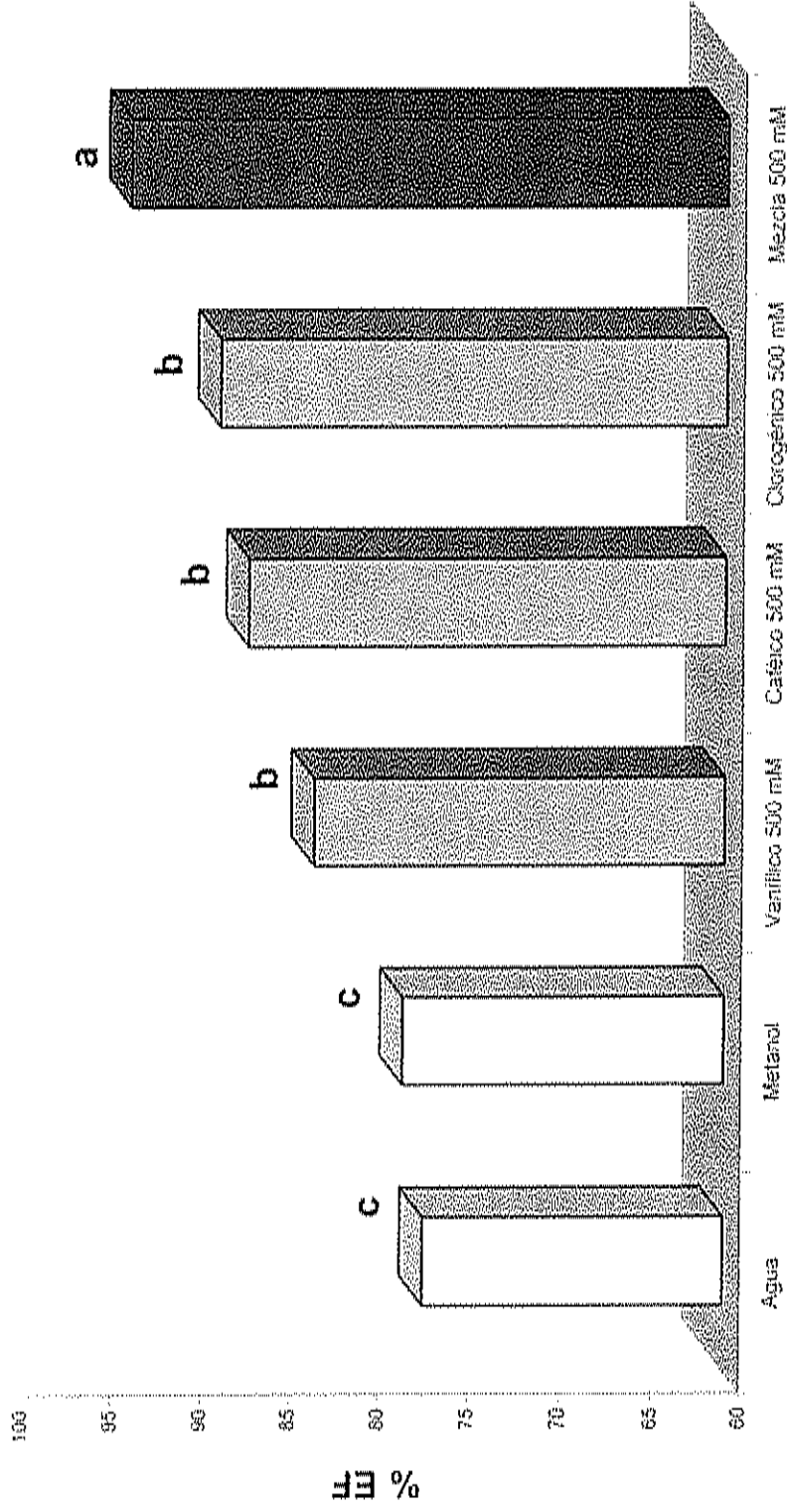


Figura 23. Porcentaje de efectividad de los fungicidas (%EF) a una concentración de 500 mM sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata*.

Asimismo, se observó que no existieron diferencias significativas entre el % EF presentado por el ácido caféico comparado con el ácido clorogénico en todas las concentraciones evaluadas (25, 50, 100, 200 y 500 mM) ($P>0.05$). Sin embargo, el ácido vanílico fue el que presentó los porcentajes más bajos de EF (67-82 %) y fueron diferentes ($P\leq 0.05$) en comparación con el resto de los tratamientos. Esta baja actividad antimicótica observada en el ácido vanílico puede ser debido a que su molécula es más sencilla con respecto al caféico y clorogénico, al presentar solamente dos grupos hidroxilo, en comparación con los tres grupos del ácido caféico y cinco del ácido clorogénico; ya que como se mencionó anteriormente, estos grupos hidroxilos participan en la producción de peróxido de hidrógeno, los cuales pueden actuar directamente en la inactivación de enzimas, o rompiendo las cadenas del ácido ribonucléico y/o en la peroxidación de lípidos, perturbando la integridad de la membrana celular del hongo y afectando su capacidad para esporular.

Aunque nuestros resultados fueron en inhibición de germinación de esporas, éstos presentan cierta similitud con los reportados en la literatura. Cahill y McComb (1992), reportaron que los ácidos fenólicos cinámico, *p*-cumárico, vanílico, ferúlico y caféico inhibieron por completo el crecimiento micelial de *Phytophthora cinnamomi*, a una concentración de 10 mM, mientras que los ácidos clorogénico y protocatéico solamente lograron una reducción del 23 y 20 %, respectivamente.

Asimismo, Naim *et al.* (1974), evaluaron mezclas de tres isoflavonas de frijol soya (genisteína, daidzeína y gliciteína) a una concentración de 0.1% junto con una mezcla de sus formas glicosiladas; reportando que la mezcla de las isoflavonas obtuvo mejores resultados en la reducción del crecimiento micelial *in vitro* de los hongos *Trichoderma lignorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium sp.*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizopus sp.*, al disminuir su crecimiento en 85, 60, 70, 90, 66 y 78 % respectivamente. Mientras que la mezcla con las isoflavonas glicosiladas solamente ocurrió un decremento del 40% en el hongo *Sclerotium rolfsii* y del 30 % en *Rhizoctonia solani*.

En otro estudio, Prusky *et al.* (1982), evaluaron en frutos de aguacate el efecto de 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicososa-12,15-dieno sobre el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y observaron una inhibición completa del crecimiento micelial y la germinación de esporas del hongo a una concentración de 790 $\mu\text{g/mL}$.

Años más tarde, Kramer *et al.* (1984), evaluaron la actividad antimicótica de diferentes compuestos fenólicos (isoflavonas) sobre el crecimiento micelial de *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium digitatum* y *Fusarium culmorum*, a concentraciones de 5, 20 y 80 mM. Ellos reportaron que la concentración más alta (80 mM) de las isoflavonas daidzeína, gliciteína y formononetina inhibieron en un 0, 2.1 y 4.5 %, respectivamente el crecimiento micelial de *Aspergillus ochraceus*. Sin embargo, estos compuestos no mostraron tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*. Por otra parte, la isoflavona daidzeína fue la única que tuvo un efecto significativo sobre la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium culmorum* con una reducción del 21.9 %.

Recientemente, Filippone *et al.* (1999) aislaron fragarina, un compuesto fenólico de hojas de fresa (*Fragaria ananassa*) y comprobaron que inhibe el crecimiento de diferentes especies del género *Colletotrichum*. Ellos observaron que a 8.92 μM se inhibió en un 50% el crecimiento de *Colletotrichum fragariae*; mientras que para *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* fue de 7.91 y 9.37 μM , respectivamente, la concentración que inhibió el 50 % de su crecimiento. Como se puede observar, las concentraciones es este estudio son menores a las utilizadas por nosotros, debido a que el micelio es mucho más fácil de inhibir en comparación con esporas.

Curir *et al.* (2003), evaluaron la actividad antimicótica de los ácidos fenólicos protocatéico y vanílico sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* a concentraciones de 1, 10, 20 y 50 μM . Los autores encontraron en el ensayo *in vitro*, que el ácido protocatéico solamente logró disminuir un 2 % el crecimiento micelial del patógeno a la concentración de 50 μM ; mientras que en las otras concentraciones, no se obtuvo ninguna disminución. Por otra parte, el

ácido vanílico, presentó una disminución del 2 % y 6 % a concentraciones de 20 y 50 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

Estos resultados comprueban que los ácidos fenólicos inhiben parcial o totalmente el desarrollo de fitopatógenos bajo condiciones *in vitro*, lo cual sugiere que su inducción en condiciones de estrés biótico puede deberse a que cumplen una función en el sistema de defensa de la planta.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base a los resultados experimentales de nuestro estudio se pudo establecer que no existieron cambios en el perfil de ácidos fenólicos tanto en epicarpio como en mesocarpio de frutos de tomate sano e infectado, ya que en los tejidos mencionados se pudo identificar solamente los ácidos vanílico, caféico y clorogénico.

El contenido de ácido vanílico en el epicarpio infectado con *Alternaria alternata* fue mayor que en el epicarpio sano a partir del cuarto día de almacenamiento ($P \leq 0.05$). Sin embargo, en el mesocarpio solamente se encontraron diferencias significativas el día 8 de almacenamiento entre el contenido presente en el tejido infectado respecto al sano.

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el contenido de ácido clorogénico y caféico en ambos tejidos (epicarpio y mesocarpio) tanto sano como infectado durante el almacenamiento a 25°C.

El contenido de los ácidos fenólicos totales fue mayor en el epicarpio infectado con *Alternaria alternata* que en el epicarpio sano a partir de los 4 días de almacenamiento ($P \leq 0.05$); siendo en este día en el que se hizo evidente el desarrollo de la enfermedad en los frutos de tomate. No se observó un efecto de la infección causada por *A. alternata* sobre el contenido de ácidos fenólicos totales en el mesocarpio, ya que no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el tejido sano e infectado.

Los resultados obtenidos de la actividad antimicótica de los ácidos fenólicos sobre la germinación de esporas de *Alternaria alternata* nos permiten concluir que los extractos de epicarpio y mesocarpio fueron los que presentaron los porcentajes de efectividad más altos (arriba del 90 %), con respecto a los ácidos fenólicos comerciales ($P \leq 0.05$). Individualmente los ácidos vanílico, clorogénico y caféico inhibieron la germinación de esporas por arriba del 75 %. Sin embargo, el ácido vanílico fue el que presentó los menores porcentajes de inhibición de esporas ($P \leq 0.05$); no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición de esporas con el ácido clorogénico y caféico ($P > 0.05$).

Asimismo, se puede concluir que al aplicar la mezcla de los tres ácidos fenólicos (vanílico, clorogénico y caféico), se observó un efecto sinergista en su actividad antimicótica, al presentar una efectividad mayor (superior al 85 %) con respecto a los ácidos fenólicos evaluados en forma individual ($P \leq 0.05$).

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que ciertos ácidos fenólicos libres participan de una manera activa en el mecanismo de defensa de frutos de tomate rojo maduro cv. "Pinto", hacia hongos saprófitos como es el caso de *Alternaria alternata*.

Sin embargo, recomendamos realizar más investigación acerca del comportamiento de los ácidos fenólicos durante la maduración de frutos de tomate, debido a que en este estudio solamente se evaluó en un estado de madurez y el estudio de distintos estados de maduración permitiría un mejor entendimiento de los procesos metabólicos que se realizan en la síntesis y metabolismo de ácidos fenólicos en el fruto al ser infectados por microorganismos patógenos.

Asimismo, recomendamos profundizar acerca del mecanismo de acción de los ácidos fenólicos en contra de hongos patógenos causantes de enfermedades en frutos de tomate, ya que en la actualidad no se conoce claramente como es que actúan los ácidos fenólicos (ó compuestos fenólicos) sobre la inhibición de la germinación y crecimiento de los microorganismos patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adesanya, S.A., O'Neill, M.J. and Roberts, M.F. 1986. Structure-related Fungitoxicity of Isoflavonoids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29:95-103.
- Agroenlinea. Agroenlinea.com, S.A. de C.V. 10 de Septiembre 2002. <http://www.agroenlinea.com>
- Andersen, B. 2001. Chemical and Morphological Segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105:291-299.
- Aragón, S.N. 1991. "Problemas Fitopatológicos Durante Poscosecha y su Control". En *Fisiología y Tecnología Poscosecha de Productos Hortícolas en México*. Yahia, E. e Higuera, I. (editores). Ed. Limusa, México. pp 51-56.
- Assabgui, R.A., Reid, L.M., Hamilton, R.L and Amason, J.T. 1993. Correlation of Kernel (E)-ferulic Acid Content of Maize with Resistance to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 83:949-953.
- Aver'yanov, A.A., Lapikova, V.P. and Dzhavakhiya, V.G. 1993. Active Oxygen Mediates Heat-Induced Resistance of Rice Plant to Blast Disease. *Plant Sci.* 92:27-34.
- Báez-Sañudo, R., Ojeda, C.J., Mercado, R.J.N., Mendoza, W.A.M. y Bringas-Taddei, E. 1998. "Manejo Poscosecha del Tomate". En *Manejo Poscosecha de Frutas y Verduras en Iberoamérica*. Báez-Sañudo, R. (editor). ISBN 970-18-1009-0. Hermosillo, Sonora, México. pp. 104-109.
- Bily, A.C., Reid, L.M., Taylor, J.H., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A.J., Bakan, B., Regnault-Roger, C., Pauls, K.P., Arnason, J.T. and Philogene, B.J. Dehydromers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93(6):712-719.
- Blachinski, D., Shtienberg, D., Dinooor, A., Kafkafi, U., Sujkowski, L.S., Zitter, T.A. and Fry, W.E. 1996. Influence of Foliar Application of Nitrogen an Potassium on *Alternaria* Diseases in Potato, Tomato and Cotton. *Phytoparasitica* 24(4):281-292.

- Brindle, P.A., Kuhn, P.J. and Threlfall, D.R. 1983. Accumulation of Phytoalexins in Potato-Cell Suspension Cultures. *Phytochemistry* 22:2719-2721.
- Brignolas, F., Lacroix, B., Lieutier, F., Sauvard, D., Drouet, A., Claudot, A.C., Yart, A., Berryman, A.A. and Christiansen, E. 1995. Induced Responses in Phenolic Metabolism in Two Norway Spruce Clones after Wounding and Inoculations with *Ophiostoma polonicum*, a Bark Beetle-Associated Fungus. *Plant Physiol.* 109:821-827.
- Buta, J.G. and Spaulding, D.W. 1997. Endogenous Levels of Phenolics in Tomato Fruit During Growth and Maturation. *J. Plant Growth Regul.* 16:43-46.
- Cahill, D.M. and McComb, J.A. 1992. A Comparison of Changes in Phenylalanine Ammonia-lyase Activity, Lignin and Phenolic Synthesis in the Roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *Eucalyptus marginata* (susceptible) when Infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiol. Plant Mol. Pathol.* 40:315-332.
- Carrasco, A., Boudet, A.M. and Marigo, G. 1978. Enhanced Resistance of Tomato Plants to *Fusarium* by Controlled Stimulation of their Natural Phenolic Production. *Physiol. Plant Pathol.* 12:225-232.
- Carver, T., Ingerson-Morris, S., Thomas, B. and Zeyen, R. 1995. Early Interactions During Powdery Mildew Infection. *Can. J. Botany* 73:632-39.
- Chauvet, M. y Massieu, Y. La influencia de la Biotecnología en la Agricultura Mexicana: Estudio de Caso. *Economía: Teórica y Práctica.* 18 de Noviembre de 2001. <http://www.azc.uam.mx>
- Chen, H., Zuo, Y. and Deng, Y. 2001. Separation and Determination of Flavonoids and other Phenolic Compounds in Cranberry Juice by HPLC. *J. Chromatogr.* 913:387-395.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. (eds.) pp 1250-1318.
- Collinge, D.B. and Slusarenko, A.J. 1987. Plant Gene Expression in Response to Pathogens. *Plant Mol. Biol.* 9:389-410.

- Curir, P., Dolci, M., Dolci, P., Lanzotti, V. and De Cooman, L. 2003. Fungitoxic Phenols from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) Effective Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytochemical Analysis* 14:8-12.
- Deising, H., Nicholson, R., Haug, M., Howard, R. and Mendgen, K. 1992. Adhesion Pad Formation and the Involvement of Cutinase and Sterase in the Attachment of Uredospores to the Host Cuticle. *Plant Cell* 4:1101-1111.
- DeWit, P.J.G.M. and Kodde, E. 1981. Induction of Polyacetylenic Phytoalexins in *Lycopersicon esculentum* after Inoculation with *Cladosporium fulvum*. *Physiol. Plant Pathol.* 18:143-148.
- Dixon, R.A. 1986. The Phytoalexin Response: Elicitation, Signaling and Control of Host Gene Expression. *Biol. Rev.* 61:239-291.
- Dixon, R.A. 2001. Natural Products and Plant Disease Resistance. *Nature* 411:843-847.
- Dmitriev, A.P., Tverskoy, L.A. and Grodzinsky, D.M. 1998. A Novel Approach to Inducing Fungal Resistance in Onions. *Pests and Diseases* 3:1173-1178.
- Dmitriev, A.P., Tverskoy, L.A., Kozlovsky, A.G. and Grodzinsky, D.M. 1990. Phytoalexins from Onion and their Role In Disease Resistance. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 37:235-244.
- Ebel, J. 1986. Phytoalexin Synthesis: The Biochemical Analysis of the Induction Process. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:235-264.
- FAO. 2004. <http://faostat.fao.org/faostat/form>.
- Filippone, M.P., Ricci, J.D., Mamani de Marchese, A., Farlas, R.N. and Castagnaro, A. 1999. Isolation and Purification of a 316 Da Preformed Compound from Strawberry (*Fragaria ananassa*) Leaves Active Against Plant Pathogens. *Federation of European Biochemical Societies* 459:115-118.
- Fleuriet, A. and Macheix, J.J. 1981. Quinyl Esters and Glucose Derivates of Hydroxycinnamic Acids During Growth Ripening of Tomato Fruit. *Phytochemistry* 20:667-671.

- French, E.R. y Herbert, T.T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. pp. 164-166 y 176-179.
- Gayoso, C., Pomar, F., Merino, F. and Bernal, M.A. 2004. Oxidative Metabolism and Phenolic Compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 102:1-13.
- Hahn, M.G., Bonhoff, A. and Grisebach, H. 1985. Quantitative Localization of the Phytoalexin Glyceollin in Relation to Fungal Hyphae in Soybean Roots Infected with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Plant Physiol.* 77:591-601.
- Hammond-Kosack, K. and Jones, J. 2000. Responses to Plant Pathogens. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. (eds.) pp 1102-1156.
- Hasija, S.K. 1970. Physiological Studies of *Alternaria citri* and *A. tenuis*. *Mycologia* 62:289-295.
- Hintze, J.L. 2000. NCSS 2000 Quick Start and Self Help Manual. Statistical System for Windows. Published by NCSS. Kayiville, Utah, USA.
- Hobson, G. E. and Davies J.N. 1971. The Tomato. In: *The Biochemistry of Fruits and their Products*. Hulme, A.C. (ed). Vol II. Ed. Academic press. London, England. pp. 437,619,780.
- Howard, R., Ferrari, M., Roach, D. and Money, N. 1991. Penetration of Hard Substrates by a Fungus Employing Enourmous Turgor Pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:11281-11284.
- Johnson, G. and Schaal, L.A. 1957. Chlorogenic Acid and other Orthodihydricphenols in Scab-Resistant Russet Burbank and Scab-Susceptible Triumph Potato Tubers of Different Maturities. *Phytopathol.* 247:253-255.
- Jones, J. B., Jones, J.P., Stall, R.E. and Zitter, T.A. 1993. *Compendium of Tomato Diseases*. Ed. APS Press, pp. 9, 11, 16-17.
- Knogge, W. 1996. Fungal Infections in Plants. *Plant Cell* 8:1711-1722.

- Krarup, C. 2001. Una limitante para las Exportaciones de hortalizas de Estación Cálida. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile. www.pucl.cl.
- Kosuge, T. 1969. The Role of Phenolics in Host Response to Infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 7:195-222.
- Krämer, R.P., Hindorf, H., Jha, H.C., Kallage, J. and Zilliken, F. 1984. Antifungal Activity of Soybean and Chickpea Isoflavones and their Reduced Derivatives. *Phytochem.* 23 (10):2203-2205.
- Kunoh, H., Nicholson, R. Yoshioka, H., Yamaoka, N. and Kobayashi, I. 1990. Preparation of the Infection Court by *Erysiphe graminis*: Degradation of the Host Cuticle. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36:397-407.
- Macheix, J., Fleuriot, A. and Billot, J. 1990. Fruit Phenolics. Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. pp 378.
- Mahmood, I. and Saxena, S.K. 1986. Relative Susceptibility of Different Cultivars of Tomato to *Rotylenchulus reniformis* in Relation to Changes in Phenolics. *Revue Nématol.* 9(1):89-91.
- Marculescu, A., Hanganu, D. and Neli-Kinga, O. 2001. Qualitative and Quantitative Determination of the Caffeic Acid and Chlorogenic Acid from Three Chemovarieties of *Chrysanthemum balsamita* L. *Roum. Biotechnol. Lett.* 6:477-484.
- Martínez de Toda, F. 2003. Viticultura de Calidad: Factores que Afectan al Contenido de Compuestos Fenólicos. *Revista ACE de Enología.* http://www.acenologia.com/ciencia59_1.htm (8/04/2003).
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., Provan, G. and Chesson, A. 2002. Phenolic Compounds, Lycopene and Antioxidant Activity in Commercial Varieties of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.* 82:323-330.
- Matern, U. and Kneusel, R.E. 1988. Phenolic Compounds in Plant Disease Resistance. *Phytoparasitica* 16(2): 153-170.
- Mattila, P. and Kumpulainen, J. 2000. Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-derived Foods by HPLC with Diode-array Detection. *J. Agric. Food Chem.* 50:3660-3667.

- Mendgen, K., Hahn, M. and Deising, H. 1996. Morphogenesis and Mechanisms of Penetration by Plant Pathogenic Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:367-387.
- Mikulic-Petkovsek, M., Usenik, V. and Stampar, F. 2003. The Role of Chlorogenic Acid in the Resistance of Apples to Apple Scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.). *Zb. Biotech. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.* 81(2): 233-242.
- Mizutani, J. 1999. Selected Allelochemicals. *Critical Rev. Plant Sci.* 18:653-671.
- Naim, M., Gestetner, B., Zilkah, S., Birk, Y. and Bondi, A. 1974. Soybean Isoflavones: Characterization, Determination and Antifungal Activity. *J. Agric. Food Chem.* 22(5):806-810.
- Ojeda, A.J. 1995. "Evaluación del Manejo Postcosecha de Tomate para la Obtención de Modelos de Predicción de Pérdidas Cualitativas y Cuantitativas". Tesis de Maestría. Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. pp. 61.
- Ozcelik, S., Ozcelik, H. and Beuchat, L.R. 1990. Toxin Production by *Alternaria alternata* in Tomatoes and Apples Stored under Various Conditions and Quantitation of the Toxins by HPLC. *Int. J. Food. Microbiol.* 11:187-194.
- Ousbourn, A. E. 1996. Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense Against Fungal Attack. *Plant Cell* 8:1821-1831.
- Palazón, J., Cusidó, R.M. y Morales, C. 2003. Metabolismo y Significación Biológica de los Polifenoles del Vino. *Revista ACE de Enología.* http://www.acenologia.com/ciencia55_2.htm (8/04/2003).
- Pascholati, S., Deising, H., Leite, B., Anderson, D. and Nicholson, R. 1993. Cutinase and Non-specific Esterase Activities in the Conidial Mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42:37-51.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1999. *Fungi and Food Spoilage.* ISBN 0-8342-1306-0. Ed. Aspen Publication, U.K. pp 69-72.
- Prusky, D., Keen, N.T., Sims, J.J. and Midland, S. 1982. Possible Involvement of Antifungal Compound in Latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on Unripe Avocado Fruits. *Phytopathol.* 72:1578-1582.

- Retig, N. 1974. Changes in Peroxidase and Polyphenoloxidase Associated with Natural and Induced Resistance of Tomato to *Fusarium* wilt. *Physiol. Plant Pathol.* 4:145-150.
- Retig, N. and Chet, I. 1974. Catechol-induced Resistance of Tomato Plants to *Fusarium* wilt. *Physiol. Plant Pathol.* 4:469-475.
- Reuveni, M. and Cohen, Y. 1978. Growth Retardation and Changes in Phenolic Compounds, with Especial Reference to Scopoletin, in Mildewed and Ethylene-Treated Tobacco Plants. *Physiol. Plant Pathol.* 12:179-189.
- Rotem, J. 1998. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. pp. 77-94.
- Ruiz, L.L. 1999. "Aislamiento e Identificación de Especie de *Fusarium* y su Control en Frutos de Melón Reticulado (*Cucumis melo* L.)" Tesis de Maestría. Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. pp. 69.
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1994. *Fisiología Vegetal*. Ed. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F. ISBN 0-534-15162-0. pp. 351-358.
- Sanchis, V., Sanclemente, A., Usall, J. And Vinas, I. 1993. Incidence of Mycotoxigenic *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* in Barley. *J. Food Prot.* 56:246-248.
- Sharon, A., Ghirlando, R. and Gressel, J. 1992. Isolation and Purification of 2-(*p*-hydroxyphenoxy)-5,7-dihydroxycromone: a Fungal Induced Phytoalexin from *Cassia obtusifolia*. *Plant Physiol.* 98:303-308.
- Snowdon, A. L. 1990. A Color Atlas of Postharvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Vol. II Vegetables. pp. 16, 53, 56, 68, 76.
- Snyder, B.A. and Nicholson, R.L. 1990. Synthesis of Phytoalexins in Sorghum as a Site-Specific Response to Fungal Ingress. *Science* 248:1637-1639.
- Southerton, S.G. and Deverall, B.J. 1990. Changes in Phenolic Acid Levels in Wheat Leaves Expressing Resistance to *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37:437-450.
- Stinson, E.E. 1981. Mycotoxins Production in Whole Tomatoes, Apples, Oranges and Lemons. *J. Agric. Food Chem.* 29:790-792.

- Suslow, T.V. and Cantwell, M. Tomato (jitomate). 2000. Department of Vegetable Crops, University of California, Davis. <http://postharvest.ucdavis.edu> (31/03/2003)
- Treutter, D. and Feucht, W. 1990. The Pattern of flavan-3-ols in Relation to Scab Resistance of Apple Cultivars. *J. Hort. Sci.* 65:511-517.
- Umaña-Rojas, G. 1998. "Elementos de Patología Poscosecha". En Manejo Poscosecha de Frutas y Verduras en Iberoamérica. Báez-Sañudo, R. (editor). ISBN 970-18-1009-0. Hermosillo, Sonora, México. pp. 63-73.
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A. and Farmer, E.E. 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus Phytoanticipins. *Plant Cell* 9:1191-1192.
- Vidhyasekaran, P. 1997. Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense Mechanisms. Ed. Marcel Dekker, New York, U.S.A. pp 1-10, 380-493.
- Von Roepenack-Lahaye, E., Newmann, M.A., Schornack, S., Hammond-Kosack, K.E., Lahaye, T., Jones, J.D.E., Daniels, M.J. and Maxwell-Dow, L. 2003. *p*-Coumaroyladrenaline, a Novel Plant Metabolite Implicated in Tomato Defense Against Pathogens. *Journal of Biological Chemistry* 278(44):43373-43383.
- Wade, N.L., Kavanagh, E.E. and Sepiah, M. 1993. Effects off Modified Atmosphere Storage on Banana Postharvest Diseases and the Control of Bunch Main-stalk Rot. *Postharvest Biol. and Technol.* 3:143-154.
- Weidenborner, W., Hindorf, H., Hem, C.J., Tsotsonos, P. and Egge, H. 1990. Antifungal Activity of Isoflavonoids in Difrerent Reduces Stages on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytochemistry* 29:801-803.
- Wiils, R. McGlasson, B., Graham, D. and Joyce, D. 1998. Postharvest. Ed. CAB International. ISBN 0 86840 560-4. p. 232.

- Suslow, T.V. and Cantwell, M. Tomato (jitomate). 2000. Department of Vegetable Crops, University of California, Davis. <http://postharvest.ucdavis.edu> (31/03/2003)
- Treutter, D. and Feucht, W. 1990. The Pattern of flavan-3-ols in Relation to Scab Resistance of Apple Cultivars. *J. Hort. Sci.* 65:511-517.
- Umaña-Rojas, G. 1998. "Elementos de Patología Poscosecha". En Manejo Poscosecha de Frutas y Verduras en Iberoamérica. Báez-Sañudo, R. (editor). ISBN 970-18-1009-0, Hermosillo, Sonora, México. pp. 63-73.
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A. and Farmer, E.E. 1994. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus Phytoanticipins. *Plant Cell* 9:1191-1192.
- Vidhyasekaran, P. 1997. Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense Mechanisms. Ed. Marcel Dekker, New York, U.S.A. pp 1-10, 380-493.
- Von Roepenack-Lahaye, E., Newmann, M.A., Schornack, S., Hammond-Kosack, K.E., Lahaye, T., Jones, J.D.E., Daniels, M.J. and Maxwell-Dow, L. 2003. *p*-Coumaroyladrenaline, a Novel Plant Metabolite Implicated in Tomato Defense Against Pathogens. *Journal of Biological Chemistry* 278(44):43373-43383.
- Wade, N.L., Kavanagh, E.E. and Sepiah, M. 1993. Effects off Modified Atmosphere Storage on Banana Postharvest Diseases and the Control of Bunch Main-stalk Rot. *Postharvest Biol. and Technol.* 3:143-154.
- Weidenborner, W., Hindorf, H., Hem, C.J., Tsotsonos, P. and Egge, H. 1990. Antifungal Activity of Isoflavonoids in Diferent Reduces Stages on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytochemistry* 29:801-803.
- Wiils, R. McGlasson, B., Graham, D. and Joyce, D. 1998. *Postharvest*. Ed. CAB International, ISBN 0 86840 560-4. p. 232.