

## CONTENIDO DE FENOLES Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ASOCIADOS CON EL DAÑO PROVOCADO POR CENICILLA EN HOJAS DE DURAZNO

### PHENOLICS AND ENZYMATIC ACTIVITY ASSOCIATED WITH DAMAGE CAUSED BY POWDERY MILDEW ON PEACH LEAVES

Eduardo Hernández Sánchez<sup>1\*</sup>, Marcos Soto Hernández<sup>2</sup>, Jorge Rodríguez Alcázar<sup>1</sup>  
y Teresa Colinas León<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Colegio de Postgraduados, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, <sup>2</sup>Instituto de Recursos Naturales. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230 Montecillo, Estado de México, <sup>3</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Km. 38.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230 Chapingo, Estado de México. Tel 01 (595) 952-1500 Ext. 6133

\*Autor responsable

#### RESUMEN

El propósito de la investigación fue determinar si existe una relación entre compuestos fenólicos y enzimas, con la susceptibilidad del durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch) a la cenicilla (*Sphaerotheca pannosa* (Wallr.) Lev. var. *persicae* Wor.). La evaluación fue hecha en agosto de 1998 bajo condiciones de invernadero en el otoño de 1999. Las variables de estudio fueron las diferencias entre genotipos respecto al grado de susceptibilidad a la cenicilla, el periodo de latencia de la infección, la infección final, la concentración de fenoles totales y la actividad de las enzimas: polifenoloxidasas (PFO) y fenilalanina amonio-liasa (FAL). El metabolismo de los fenoles como estrategia de defensa del durazno ante el ataque de la cenicilla es una respuesta complicada. La concentración de fenoles totales, y la actividad de las enzimas FAL y PFO se incrementaron después de la inoculación en todos los genotipos de durazno evaluados, pero sólo hasta las 24 h. En este caso destacan por su mayor actividad enzimática los genotipos con índice de susceptibilidad cero. A las 24 h después de la inoculación se registró una correlación negativa entre el índice de susceptibilidad a cenicilla y el contenido de fenoles totales, FAL y PFO ( $r = -0.6059$ ;  $r = -0.4938$  y  $r = -0.6476$ , respectivamente). Se puede inferir entonces que la participación de los fenoles, FAL y PFO en el mecanismo de defensa del durazno ante el ataque de la cenicilla, ocurre principalmente en las primeras 24 h después de la inoculación, para evitar el establecimiento del patógeno, sobre todo en los genotipos tolerantes. El tiempo de aparición de conidios y conidióforos (periodo de latencia) de cenicilla sobre hojas de durazno, difiere según el índice de susceptibilidad; conforme éste disminuye, el periodo de latencia aumenta.

**Palabras clave:** *Sphaerotheca pannosa*, *Prunus persica*, fenilalanina amonio-liasa, polifenoloxidasas, fenoles.

#### SUMMARY

A possible association between phenolic compounds and enzymes with the susceptibility of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* (Wallr.) Lev. var. *persicae* Wor.) was investigated in the greenhouse in August 1998 and in the autumn of 1999. The variables evaluated were degree of susceptibility to powdery mildew, latent period of infection, the final infection, the concentration of total phenolics and the activity of the enzymes: polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. Metabolism phenolics

like strategy of defense of the peach when attacked by powdery mildew are a complicated matter. Phenolic concentration and the activity of the enzymes phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenoloxidase (PPO) increased after inoculation in all of the evaluated peach genotypes, but only during the first 24 h. In this case the genotypes with a zero susceptibility index presented increased enzymatic activity. A negative correlation between the susceptibility to powdery mildew and the other variables was observed 24 h after inoculation: their respective correlation coefficients were total phenolics, -0.6059, PAL, -0.4938 and PPO, -0.6476. Perhaps participation of phenolics, PAL and PPO in peach defense mechanism after attack of powdery mildew, occurs mostly in the first 24 h after inoculation, for impede the establishment of the fungus, mainly in the tolerant genotypes. Powdery mildew latency period on peach leaves, differs according to their susceptibility index; when the index decrease, the period of latency increased.

**Index words:** *Sphaerotheca pannosa*, *Prunus persica*, phenylalanine ammonia-lyase, polyphenoloxidase, phenolics.

#### INTRODUCCIÓN

Los huertos establecidos en México con durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch) tipo "criollo", son susceptibles y regularmente atacados por cenicilla (*Sphaerotheca pannosa* (Wallr.) Lev. var. *persicae* Wor.), con pérdidas hasta del 90% en la producción (Pérez-González, 1997). La cenicilla afecta al durazno, chabacano (*Prunus armeniaca*), cerezo (*Prunus avium*), ciruelo (*Prunus salicina*) y almendro (*Prunus amygdalus*) (Ogawa y English, 1991). Este hongo provoca atrofiamiento de brotes lo que disminuye la fotosíntesis, la producción y la calidad del fruto en las primeras etapas de desarrollo (Keil y Wilson, 1961; Ogawa y English, 1991).

La infección de un patógeno induce el aumento de compuestos fenólicos en la planta (Hachiro, 1994; Harborne, 1997), como mecanismo de protección del tejido dañado. Por ejemplo, Guedes *et al.* (1994) determinaron que el

incremento en el contenido de fenoles y acumulación de fitoalexinas estimulan la resistencia en plantas de café (*Coffea arabica* L.) inoculadas con *Hemileia vastatrix* Berk et Br. y *Pseudomonas syringae*. Gradziel *et al.* (1998) encontraron que altos niveles de resistencia a *Monilinia fruticola* en duraznos californianos está asociada con altos niveles de compuestos fenólicos; sobresalen los ácidos clorogénico y caféico, los cuales inhiben la producción de cutinasa.

Algunas enzimas se relacionan con el grado de susceptibilidad de las plantas a enfermedades; tal es el caso de la fenilalanina amonio-liasa (FAL) que participa en la formación de fitoalexinas y fenilpropanoides (Mansfield, 1983), involucrados en la producción de flavonoides, cumarinas, estilbenos, ligninas y otros compuestos asociados con la resistencia a enfermedades. Por ello la actividad de FAL constituye un indicador de los mecanismos de defensa en las plantas ante patógenos (Bhattacharya y Ward, 1987; Heller, 1994). Al tratar semillas de *Citrus limon* L. con poligalacturonasa obtenida de *Alternaria alternata*, se observó un incremento en la actividad de FAL y en la formación de fitoalexinas, que se consideran como respuestas de defensa (Roco *et al.*, 1993).

Otra enzima involucrada es la polifenoloxidasas (PFO), la cual ha sido observada después de la infección de virus, bacterias, hongos y daños mecánicos (Mayer y Harel, 1979). En manzana (*Malus pumila*), a la floridzina (glucósido fenólico) se le ha detectado marcada actividad contra *Venturia inaequalis*; se origina mediante oxidación catalizada por una polifenoloxidasas presente en el tejido, que permite la formación de *o*-quinona, considerada como un potente fungicida. También en pera (*Pyrus communis*) se ha observado que la oxidación de arbutina genera la formación de un compuesto antibacterial (hidroquinona), el cual ha sido asociado con resistencia a *Erwinia amylovora* (Hildebrand *et al.*, citados por Métraux y Raskin, 1993).

El objetivo del presente estudio fue cuantificar los fenoles totales y la actividad de las enzimas FAL y PFO, en las hojas de seis genotipos de duraznero con diferente grado de susceptibilidad a la cenicilla.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales genéticos estudiados se ubican en el huerto experimental de la Especialidad de Fruticultura del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Méx.

Se evaluaron seis genotipos de duraznero con diferente grado de susceptibilidad a la cenicilla (CP-M1, CP-M2, CP-M3, 88-22C X 88-11N(F<sub>2</sub>), 86-28C X 88-11N(F<sub>2</sub>) y Tropic Snow X 88-11N(F<sub>2</sub>)), determinado mediante la es-

cala de evaluación reportada por Jasso (1988), quien consideró el porcentaje de hoja infectada y el número de ramas dañadas (Cuadro 1). Dicha evaluación se realizó en plantas de dos años establecidas a la intemperie.

Cuadro 1. Escala de evaluación para determinar el grado de susceptibilidad del duraznero a la cenicilla.

Escala	Descripción
0	Sin infección aparente de la enfermedad.
1	De 1 a 10 % de la superficie de la hoja con infección y con 5 o menos ramas afectadas.
2	De 1 a 10 % de la superficie de la hoja con infección y con 6 o más ramas afectadas.
3	De 11 a 20 % de la superficie de la hoja con infección y con 5 o menos ramas afectadas.
4	De 11 a 20 % de la superficie de la hoja con infección y con 6 o más ramas afectadas.
5	De 21 a 30 % de la superficie de la hoja con infección y con 5 o menos ramas afectadas.
6	De 21 a 30 % de la superficie de la hoja con infección y con 6 o más ramas afectadas.
7	De 31 a 49 % de la superficie de la hoja con infección y con 5 o menos ramas afectadas.
8	De 31 a 49 % de la superficie de la hoja con infección y con 6 o más ramas afectadas.
9	De 50 % o más de la superficie de la hoja con infección y con 5 o menos ramas afectadas.
10	De 50 % o más de la superficie de la hoja con infección y con 6 o más ramas afectadas.

Fuente: Jasso (1988).

Los genotipos seleccionados fueron trasplantados en el invierno a macetas de 18 L y establecidos en un invernadero con humedad relativa de 43 a 100 % y temperaturas entre 19 y 21 °C. La evaluación en invernadero se realizó en noviembre y diciembre de 1999. Las plantas fueron inoculadas con 8000 conidios/mL de suspensión en agua destilada (15 de noviembre). El conteo de los conidios se realizó en un hematocitómetro Neubauer (American Optical).

Las variables medidas fueron:

1) Incidencia de cenicilla, mediante la escala propuesta por Jasso (1988), cuando los genotipos aún se encontraban a la intemperie (agosto 1998).

2) Periodo de latencia de la infección: tiempo entre la inoculación y los primeros síntomas visibles de la enfermedad. Se realizaron observaciones diarias con una lupa en tres ramas de cada árbol, hasta que aparecieron los conidióforos y conidios en la hoja.

3) Infección final, considerada como la magnitud de la severidad de la enfermedad a los 21 días después de inoculación; esta variable se usó para determinar el grado de susceptibilidad a la enfermedad.

4) Contenido de fenoles totales en seis muestreos: 2 h antes de inoculación (15 de noviembre) y 24 (16 de

noviembre), 72 (18 de noviembre), 144 (21 de noviembre), 336 (29 de noviembre) y 504 horas después de la inoculación (6 de diciembre). Se colectaron las 15 primeras hojas con láminas completamente expandidas en ramas de la parte externa y se almacenaron a  $-28^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las muestras se secaron a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 72 h y se molieron.

La extracción de fenoles se hizo partiendo de 1 g al que se agregó 5 mL de metanol 50 % durante 1 h, en un agitador orbital; finalmente, las muestras se filtraron.

La metodología para determinar fenoles fue la de Folin-Ciocalteu, modificada por Waterman y Mole (1994) en la siguiente rutina: se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de metanol 50 % + 7.5 mL de agua destilada + 0.5 mL de la solución Folin-Ciocalteu. Después de 1 a 8 minutos se adicionó 1.5 mL de la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 % (anotando como tiempo cero), y se aforó a 10 mL con agua destilada. La solución se dejó reposar por 2 horas y se tomó la lectura a 760 nm en el espectrofotómetro. La cuantificación se realizó estableciendo una curva estándar de ácido tánico, de acuerdo con lo descrito por la AOAC (1995), la cual mostró un ajuste con una  $r^2=0.993$ . La ecuación obtenida con la regresión fue:

$$Y = 0.2701 + 0.698 (X)$$

Donde:

Y = absorbancia

X = concentración de fenoles

5) La actividad enzimática se midió en nueve fechas al final del otoño: 2 h antes de la inoculación (15 de noviembre) y 2 (15 de noviembre), 4 (15 de noviembre), 24 (16 de noviembre), 48 (17 de noviembre), 96 (19 de noviembre), 144 (21 de noviembre), 336 (29 de noviembre) y 504 horas después de la inoculación (6 de diciembre). La forma de muestrear fue la misma empleada para fenoles totales, sólo que las muestras fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesadas. Las muestras fueron molidas en acetona fría y llevadas a sequedad en una bomba de vacío; posteriormente se pasaron a un mortero donde se molieron con nitrógeno líquido formando un polvo fino y se conservaron en refrigeración ( $5^{\circ}\text{C}$ ) hasta cuantificar la actividad enzimática.

La actividad de la FAL se determinó según la metodología descrita por Martínez-Téllez y La Fuente (1997). En 15 mL de amortiguador borato sódico (0.1 M, pH 8.8) se colocaron 0.4 g del polvo del tejido macerado en acetona agitando en baño frío (0 a  $2^{\circ}\text{C}$ ) por 20 minutos. Poste-

riormente se centrifugó durante 20 minutos a 20 000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ .

A 7 mL del extracto se adicionó 1.89 g de sulfato de amonio y se centrifugó nuevamente. Al precipitado se le agregó 4.5 mL del tampón de acetato de amonio 0.1 M, pH 7.7. La actividad enzimática se midió en 2 mL del extracto + 3.4 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.6 mL de L-fenilalanina, haciendo una primera medición en el espectrofotómetro a 290 nm y después de incubar por 2 h a  $40^{\circ}\text{C}$  se realizó una segunda medición. Los resultados se expresan como  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de p. s.

La PFO se determinó por el método descrito por Martínez-Téllez y La Fuente (1997). En 7.5 mL de amortiguador fosfato potásico 0.05 M, pH 7.2, se colocaron 0.1 g del polvo de acetona, manteniéndolo entre 0 y  $2^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Después se centrifugó a 20 000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. La actividad enzimática se determinó con ácido caféico midiendo la absorbancia a 420 nm dos veces, a tiempo cero y 90 segundos después. Los resultados se expresan en unidades de PFO  $\text{minuto}^{-1} \text{g}^{-1}$  de p.s.

Se usó un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones por planta en cada fecha de muestreo y dos plantas como unidad experimental. Se realizó análisis de varianza para el contenido de fenoles totales, FAL y PFO, así como correlación del grado de susceptibilidad a la cenicilla con las variables fenoles totales, FAL y PFO. Los datos se procesaron mediante el sistema de análisis estadísticos (SAS), para detectar diferencias entre tratamientos y se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los meses de julio, agosto y septiembre de 1998 las condiciones ambientales prevalecientes fueron propicias para el desarrollo de la enfermedad, con una temperatura máxima de  $29^{\circ}\text{C}$ , mínima  $9^{\circ}\text{C}$ , H. R. de 70 % y precipitación de 121 mm.

El tiempo de aparición de los conidióforos y conidios (periodo de latencia) de cenicilla sobre las hojas de durazno, difirió según el grado de susceptibilidad; conforme éste disminuye, el periodo latente aumenta (Cuadro 2). Según Nelson (1973) las plantas que resisten a la colonización y reproducción de un patógeno, interfirieron con varias fases de la patogénesis, de manera que incrementan el tiempo requerido desde la etapa inicial de infección hasta la producción de inóculo. El grado de susceptibilidad mostrado por las selecciones en invernadero fue similar al que se observó en condiciones de campo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Grado de susceptibilidad a la cenicilla en diferentes materiales de durazno observado en campo, periodo latente e infección final observados en invernadero.

Selección	<sup>1</sup> Susceptibilidad en campo (s)	Periodo latente (días)	Infección final en invernadero		
			No. de ramas infectadas	Hoja infectada (%)	<sup>1</sup> Nivel de susceptibilidad
CP-M1	<sup>2</sup> 10	5	12 - 16	50 - 60	10
CP-M2	7	6	20 - 30	10 - 20	6
CP-M3	2	10	5 - 10	10 - 20	4
88-22C X 88-11N(F <sub>2</sub> )	2	12	5 - 10	5 - 10	2
86-28C X 88-11N(F <sub>2</sub> )	0	<sup>3</sup> SE	0	0	0
Tropic Snow X 88-11N(F <sub>2</sub> )	0	<sup>3</sup> SE	0	0	0

<sup>1</sup> Según escala de Jasso (1988); <sup>2</sup> n=2; <sup>3</sup>SE = Sin enfermedad.

**Fenoles totales.** A las 24 h después de la inoculación la concentración promedio de fenoles se incrementó 34 %, en los genotipos evaluados (Cuadro 3). La mayor concentración de fenoles después de la inoculación se observó en los materiales que toleran al hongo con índice de susceptibilidad bajo (is=2) '88-22C X 88-11N(F<sub>2</sub>)' y 'CP-M3', esto se dio a las 24 h después de la inoculación y tendieron a mantener un nivel alto de fenoles en las fechas de muestreo subsecuentes, excepto a las 336 h después de la inoculación, cuando el genotipo CP-M1 (is=10) también resultó alto en fenoles.

Cuadro 3. Concentración de fenoles totales (mg g<sup>-1</sup> de p.s.) en selecciones de durazno con diferente grado de susceptibilidad a la cenicilla.

Selección	<sup>1</sup> is	Tiempo después de la inoculación (h)					
		-2	24	72	144	336	504
CP-M1	10	9.3 ab	9.8 d	13.2 a	13.9 b	17.1 a	11.3 b
CP-M2	7	7.9 ab	7.1 e	11.8 b	14.1 ab	11.7 c	13.1 a
CP-M3	2	6.7 b	16.1 a	13.6 a	15.6 ab	17.2 a	5.4 c
88-22C X 88-11N(F <sub>2</sub> )	2	10.4 a	15.8 a	11.9 b	16.0 a	14.3 b	12.7 a
86-28C X 88-11N(F <sub>2</sub> )	0	7.1 b	10.8c	9.0 c	9.0 c	7.3 d	5.7 c
Tropic snow X 88-11N(F <sub>2</sub> )	0	6.4 b	13.5 b	8.4 c	9.2 c	13.0 bc	10.9 b

<sup>1</sup> Índice de susceptibilidad. Medias con letras diferentes tienen diferencias significativas (Tukey, 0.05).

En contraste, los genotipos que impiden el establecimiento del patógeno '86-28C X 88-11N(F<sub>2</sub>)' y 'Tropic Snow X 88-11N(F<sub>2</sub>)', ambos con is=0, presentaron la menor concentración de fenoles en la mayoría de los muestreos; este resultado difiere con lo reportado por Kozłowska y Krzywanski (1994), quienes observaron que la resistencia de frambuesa (*Rubus idaeus*) al ataque de *Didymella applanata* (Niessl) Sacc, se asocia con la lignificación y la acumulación de compuestos fenólicos. La acumulación de fenoles representa una primera barrera química a la enfermedad, que se complementa con la producción de *o*-difenoles, quinonas fungitóxicas y ácido siríngico. La lignificación de la pared celular durante el mecanismo de de-

fensa, evita la digestión de ésta por el patógeno (Brisson *et al.*, citados por Greenberg, 1997). Por otro lado, Wisniewski *et al.* (1984) observaron que la presencia de *Cytospora leucostoma* en el tejido de durazno provoca como respuesta al daño, incremento de los compuestos fenólicos en el hospedero y que los niveles de fenoles en el tejido hospedero se incrementan según el avance del hongo, mecanismo que permite a la planta detener el avance del patógeno. Esta respuesta difiere de los resultados obtenidos en la presente investigación.

También en contraste con lo reportado en la literatura, se observó que 2 h antes de la inoculación existe mayor concentración de fenoles totales en los materiales con mayor susceptibilidad a la cenicilla (is=10 e is=7). Dos horas después de la inoculación, el coeficiente de correlación (*r*) entre el grado de susceptibilidad a la cenicilla y la concentración de fenoles fue de 0.4114, significativo a 0.01. Sin embargo, a las 24 h después de haber inoculado, la relación cambió drásticamente, al observarse un *r* = -0.6059, con significancia de 0.01; en esta fecha de muestreo destacan por su alto contenido de fenoles los genotipos con susceptibilidad de dos y cero (es decir, resistentes).

La relación observada entre el grado de susceptibilidad a la cenicilla y la concentración de fenoles totales, se mostró inconsistente, ya que el coeficiente de correlación a las 72 h después de la inoculación fue de 0.6121, que fue significativo a 0.01, lo que indica que los materiales genéticos con mayor grado de susceptibilidad nuevamente mostraron mayor concentración de fenoles totales. Esta situación se mantuvo a las 144, 336 y 504 h después de la inoculación.

**Polifenoloxidasas (PFO).** Antes de inocular todos los materiales presentaban escasa actividad de la PFO (Figura 1). Tal actividad se incrementó significativamente a las 2 h después de la inoculación. Sobresalen los genotipos que impiden el establecimiento del patógeno (is=0), porque muestran actividad creciente durante las primeras 24 h después de inoculación, para después disminuir. Ello sugiere que en las primeras 24 h se desencadenan los mecanismos de defensa, ya que las actividades de la PFO y peroxidases dan como resultado la formación de quinonas que reducen la proteína digestible por el parásito (Tomczyk y Nielsen, 1994).

El incremento de la actividad de la PFO después de la inoculación, en los materiales resistentes, implica una posible oxidación de fenoles. La reacción redox de los fenoles incluye la formación de radicales fenoxi, radicales semiquinonas y *o*-quinonas o *p*-quinonas, bajo ciertas condiciones de estrés, donde el control metabólico es crítico después del daño o infección. En estos casos, las

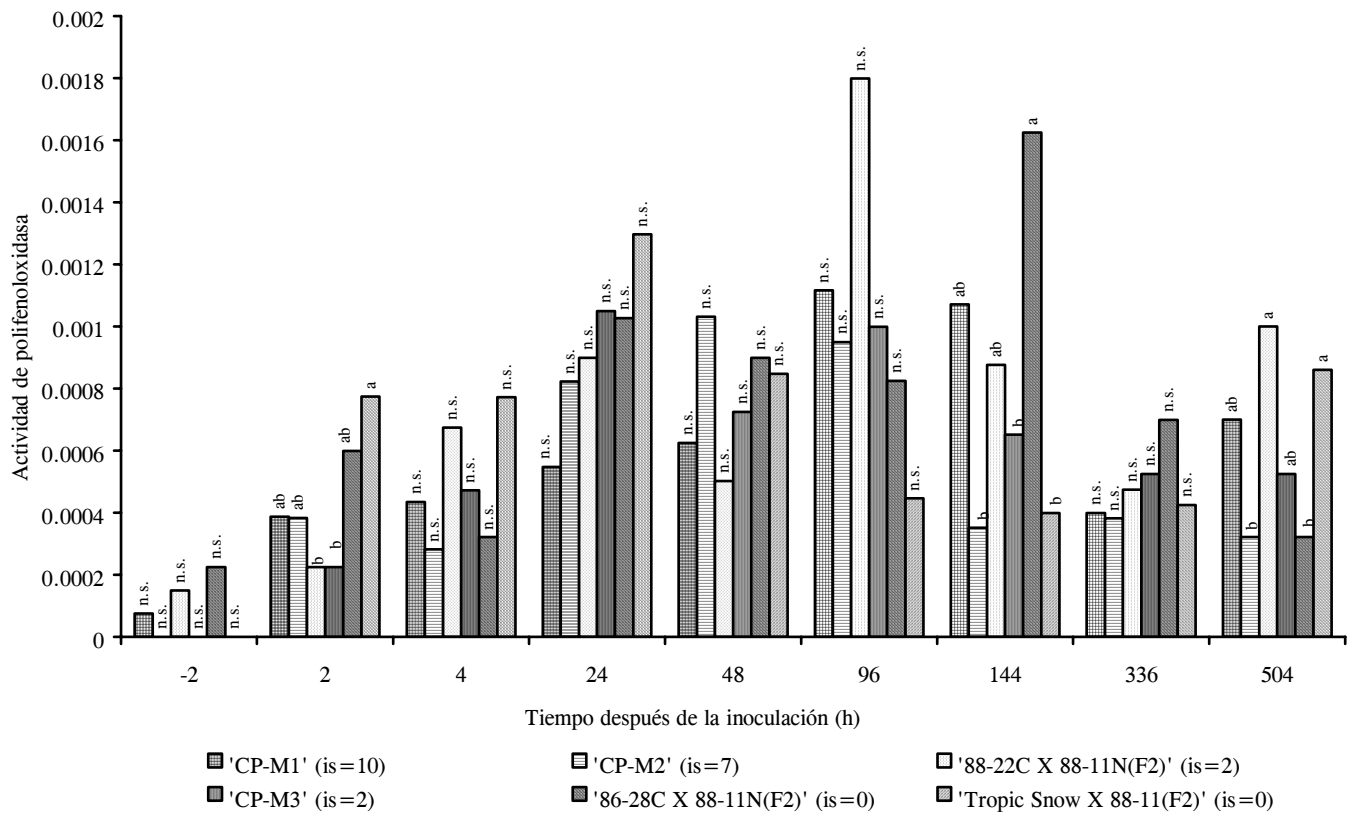


Figura 1. Actividad de la polifenoloxidasas (unidades de PFO  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de p.s.) en selecciones de durazno con diferente grado de susceptibilidad a la cenicienta. Medias con letras diferentes en un muestreo tienen diferencias significativas (Tukey, 0.05); n.s. = no significativo.

moléculas antioxidantes de bajo peso molecular son de importancia porque pueden servir como acarreadores de electrones en reacciones redox (*o*-difenoles a *o*-quinonas), como radicales libres (fenoles a radicales fenoxi) o como constituyentes de metales de transición (ácidos fenólicos, flavonoides u otros) contrarrestando al agente causal (Elstner *et al.*, 1994).

Dos horas después de la inoculación se observó un coeficiente de correlación de -0.311, significativa a 0.008, entre el grado de susceptibilidad a la cenicienta y la actividad de la PFO; las variedades con mayor susceptibilidad mostraron menor actividad de la PFO. Esta relación se mantiene hasta las 24 h después de la inoculación ( $r = -0.6479$ , con 0.01 de significancia), Y se mantiene una alta actividad de la PFO en los materiales con menor susceptibilidad a la cenicienta. A las 48 h después de la inoculación la relación sigue siendo negativa, pero es bastante baja. Después de este muestreo únicamente se vuelven a correlacionar ambas variables a las 336 h después de la inoculación ( $r = -0.4028$ , 0.009 de significancia).

**Fenilalanina amonio-licasa (FAL).** Desde la inoculación hasta 2 h después se observó baja actividad de FAL (Figura 2) en todos los genotipos evaluados. Incrementos

significativos en esta actividad se detectaron desde las 4 a las 24 h después de la inoculación en materiales resistentes ( $is=0$ ), '86-28C X 88-11N(F2)' y 'Tropics snow X 88-11N(F2)', los cuales mantienen la actividad alta hasta 96 h después de la inoculación. El incremento en FAL a menudo ha sido considerado como indicador de resistencia, lo que conlleva a un problema complejo, relativo a la activación de síntesis de compuestos fenólicos como evento primario en expresión de la resistencia (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Sin embargo, un incremento en la actividad de la FAL no siempre garantiza incremento en la acumulación de fitoalexinas (Ebel *et al.*, citado por Miklas *et al.*, 1993), compuestos involucrados directamente en el control natural de enfermedades.

Al respecto conviene considerar lo reportado por Nicholson y Hammerschmidt (1992), quienes establecen que la actividad de FAL, como indicador temprano de la iniciación de la síntesis de fenoles en respuesta a la infección, puede ser un indicador engañoso, ya que un incremento detectable en la actividad de FAL no siempre es la primera respuesta a la infección. Sin embargo, algunos reportes han demostrado carencia de correlación entre la FAL y la expresión de resistencia. En esta investigación sí se relacionó la mayor actividad de FAL con el menor grado

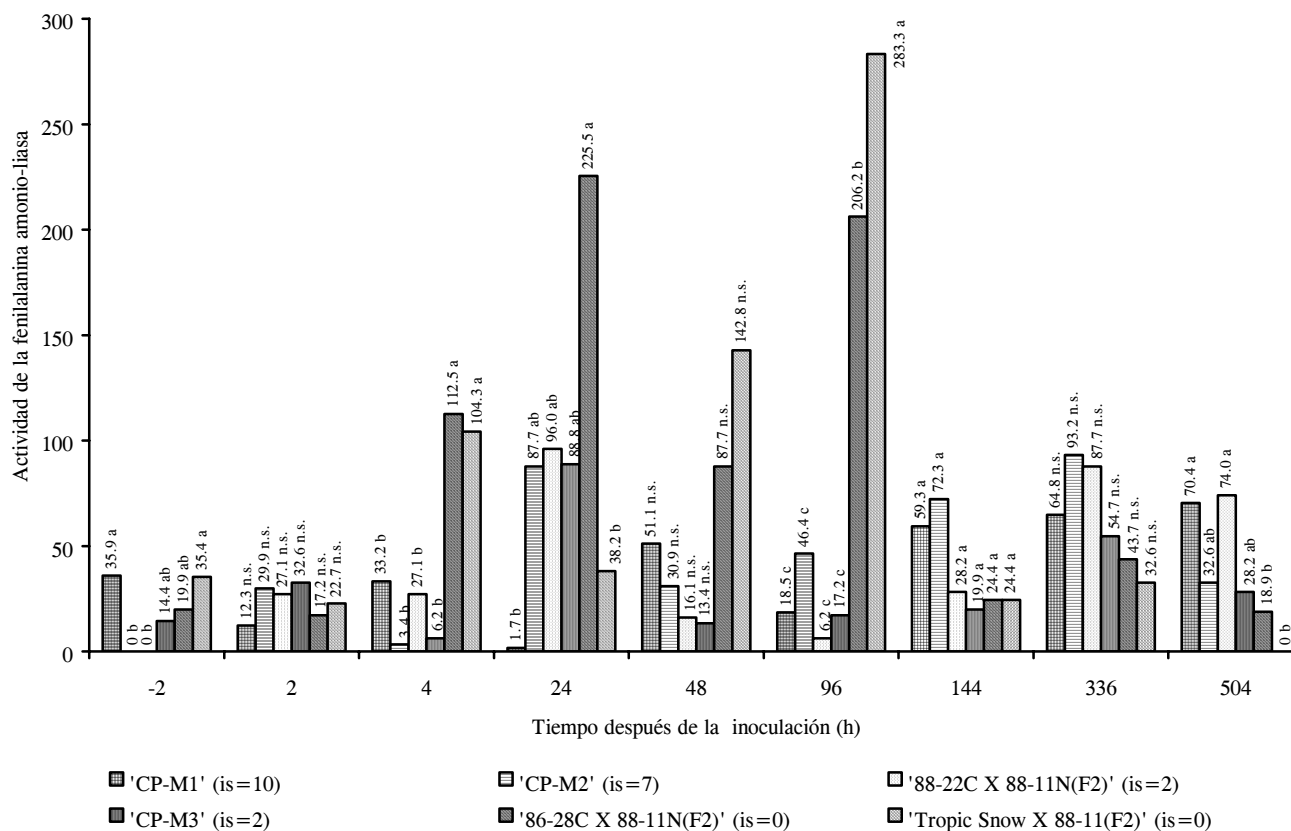


Figura 2. Actividad de la fenilalanina amonio-lyasa ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  de p.s.) en selecciones de durazno con diferente grado de susceptibilidad a la cenicilla. Medias con letras diferentes en un muestreo, tienen diferencias significativas (Tukey, 0.05); n.s. = no significativo

de susceptibilidad a la cenicilla; por tanto, es posible considerar la actividad de FAL como un mecanismo de defensa.

La fuerte disminución observada en la actividad de la FAL entre las 96 y 144 h después de la inoculación, tal vez ocurra en forma gradual en ese lapso de 48 h. De las 144 h en adelante, la actividad de la FAL se mantuvo reducida en todos los genotipos. Aun así, a las 504 h después de la inoculación se observó aumento de FAL en los materiales susceptibles a la enfermedad 'CP-M1' (is=10) y 'CP-M2' (is=7), lo cual pudiera implicar una reacción tardía e inefectiva del mecanismo de defensa, ya que en esa fecha tales genotipos están completamente infectados por el patógeno.

El coeficiente de correlación entre la actividad de la FAL y el grado de susceptibilidad a la cenicilla fue de -0.5464 con 0.01 de significancia a las 4 h después de la inoculación; esto indica que a menor susceptibilidad de los genotipos a la cenicilla hay mayor actividad de la FAL. La correlación negativa se mantuvo a las 24, 48 y 96 h después de la inoculación ( $r = -0.4938$ ;  $r = -0.3105$  y  $r = -0.5927$ , respectivamente). Posterior a las 144 h des-

pues de la inoculación el coeficiente de correlación fue de 0.475 con 0.01 de significancia, indicando que a mayor susceptibilidad de los genotipos a la cenicilla la actividad de la FAL es mayor, situación que se mantiene a las 336 y 504 h después de la inoculación ( $r = 0.3200$  y  $r = 0.5264$ , respectivamente).

## CONCLUSIONES

La expresión de la enfermedad en los genotipos susceptibles y resistentes, fue la misma, tanto a la intemperie como en el invernadero, lo que indica la naturaleza genética de la respuesta de defensa del duraznero al ataque de la cenicilla.

El metabolismo de los fenoles como estrategia de defensa del durazno ante el ataque de la cenicilla es una respuesta complicada. La concentración de fenoles totales, y la actividad de las enzimas fenilalanina amonio-lyasa y polifenoloxidasas se incrementaron después de la inoculación en todos los genotipos de durazno evaluados, pero sólo hasta las 24 h. En este caso destacan por su mayor actividad enzimática los genotipos con índice de susceptibilidad cero.

A las 24 h después de la inoculación se registró una correlación negativa entre el índice de susceptibilidad a cenicilla y el contenido de fenoles totales, FAL y PFO ( $r=-0.6059$ ;  $r=-0.4938$  y  $r=-0.6476$  respectivamente). Se puede inferir entonces que la participación de los fenoles, FAL y PFO en el mecanismo de defensa del duraznero ante el ataque de la cenicilla, ocurre principalmente en las primeras 24 h después de la inoculación, para evitar el establecimiento del patógeno, sobre todo en los genotipos tolerantes.

El tiempo de aparición de conidios y conidióforos (período de latencia) de cenicilla sobre hojas de duraznero, difiere según el índice de susceptibilidad; conforme éste disminuye, el periodo de latencia aumenta.

### BIBLIOGRAFÍA

- AOAC (1995) Official Methods of Analysis of AOAC International. Vol. II. Food Chemistry 34:823-826.
- Bhattacharya M K, E W B Ward (1987) Temperature-induced susceptibility of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea: phenylalanine ammonia-lyase and glyceollin in the host; growth and glyceollin I sensitivity of the pathogen. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 31:407-419.
- Elstner E F, W Obwald, R Volpert, H Schempp (1994) Phenolic antioxidants. *Acta Hort.* 381:304-339.
- Gradziel T M, M A Thorpe, R M Bostock, S Wilcox (1998) Breeding for brow rot (*Monilinia fructicola*) resistance in clingstone peach with emphasis on the role of fruit phenolics. *Acta Hort.* 465:161-169.
- Greenberg J T (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 48:525-545.
- Guedes M E, L E Guerra-Guimaraes, A M S Silva, J A S Cavaleiro (1994) Total phenols and phytoalexins accumulation in coffee leaves infected with *Hemileia vastatrix* Berk et Br. and *Pseudomonas syringae*. *Acta Hort.* 381:561-564.
- Hachiro O (1994) Plant Pathogenesis and Disease Control. Ed. CRC Press. USA. 193 p.
- Harborne J B (1997) Recent advances in chemical ecology. *Natural Products Reports* 14:83-98.
- Heller W (1994) Topics in the biosynthesis of plant phenols. *Acta Hort.* 381:46-73.
- Jasso A J (1988) Mejoramiento genético del durazno para resistencia al ataque de la cenicilla *Sphaerotheca pannosa* (Wallr.) Lev. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Centro de Fruticultura. Montecillo, Méx. 68 p.
- Keil H L, R A Wilson (1961) Powdery mildew on peach. *Plant Disease Reporter* 45:10-11.
- Kozłowska M, Z Krzywanski (1994) The possible role of phenolic compounds in red raspberry resistance to *Didymella applanata* (Nisessl) Sacc. *Acta Hort.* 381:671-674.
- Mansfield J W, (1983) Antimicrobial compounds. In: J. A. Callow (ed.). *Biochemical Plant Pathology*. Ed. John Wiley & Sons. Hampshire, U.K. pp: 237-265.
- Martínez-Téllez M A, M A la Fuente (1997) Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled 'Fortune' mandarin fruit. *J. Plant Physiol.* 150:674-678.
- Mayer A M, E Harel (1979) Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18:193-215.
- Métraux J P, I Raskin (1993) Role of phenolics in plant disease resistance. In: I. Chet (ed.). *Biotechnology in plant disease control*. Ed. Wiley-Liss. USA. pp: 191-209.
- Miklas P N, K F Grafton, P E McClean (1993) Estimating phenylalanine ammonia-lyase activity in common beans inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum*. *HortScience* 28:937-938.
- Nelson R R (1973) The meaning of disease resistance in plants. In: R. R. Nelson (ed.). *Breeding Plants For Disease Resistance Concepts and Applications*. The Pennsylvania State University Press. USA. pp: 13-25.
- Nicholson R L, R Hammerschmidt (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopath.* 30:369-389.
- Ogawa J M, H English (1991) Disease of Temperate Zone Tree Fruit and Nut Crops. Okland, California, U.S.A. 461 p.
- Pérez-González S (1997) Breeding peaches for powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*) resistance in the subtropical regions of central Mexico. *Acta Hort.* 441:87-92.
- Roco A, P Castañeda, L M Pérez (1993) Oligosaccharides released by pectinase treatment of *Citrus lemon* seedlings are elicitors of the response. *Biochemistry* 33:1301-1306.
- Tomczyk A, D G Nielsen (1994) Changes in birch leaf total phenol content and the activity of phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase associated with gypsy moth feeding. *Acta Hort.* 381:544-547.
- Waterman P G, S Mole (1994) Analysis of Phenolic Plant Metabolites. 1<sup>st</sup> ed. Osney Mead, Oxford, England. 238 p.
- Wisniewski M, A L Bogle, W C Shortle, C L Wilson (1984) Interaction between *Cytospora leucostoma* and host-phenolic compounds in dormant peach trees. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109:563-566.