



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**ACTIVADORES DE DEFENSA CONTRA *Phytophthora cinnamomi* (Rands) EN AGUACATE (*Persea americana* (Mill))**

**EDWIN OLIVIO ESCOBAR LÓPEZ**

**TESIS  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2015**

La presente tesis titulada: **ACTIVADORES DE DEFENSA CONTRA *Phytophthora cinnamomi* (Rands) EN AGUACATE (*Persea americana* (Mill))**. Realizada por el alumno: **Edwin Olivio Escobar López**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**



**Consejero: Dr. Daniel Téliz Ortiz**



**Asesor: Dr. José Antonio Mora Aguilera**



**Asesor: Dr. Dionicio Alvarado Rosales**



**Asesor: Dr. Santos Gerardo Leyva Mir**

## **AGRADECIMIENTOS**

A los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

Al Colegio de Postgraduados (CP) y a su personal docente por formar parte importante en mi formación fitopatológica.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz por su amistad, apoyo, enseñanza y confianza depositada en mí para el cumplimiento de este trabajo de investigación. Gracias por sus consejos académicos y personales la cual contribuyeron a la mejora constante en mi persona.

A los integrantes de mi consejo particular por el esfuerzo, el tiempo y el apoyo brindado para la culminación de esta meta. A los Doctores José Antonio Mora, Dionicio Alvarado y Gerardo Leyva por sus acertados consejos y contribuciones al desarrollo de este trabajo.

Al Ing. Francisco Marroquín por compartir su valiosa experiencia en campo la cual enriqueció el planteamiento de este trabajo.

A los Doctores, Carlos de León, Cristian Nava, Nicasio Cruz Huerta, Hector González por haberme transmitido un poco de su conocimiento y apoyo.

A todos, que de una u otra forma, contribuyeron para que esto fuera posible.

## DEDICATORIAS

A **DIOS**, por sus bendiciones.

A mis padres “**Olivio Escobar y Reina López**”, por su apoyo constante y amor, con los cuales he podido salir adelante y ser mejor persona (mis pensamientos en ellos, en todo momento).

A mis hermanos, “**Leodán, Daira, Darwin y Roni**”, por su humilde apoyo y amor.

A tía “**Antonia (Tonita)**” por ser un ejemplo de generosidad, humildad y sencillez.

A mis primos, especialmente a “**Abi**”, por sus consejos, la cual repercutieron de manera positiva en mi desarrollo profesional.

A mis sobrinos, **Balo, Yuni, Miros, Geni, Jael, Jos, Yobani, Davisito, Toño y José**.

A **Erika**, por su amor y apoyo constante.

A la familia **Zamora Macorra**

A mis amigos, **Felipe, Leyver, Jaimito, Salvador, Arturo (pini), José Juan, Moguel, Gerardo (“Jalisco”), Juan, Wini, Mariano, Chacón, Brenda, Adriana, Abraham, Amado, Hugo y Laurita Chi**; Gracias por su amistad.

“**GRACIAS A TOD@S**”

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIAS .....	i
LISTA DE CUADROS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT .....	vii
1.- INTRODUCCIÓN .....	1
2.- HIPÓTESIS.....	3
3.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1 Defensa de las plantas contra patógenos .....	4
3.1.1 Defensas preformadas .....	4
3.1.2 Defensas inducidas .....	4
3.2 Resistencia sistémica adquirida e inducida .....	10
3.3 Moléculas de señalización.....	11
3.3.1 Señalización vía ácido salicílico (AS).....	12
3.3.2 Señalización vía ácido jasmónico (JA).....	13
3.3.3 Interacción entre la rutas del SA y JA .....	13
3.4 Moléculas inductoras de defensa.....	14
3.4.1 Acibenzolar-S-metil (ASM) .....	15
3.4.2 Proteína de harpin (Messenger®).....	15
3.4.3 Fosetil-Al (Aliette®) .....	16
3.5 <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	17
3.5.1 Importancia.....	17
3.5.2 Taxonomía.....	18
3.5.3 Síntomas .....	19
3.5.4 Hospederos .....	20
3.5.5 Ciclo de la enfermedad.....	20
3.5.6 Factores que influyen en la biología y patogenicidad de <i>P. cinnamomi</i> .....	21
3.5.7 Manejo de la enfermedad en México .....	22

4.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
4.1 Aislamiento de raíz.....	24
4.2 Diseño experimental.....	24
4.3 Medición de fotosíntesis neta como parámetro del progreso de la enfermedad.....	25
4.4 Muestreo.....	26
4.5 Polvo vegetal (“polvos de acetona”) .....	26
4.6 Curva de ácido gálico .....	26
4.7 Determinación de enzimas y metabolitos secundarios .....	27
4.7.1 Fenoles totales (FEN).....	27
4.7.2 Peroxidasa (POX).....	27
4.7.3 Evaluación efectividad biológica <i>in vitro</i> .....	30
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
5.1 Identificación.....	31
5.2 Progreso de la enfermedad (síntomas) .....	32
5.3 Polvo vegetal (“polvos de acetona”) .....	33
5.4 Curva de ácido gálico .....	33
5.5 Progreso de la enfermedad medido por la fotosintética neta.....	33
5.6 Fenoles totales (FEN).....	37
5.7 Peroxidasa (POX).....	42
5.8 Evaluación efectividad biológica .....	46
5.9.- Consideraciones .....	49
6.- CONCLUSIONES .....	50
7.- LITERATURA CITADA .....	51

## LISTA DE CUADROS

<b>CUADRO 1.-</b> CLASIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PR EN DIFERENTES PLANTAS (VAN LOON ET AL., 2006).	6
<b>CUADRO 2.-</b> RELACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS NETA CON LA INOCULACIÓN INICIAL DE PHYTOPHTHORA CINNAMOMI; Y LA APLICACIÓN DE ACTIVADORES DE DEFENSA DE LA PLANTA Y LA INOCULACIÓN, SIETE DÍAS DESPUÉS, CON P. CINNAMOMI EN PLANTAS DE AGUACATE CV “HASS” A LOS 0, 7, 14 Y 21 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.	36
<b>CUADRO 3.-</b> COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES ANALIZADA EN HOJAS DE AGUACATE CV “HASS” COMO RESPUESTA DE PROTECCIÓN CON ACTIVADORES DE DEFENSA A LOS 0, 7, 14 Y 21 DÍAS DE LA INDUCCIÓN CON LOS ACTIVADORES DE RESISTENCIA.	41
<b>CUADRO 4.-</b> COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA, DETERMINADA EN HOJAS DE AGUACATE CV HASS A LOS 0, 7, 14 Y 21 DÍAS DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN CON LOS ACTIVADORES DE RESISTENCIA.	45
<b>CUADRO 5.-</b> COMPARACIÓN DE MEDIAS DEL CRECIMIENTO DE P. CINNAMOMI EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS A LOS 7 DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN.	47

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.-</b> COMPARACIÓN ENTRE SAR E ISR (TOMADO DE VALLAD Y GOODMAN, 2004)	11
<b>FIGURA 2.-</b> A) ÁRBOL INFECTADO CON P. CINNAMOMI, B) PROLIFERACIÓN DE FRUTOS DE BAJO VIGOR, C) BROTES CARENTES DE VIGOR.	19
<b>FIGURA 3.-</b> CICLO DE VIDA DE PHYTOPHTHORA CINNAMOMI DE ACUERDO CON HARDHAM (2005)	21
<b>FIGURA 4.-</b> A) SISTEMA PORTÁTIL DE FOTOSÍNTESIS LI-6400® (LICOR, INC.; LINCOLN. NE, USA), B) MEDICIÓN DE FOTOSÍNTESIS NETA COMO PARÁMETRO DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD.	25
<b>FIGURA 5.-</b> DIAGRAMA DEL PROCESO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES PRESENTE EN HOJAS DE AGUACATE “HASS”	28
<b>FIGURA 6.-</b> DIAGRAMA DEL PROCESO PARA LA DETERMINACIÓN DE PEROXIDASAS PRESENTES EN HOJAS DE AGUACATE “HASS”.	29
<b>FIGURA 7.-</b> A) RAÍZ DE PLANTA DE AGUACATE CV HASS CON SÍNTOMAS DE P. CINNAMOMI, B) CRECIMIENTO CAMELIOIDE DE P. CINNAMOMI EN MEDIO DE CULTIVO PDA, C) MICELIO TORULOSO DE P. CINNAMOMI (A 40X), D) CÉLULAS HINCHADAS DE P. CINNAMOMI (A 40X).	31
<b>FIGURA 8.-</b> A) PLÁNTULA SIN HONGO NI ACTIVADORES, B) PLÁNTULA INOCULADA CON P. CINNAMOMI (TESTIGO ABSOLUTO), C) PLÁNTULA ASPERJADA CON ACTIVADORES EN MEZCLA E INOCULADA CON P. CINNAMOMI, D) PLÁNTULA ASPERJADA CON ASM E INOCULADA CON P. CINNAMOMI EN EL DÍA 21.	32
<b>FIGURA 9.-</b> FOTOSÍNTESIS NETA Y SU RELACIÓN CON LOS TRATAMIENTOS 1) PC: P. CINNAMOMI (TESTIGO POSITIVO SIN ACTIVADORES); 2) A+PC: ACTIVADORES EN MEZCLA Y P. CINNAMOMI; 3) ASM+PC: ACIBENSOLAR-S-METIL + P. CINNAMOMI; 4) TEST: TESTIGO NEGATIVO (SIN P. CINNAMOMI NI ACTIVADORES). LA CONCENTRACIÓN SE EXPRESÓ EN ( $\mu\text{MOL CO}_2 \text{ M}^{-2} \text{ S}^{-1}$ )	37
<b>FIGURA 10.-</b> PRESENCIA DE FENOLES TOTALES Y SU RELACIÓN CON LOS TRATAMIENTOS 1) PC: P. CINNAMOMI (TESTIGO POSITIVO SIN ACTIVADORES); 2) A+PC: ACTIVADORES EN MEZCLA Y P. CINNAMOMI; 3) ASM+PC: ACIBENSOLAR-S-METIL + P. CINNAMOMI; 4) TEST: TESTIGO NEGATIVO (SIN P. CINNAMOMI NI ACTIVADORES). LA CONCENTRACIÓN SE EXPRESÓ EN MG FENOLES TOTALES -1 PESO FRESCO DE TEJIDO.	41
<b>FIGURA 11.-</b> PRESENCIA DE PEROXIDASAS Y SU RELACIÓN CON LOS TRATAMIENTOS 1) PC: P. CINNAMOMI (TESTIGO POSITIVO SIN ACTIVADORES); 2) A+PC: ACTIVADORES EN MEZCLA Y P. CINNAMOMI; 3) ASM+PC: ACIBENSOLAR-S-METIL + P. CINNAMOMI; 4) TEST: TESTIGO NEGATIVO (SIN P. CINNAMOMI NI ACTIVADORES). LA EXPRESIÓN ENZIMÁTICA SE CUANTIFICÓ COMO U.G DE PESO FRESCO (U ES LA UNIDAD DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y UNA UNIDAD ES IGUAL A LA FORMACIÓN DE 1 MMOL MIN <sup>-1</sup> DE TETRAGUAYACOL).	45
<b>FIGURA 12.-</b> ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE MESSENGER (PROTEÍNA DE HARPIN), ACTIGAR (ACIBENSOLAR-S METIL), ALIETTE (FOSEYL-AL) Y GARBUS (2-(TIOCIANOMETILTIO) BENZOTIAZOL) SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE P. CINNAMOMI A 1, 10 Y 100 PPM. LOS TRATAMIENTOS FUERON: 1) ASM1 (1 PPM), 2) ASM10 (10 PPM), 3) ASM100 (100 PPM), 4) MES1 (1 PPM), 5) MES10 (10 PPM), 6) MES100 (100 PPM), 7) FOS1 (1PPM), 8) FOS10 (10 PPM), 9) FOS100 (100 PPM), 10) GAR1 (1PPM), 11) GAR10 (10 PPM), 12) GAR100 (100 PPM) Y TEST (TESTIGO ABSOLUTO, P. CINNAMOMI EN PDA). EL CRECIMIENTO DE P. CINNAMOMI SE TRANSFORMÓ DE CM A LOGARITMO NATURAL ZMEDIAS CON DISTINTA LETRA EN UNA MISMA COLUMNA SON ESTADÍSTICAMENTE DIFERENTES (TUKEY, $P \leq 0.05$ ).	48



**ACTIVADORES DE DEFENSA CONTRA *Phytophthora cinnamomi* (Rands) EN  
AGUACATE (*Persea americana* (Mill))**

**Edwin Olivio Escobar López, M.C.**

**Colegio de Postgraduados, 2015**

**RESUMEN**

El efecto del acibensolar-S-metil (ASM) por separado y en mezcla con fosetil aluminio y proteína de harpin se evaluó en la inducción de fenoles y peroxidasas como activadores de resistencia contra *Phytophthora cinnamomi* (*Pc*), en plántulas de aguacate “Hass” causante de la pudrición de raíces y tristeza del aguacate. La inoculación de *Pc* se realizó siete días después de la inducción con los activadores de resistencia. El progreso de la enfermedad se evaluó midiendo la fotosíntesis neta (FN) a los 0, 7, 14 y 21 días post-inducción. Las plántulas inoculadas con *Pc* y sin activadores se marchitaron a los 21 días después de la inoculación y su FN disminuyó significativamente; mientras que las plántulas protegidas con la mezcla de activadores no se marchitaron y tuvieron la mayor FN a los 21 días después de la inducción. La mezcla de activadores protegió a las plántulas al incrementar significativamente la concentración fenólica a los 21 días de la inducción, por lo contrario, en las plántulas inoculadas con *Pc* y sin activadores la concentración de fenoles disminuyó significativamente a los 21 días de la inoculación. La actividad de peroxidasas al día 21 fue similar en las plántulas inoculadas con *Pc* (sin activadores) y en las plántulas sin “hongo” y sin activadores (testigo absoluto). Las plántulas con *P. c.* y con la mezcla de activadores finalizaron con la máxima actividad de peroxidasas y la mayor FN a los 21 días. El efecto individual del ASM estimuló la actividad de las peroxidasas, ya que su concentración fue similar a las plántulas tratadas con la mezcla de activadores. Las plántulas tratadas con la mezcla de inductores tuvieron la máxima concentración de fenoles, peroxidasas y FN como respuesta de resistencia a la infección por *Pc*. Los activadores no tuvieron actividad antifúngica in vitro.

**PALABRAS CLAVES:** Acibensolar-S-metil, fenoles, fosetil-Aluminio, peroxidasas, proteína de harpin, fotosíntesis neta.

# **TRIGGERS DEFENSE AGAINST *Phytophthora cinnamomi* (Rands) IN AVOCADO**

**(*Persea americana* (Mill))**

**Edwin Olivio Escobar López, M.C.**

**Colegio de Postgraduados, 2015**

## **ABSTRACT**

The effect of acibensolar-S-metil (ASM) alone and mixed with phosetyl-Al and Harpin protein inducing phenols and peroxidases as resistant response to *Phytophthora cinnamomi* (*Pc*) root rot was evaluated in Hass avocado seedlings. *Pc* was inoculated seven days after induction with the resistant activators. Root rot progress was related with net photosynthesis (NP) at 0, 7, 14 and 21 days after induction. Seedlings inoculated with *Pc* and without activators wilted 21 days after inoculation and their NP was significantly reduced. Seedlings treated with the activators mix did not wilt and showed the highest NP, and their phenolic concentration significantly increased 21 days after induction. Phenolic concentration significantly decreased in seedlings with no activators 21 days after inoculation. Peroxidases activity was similar, 21 days after inoculation, in inoculated and non inoculated seedlings with no activators. Seedlings with the activator mix ended with the highest NP and peroxidases activity 21 days after their inoculation. Peroxidases activity was similar in seedlings treated with the mix and those with ASM alone. Seedlings treated with the inducers mix showed the highest NP, phenols concentration and peroxidases activity as a resistant response to *Pc* infection. *In vitro* assays did not show antifungal activity by resistance inducers.

**KEY WORDS:** Acibensolar-S-methyl, phenols, phosetyl aluminium, Harpin protein, peroxidases, net photosynthesis

## 1.- INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Miller) es una fruta de gran importancia económica en México, en el 2013 produjo 1,467,837.35 t con un valor de \$18,060,177 (SIAP, 2013). Los principales estados productores son Michoacán, Estado de México, Morelos, Nayarit y Jalisco. En Michoacán el volumen de la producción en 2011 fue de 1, 092,344 t (APEAM, 2013). La tristeza causada por *Phytophthora cinnamomi* es una enfermedad importante del aguacate (Zentmyer, 1980; Téliz *et al.*, 1989; Menge y Ploetz, 2003). En México, está presente en las principales zonas productoras de Michoacán, Puebla, Morelos, Nayarit y Veracruz, con incidencias entre 5-90% (Morales 1983; Téliz y Marroquín, 2007). En Michoacán (1994) se estimaron 100 mil árboles enfermos con pérdidas calculadas en \$640 millones (Vidales, 1996).

El control químico de este patógeno es caro y daña al ambiente; esta situación evidencia la necesidad de convivir con este oomyceto con un enfoque de manejo integrado de la enfermedad y del cultivo (Téliz y Mora2007). Pocas moléculas químicas eficientes (metalaxyl y fosetil aluminio) se han registrado para esta enfermedad, además que, los residuos de plaguicidas representan una barrera no arancelaria para el comercio internacional de aguacate (APEAM, 2013).

Las síntesis de metabolitos secundarios y enzimas son alteraciones metabólicas inducidas por los patógenos en el hospedante (Cornide *et al.*, 1994). Cuando una o más de estas sustancias alcanzan una concentración suficiente inhiben el avance de la infección (Goodman *et al.*, 1986). La respuesta defensiva del aguacate contra patógenos involucra un aumento en la acumulación de fenoles (Brune y van lelyveld., 1982) y peroxidasas (vanlelyveld y Bester, 1978). Los activadores de defensa inducen la resistencia sistémica adquirida (RSA) en las plantas (Du *et al.*, 2012) contra un gran número de hongos, virus y bacterias patógenas (Ryals *et al.*, 1996; Oostendorp *et al.*, 2001; Soyly *et al.*, 2003). El acibenzolar-S-metil y el fosetil aluminio se han registrado como inductores de RSA frente a diferentes patógenos (Vo- Thi- Han *et al.*, 1979; Bompeix *et al.*, 1980; Trique *et al.*, 1981). Las plantas pueden reconocer estructuras asociadas a microorganismos llamados elisitores o PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) (Nürnberg y Brunner, 2002), tal como la proteína de harpín (Dong *et al.*, 1999) que induce RSA. Con base en lo anterior el objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto de activadores de

resistencia en mezcla (fosetil aluminio, acibensolar-S-metil y proteína de harpin) y el efecto individual del acibensolar-S-metil en la inducción de fenoles totales y peroxidasas en plantas de aguacate “Hass” infectadas con *P. cinnamomi*.

## **2.- HIPÓTESIS**

Los productos asperjados activarán fenoles totales y peroxidasas de las plantas como respuesta de resistencia a la infección de *Phytophthora cinnamomi* en aguacate “Hass”. Los inductores de resistencia abatirán el daño causado por *P. cinnamomi*.

### **3.- REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **3.1 Defensa de las plantas contra patógenos**

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa para resistir la colonización de patógenos, estos mecanismos físicos y bioquímicos se clasifican en defensas preformadas e inducibles (activas) (Durrant y Dong, 2004).

##### **3.1.1 Defensas preformadas**

Las defensas preformadas están presentes antes de la infección del patógeno y se divide en mecanismos de defensa estructurales constitutivos y mecanismos de defensa químicos constitutivos (Madriz, 2002); en el primero se encuentran las ceras cuticulares, el espesor y firmeza de las células epidermales; el tamaño, localización y forma de estomas y lenticelas cuya función es impedir la penetración de algunos patógenos (Agrios, 2013). Algunas características morfológicas de las plantas como color, forma, tipo de cutícula, ceras y velloso de tallos y hojas pueden interferir o modificar el comportamiento del patógeno (Cuartero *et al.*, 2002).

La defensa química constitutiva se desarrolla en la pared celular o en los espacios intercelulares y está representada por lignina, callosa, capas de corcho o suberina, depósitos de gomas, la cutícula, glucósidos fenólicos, fenoles, quinonas, esteroides, glicoalcaloides, terpenoides y proteínas (tioninas) (Riveros, 2001), taninos, saponinas, antocianinas, flavonoides, glucosinatos, lectinas, glucanasas y quitinasas (Kliebeinsten, 2004).

##### **3.1.2 Defensas inducidas**

Las respuestas activas que se inducen después de la infección por agentes bióticos y abióticos son: fitoalexinas, especies reactivas de oxígeno (ROS), radicales libres, iones calcio, siliconas, silicatos, polifenoloxidasas, peroxidasas, fenilalanina amoniaco liasa (PAL), glicoproteínas ricas

en glicina, callosa, lignina, lipoxigenasas, fosfolipasas, ribonucleasas, proteasas, péptidos, quitinasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) (Riveros, 2001).

### **3.1.2.1 Fitoalexinas**

Son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, con propiedades antimicrobianas y que se producen y acumulan en respuesta a la infección por patógenos (Paxton, 1981). En plantas sanas se encuentran en niveles muy bajos pero su acumulación se incrementa dramáticamente después de la infección de un patógeno. Las fitoalexinas se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes (Hammerschmidt, 1999a). Las fitoalexinas provienen de la ruta metabólica de los fenilpropanoides, terpenoides o poliacetilenos. Algunos ejemplos son resveratrol, giceolina I, pisantina, faseolina, medicarpina, risitina, falcarinol y capsidiol (Mert-Turk, 2002; García y Pérez, 2003)

### **3.1.2.2 Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)**

Las proteínas PR se producen después y durante la infección de un patógeno (van Loon *et al.*, 1994); y se acumulan después de la infección de virus, viroides, bacterias, hongos y oomicetos. Las PR son activadas por la ruta del ácido salicílico, ácido jasmónico y del etileno (Sels *et al.*, 2008). Se identificaron inicialmente en tabaco durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco. Las PR se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a las proteasas y se localizan fuera de la célula (van Loon y van Kammen 1970). Se clasifican en cinco grupos originalmente identificados para las proteínas PR de tabaco. Sin embargo, las PR se han identificado tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas, lo que ha generado una nueva clasificación de acuerdo a su actividad (van Loon y van Strien 1999). Algunas de las proteínas PR poseen actividades definidas tal como las PR-2 ( $\beta$ -1,3-glucanasas) y PR-3 (quitinasas). A la fecha se conocen 17 grupos diferentes (cuadro 1).

**Cuadro 1.-** Clasificación de proteínas PR en diferentes plantas (van Loon *et al.*, 2006).

<b>Familia</b>	<b>Miembro tipo</b>	<b>Propiedades</b>
PR-1	PR-1a Tabaco	14-17kD
PR-2	PR-2 Tabaco	Clase I, II y III endo-beta-1,3-glucanasas, 25-35kD
PR-3	P, Q Tabaco	Clase I, II, IV, V, VI y VII endoquitinasas, 30kD
PR-4	R Tabaco	Actividad endoquitinasa, antifúngica, 13-19kD
PR-5	S Tabaco	Proteína tipo taumatina, osmotina, zeamatina, permeatina, similar a inhibidores alfa-amilasa/tripsina, antifúngica
PR-6	Inhibidor I Jitomate	Inhibidores de proteasas, 6-13kD
PR-7	P69 Jitomate	Endoproteasas
PR-8	Quitinasa Pepino	Clase III quitinasas, quitinasa/lisosima
PR-9	Peroxidasa formadora de lignina	Peroxidasas, proteínas tipo peroxidasas
PR-10	PR-1 Perejil	Ribonucleasas, Proteínas-Bet v 1-relacionadas
PR-11	Clase V Quitinasa Tabaco	Endoquitinasa
PR-12	Ps-AFP3 Rábano	Defensinas
PR-13	THI2.1 Arabidopsis	Tioninas
PR-14	LTP4 Cebada	Proteínas transportadoras de lípidos no-específicas (ns-LTPs)
PR-15	OxOa Cebada	Oxalato oxidasa
PR-16	OxOLP Cebada	Proteínas tipo oxalato-oxidasa
PR-17	PRp27 Tabaco	Se desconoce

### 3.1.2.3 Genes de resistencia en aguacate

Hay tres descritos en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI); el gen *PR3* (endoquitinasa de 32 KDa) (Sowka *et al.*, 1998), el gen *R* que expresa la proteína Serín-treonín-cinasa (Di Gaspero y Cipriani 2003; Chen *et al.*, 2008), el gen *PR5* que codifica para una proteína relacionada a taumatina (Cortés *et al.*, 2009).



### 3.1.2.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las ROS's son producidas después de la exposición a altas y bajas temperaturas e intensidad de luz, contaminantes aéreos como el ozono, luz ultravioleta, herbicidas y durante la infección de patógenos o daño mecánico (Razem y Bernard, 2003). Las ROS's incluyen moléculas derivadas del oxígeno (radicales y no radicales) como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo (OH). Halliwell y colaboradores (1999) incluyen al óxido nítrico (ON), la cual es una molécula de señalización importante en animales y plantas. Las ROS's tienen una función importante en el inicio de la respuesta hipersensible (Benezer *et al.*, 2008), y funcionan como moléculas de señalización, lo que resulta en la activación de mecanismos de defensa de la planta (Apel y Hirt, 2004). También tienen actividad antimicrobiana directa al inhibir la germinación de esporas en muchos hongos patógenos (Peng y Kuc, 1992).

### 3.1.2.5 Peroxidasas (POX)

Son enzimas que catalizan la oxidación-reducción entre el peróxido de hidrógeno y agentes reductores ( $H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$ ) (Welinder, 1991). Designadas como peroxidasas clase III, son monoméricas y usualmente se encuentran glicosidadas (Luhová *et al.*, 2003; Welinder, 1992). Realizan dos líneas catalíticas: en su ciclo regulan y catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno tomando electrones de varias moléculas donantes (fenoles, precursores de lignina o metabolitos secundarios). Se ha descrito un ciclo catalítico independiente que conduce a la formación de compuestos radicales (Passardi *et al.*, 2005). Debido a ambos ciclos catalíticos, pueden generar especies reactivas de oxígeno (Mličková *et al.*, 2004), polimerizar compuestos de la pared celular y regular los niveles de peróxido de hidrógeno. Su importancia radica en una amplia gama de procesos fisiológicos tales como lignificación, suberización, metabolismo de auxinas, ensamblado de proteínas de la pared celular, tolerancia a sales, estrés oxidativo y defensa contra la infección de patógenos (Tognolli *et al.*, 2002); como hongos (Sasaki *et al.*, 2004, 2007), bacterias (Young *et al.*, 1995; Lavania *et al.*, 2006) y virus (Lagrimini y Rothstein, 1987; Diaz *et al.*, 2006). Ya que existe una correlación entre su actividad y la resistencia a

enfermedades (Johnson y Cuningham, 1972; Delannoy *et al.*, 2003; Mlíčková *et al.*, 2004; van Loon *et al.*, 2006). Después de la infección fortalece la pared celular realizando uniones cruzadas de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Bradley *et al.*, 1992). Van Lelyveld y Broderick, (1975) señalan que la infección de *P. cinnamomi* incrementó la actividad de las peroxidasas de manera sistémica en plantas que no desarrollaron síntomas de la enfermedad. Los autores concluyeron que la actividad de la enzima se asocia con la resistencia sistémica inducida contra la enfermedad. Su implicación en procesos fisiológicos y de desarrollo vegetal puede detectarse desde la germinación hasta la senescencia (Kristensen *et al.*, 1999). Su actividad se ha relacionado con el proceso de crecimiento y desarrollo vegetal (Wolter y Gordon 1975; Patra y Mishra 1979); ejemplo, en aguacate, las hojas adultas manifestaron mayor concentración que las hojas juveniles (Sánchez *et al.*, 1993).

En la pared celular las peroxidasas reaccionan con compuestos que contienen un (os) grupo (s) hidroxilo unido a un anillo aromático, el guaiacol (o-metoxi fenol) es comúnmente usado como un sustrato para la medición de la actividad de esta enzima. La deshidrogenación oxidativa del guaiacol por las peroxidasas ocasiona la formación de radicales fenoxyl y el subsecuente apareamiento de un radical inestable lleva la polimerización no enzimática de monómeros. En una forma similar el ácido hidroxicinámico, el alcohol hidroxicinamil y sus derivados son convertidos a radicales fenoxyl por las peroxidasas. Las especies de alcohol hidroxicinamil son polimerizadas a lignina. Los ácidos hidrocínámicos contienen grupos funcionales alifáticos que son incorporados en la suberina (Fry, 1986)

### **3.1.2.6 Fenoles totales**

Son metabolitos secundarios, Harborne (1989) lo definió como una sustancia que posee un anillo aromático con uno (fenol) o más (polifenoles) sustituyentes hidroxilos, incluyendo derivados funcionales (ésteres, éteres metílicos, glucósidos, etc.). Se derivan de las vías shikimato-fenilpropanoides-flavonoides. Y se dividen en dos clases: 1) fenoles preformados que se sintetizan durante el desarrollo de los tejidos de las plantas y 2) compuestos fenólicos que son inducidos en respuesta al estrés biótico o abiótico (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Los compuestos

fenólicos suelen estar en las plantas sanas, pero su concentración aumenta tras la infección por un patógeno. En variedades resistentes la síntesis de estos compuestos es mucho mayor que en las susceptibles (Dai, *et al.*, 1995). La acumulación rápida y temprana de estos compuestos en los sitios de infección es una característica de las respuestas de defensa de base fenólica. Esta acumulación pueden resultar en el aislamiento eficaz del patógeno en el sitio original de la entrada (De Ascensao y Dubery, 2003). Los fenoles de bajo peso molecular, como los ácidos benzoicos y los fenilpropanoides, se forman en la respuesta inicial a la infección (Kurosaki *et al.*, 1986; Niemann *et al.*, 1991).

Por ejemplo en cebollas, el catecol y ácido protocatéquico previene la infección por *Colletotrichum circinans* (Walker y Stahmann, 1955). El ácido clorogénico confiere resistencia a tubérculos de papa contra *Streptomyces*, *Verticillium alboatrum* y *Phytophthora infestans* (Johnson y Schaal, 1952; Lee y LeTourneau, 1958). Pequeñas concentraciones de benzaldehído (IV) inhiben totalmente la germinación de esporas de *Botrytis cinérea* y germinación de *Monilia fructicola* (Wilson *et al.*, 1989). Dos metabolitos secundarios constitutivos de la naranja amarga (*Citrus aurantium*); naringina y el polymethoxyflavona, tangeretina mostraron actividad antifúngica frente a *Penicillium digitatum* (Arcas *et al.*, 2000). Estudios in vitro revelan que los compuestos tirosol, catequina, y oleuropeína del olivo (*Olea europaea* L.) mostraron actividad antifúngica contra *Phytophthora* sp. (Del Río *et al.*, 2003).

La respuesta defensiva del aguacate involucra un aumento en la acumulación de fenoles (Brune y van Ielyveld, 1982). En varias especies del género *Persea*, existe considerable resistencia a la infección de *P. cinnamomi* (Zentmyer, 1961). Zaki *et al.*, (1973) reportan la presencia de un agente antifúngico preformado en tejidos de especies resistentes y lo definió como borbonol (Zaki *et al.*, 1980). En 1982 Wehner y colaboradores informaron sobre la sensibilidad de los patógenos a sustancias antifúngicas en el tejido de aguacate; la concentración fue mayor en hojas seguidas del mesocarpio de la fruta, raíz, extractos de las semillas y la testa. En este cultivo algunos compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes e inducen resistencia; y están presentes en ciertas regiones lipofílicas. El fenol soluble flepicatequina 3-ol es un antioxidante y actúa como una trampa para radicales libres (Vidhyasekaran, 1997). El dieno (1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-hen-eicosa-12-, 15-dieno) inhibió el crecimiento del micelio (Prusky *et al.*, 1982; Prusk y *et al.*, 1983) y la germinación de esporas (Prusky *et al.*, 1982). En

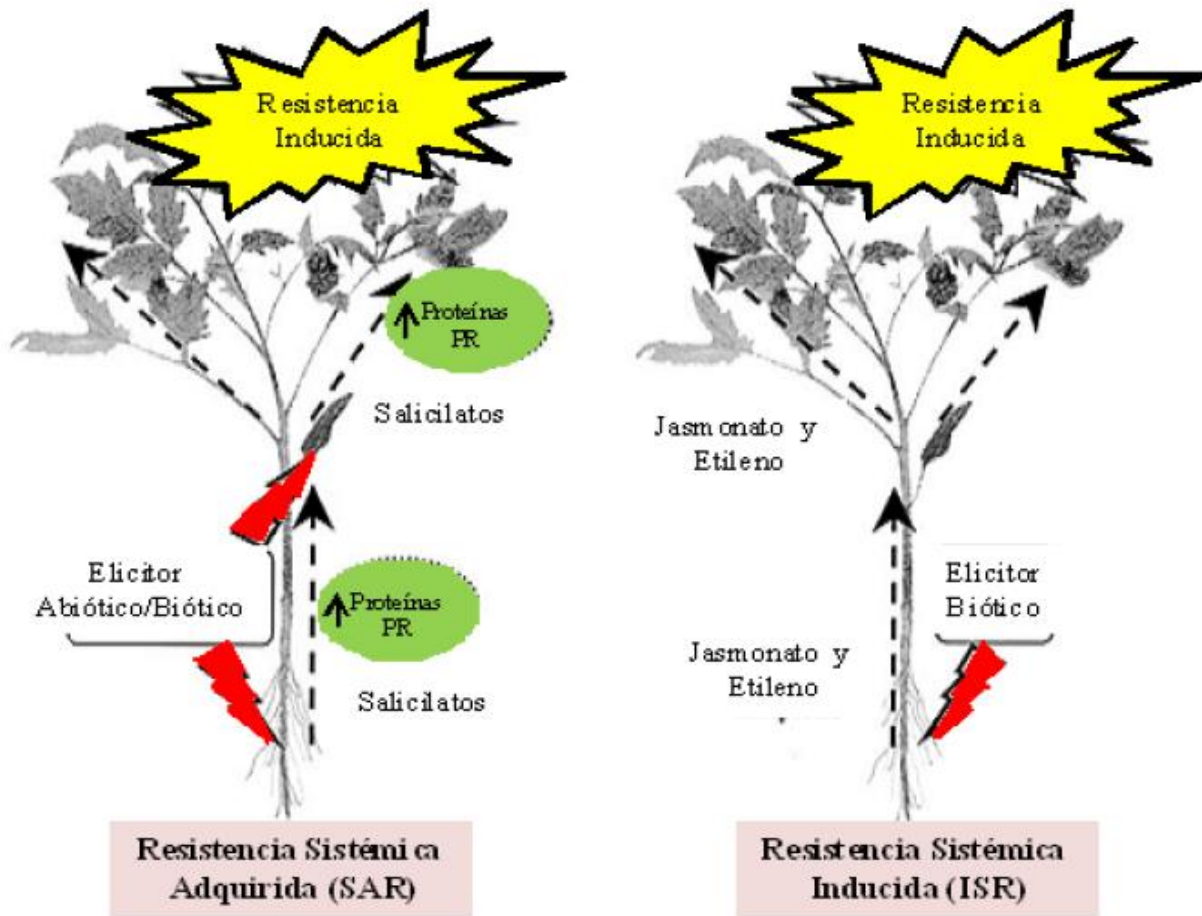
hojas de aguacate se acumuló en orden de magnitud, en Hass(4,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), Pinkerton, Fuerte, Duke 7 y Edranol (0,4  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Se han aislado otros compuestos con propiedades fungitoxicas, Dormergue y colaboradores (2000) afirmaron que el (E, Z, Z,) -1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicoso-5, 12, 15-trieno inhibió la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.).

### **3.2 Resistencia sistémica adquirida e inducida**

Vallad y Goodman (2004) distinguieron a la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y la Resistencia Sistémica Inducida (ISR) en base a la naturaleza del elicitor y las rutas de activación que las envuelven. La terminología y significado de estos conceptos han causado confusión. En el primer congreso Internacional sobre Inducción de Resistencia a Enfermedades en Plantas realizado en Grecia (1999), se discutió este tema aceptando ambos términos como sinónimos la cual ha generado confusión en la comunidad científica ya que se trata de distintos fenómenos y diferentes rutas de señalización. Existen opiniones divididas, otros proponen el uso de las siglas PGPR al referirse a la ISR. Actualmente, el término de resistencia inducida en plantas, solamente se emplea para identificar el fenómeno en su forma general (Tuzún, 2006).

La inoculación localizada con patógenos virulentos y avirulentos son capaces de inducir resistencia local (LAR) o sistémica (SAR) (Madriz, 2002). En 1960, Ross demostró que las plantas de tabaco inoculadas con el virus causante del mosaico del tabaco (TMV) desarrollaban resistencia a una infección secundaria en tejidos distantes del punto de infección. A esto se le denominó Resistencia sistémica adquirida (SAR), misma que brinda protección a la planta contra virus, hongos, bacterias, nematodos y oomycetos (Ryals *et al.*, 1996, Sticher *et al.*, 1997; Durrant y Dong, 2004). Hammerschmidt (1999b) define a SAR como una respuesta de defensa inducida, sistémica, de amplio espectro que se asocia a una alta expresión de genes PR. Esta resistencia puede ser activada en muchas especies de plantas por patógenos y activadores sintéticos donde genera cascadas de señalización a larga distancia. En la respuesta SAR se activan diversos genes cuyos productos pueden viajar a través del floema, esta inducción génica de defensa no ocurre solo en el tejido inicialmente infectado, sino en tejidos distales (Ruiz *et al.*, 2001; Vlot *et al.*, 2008). La resistencia sistémica inducida (ISR) se desarrolla a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos de la rizosfera (rizobacterias). Se caracteriza por estar

mediada por vías metabólicas sensibles al ácido jasmónico y al etileno y ser independiente de la expresión de los genes PR y del ácido salicílico (Pieterse y van Loon, 1999).



**Figura 1.-** Comparación entre SAR e ISR (Vallad y Goodman, 2004)

### 3.3 Moléculas de señalización

Vidhyasekaran (2008) afirmó la importancia de las moléculas de señalización que permiten a la planta responder a estímulos externos. Cuya función es transducir los estímulos extracelulares reconocidos por receptores de la célula a un gran número de moléculas blanco, que integran respuestas intracelulares específicas al estímulo exterior. Estas moléculas son las proteínas activadas por mitogénicas (MAP cinasas), fosfolípidos transmembranales, canales aniónicos de  $Cl^-$  y  $NO_3^-$ , moléculas de alcalinización extracelular/acidificación –citoplasmática, especies

reactivas de oxígeno ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $^{\cdot}OH$ ), radicales de NO y sistemas de señalización por ácidos grasos, ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido absícico (ABA). Bari y Jones (2009) señalaron otras moléculas de señalización como el ácido giberélico (GA), citoquininas (CK) y los brasinoesteroides (BR).

### 3.3.1 Señalización vía ácido salicílico (AS)

La biosíntesis de este metabolito, puede ser generado por dos vías enzimáticas que requieren del metabolito primario corismato (Chen *et al.*, 2009). La L-fenilalanina, es convertida en AS mediante el intermediario benzoato y por el ácido cumárico, a través de una serie de reacciones enzimáticas inicialmente catalizadas por la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (PAL). El corismato puede ser convertido en AS vía isocorismato, en un proceso de dos pasos que implica la participación de las enzimas Isocorismato Sintasa (ICS) e Isocorismato Piruvato Liasa (IPL) (Verberne *et al.*, 2000; Wildermuth *et al.*, 2001). La mayoría del SA inducido por patógenos es sintetizado por la ruta del isocorismato (Wildermuth *et al.*, 2001).

El ácido salicílico (SA) es la molécula que ha mostrado mayores evidencias de estar involucrada en las vías de SAR (Mauch-Mani y Métraux, 1998). De esta forma, la inducción de SAR generalmente se correlaciona con incrementos en la acumulación de SA tanto localmente como sistémicamente (Lawton *et al.*, 1995). El AS una molécula importante en la señalización de defensa a virus, bacterias y hongos fitopatógenos (Vlot *et al.*, 2008). Es esencial en la transducción de señales que conducen a la activación de genes PR que codifican a proteínas PR, también para el establecimiento de la respuesta hipersensible (RH) (Camarena y de la Torre, 2007; Vlot *et al.*, 2008). También participa en procesos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, repuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como en la resistencia a enfermedades (Raskin, 1992; Métraux y Raskin, 1993; Humphreys and Chapple, 2002; Vlot *et al.*, 2009). La aplicación de AS mostró disminución de los síntomas causados por los virus del Mosaico y Necrosis del Tabaco TMV y TNV (White, 1979; Maurhofer *et al.* 1998).

### **3.3.2 Señalización vía ácido jasmónico (JA)**

Turner y colaboradores (2002) definieron el JA como un metabolito lipídico derivado del ácido linoleico, que interviene en procesos de la planta como el crecimiento de raíces, maduración de frutos, enrollamiento de zarcillos, respuesta a estrés biótico y daño mecánico, y defensa a insectos y patógenos.

La señalización por este metabolito se debe al incremento de su síntesis en respuesta al ataque de patógenos y a la alta expresión de genes de defensa como PDF 1.2, este gen en *Arabidopsis* es usado como marcador para caracterizar la respuesta de defensa dependiente de JA (Glazebrook, 2005; Bari y Jones, 2009). Makandar *et al.*, (2010), señalaron que las aplicaciones de metil jasmonato incrementaron la resistencia a hongos necrófitos. Es importante notar que el modo de acción del ácido jasmónico para el control de insectos plaga resulta más eficaz que otros mediadores como etileno o ácido salicílico empleados aisladamente (Staswick y Lehman, 1998).

### **3.3.3 Interacción entre la rutas del SA y JA**

Durrant y Dong (2004) señalaron que las rutas de señalización interactúan de manera sinérgica o antagónica de acuerdo al tipo de interacción patogénica. Koumneef y Pieterse (2008) indicaron que la acumulación de SA inhibe la síntesis de JA y el decrecimiento de la expresión de genes dependientes del JA. Mientras que la señalización de JA/ET muchas veces inhiben la señalización de SA. Loake y Grant (2007) coincidieron en que el AS puede alterar la síntesis y/o señalización de otras hormonas que incluyen la vía del ácido jasmónico (AJ), etileno (ET), y auxinas. Riveros (2001) señaló que de acuerdo al análisis conjunto de la actividad del ácido salicílico y del ácido jasmónico muestra que no deben usarse ambos productos simultáneamente, porque existe una acción de bloqueo que inhibe ciertas reacciones de defensa.

### 3.4 Moléculas inductoras de defensa

Las enfermedades inducidas por patógenos (hongos, virus, bacterias y nematodos) pueden causar graves estragos en el rendimiento agrícola; para prevenir estos efectos negativos se han desarrollado diferentes estrategias como la alta calidad de material de propagación, la eliminación de fuentes de inóculo, la rotación de cultivos, el manejo de suelos, el manejo de la nutrición, el uso de variedades resistentes, el uso de microorganismos antagonistas y la aplicación de agroquímicos. El interés agronómico se ha centrado recientemente en el uso de activadores de resistencia por su capacidad de inducir RSA (Du *et al.*, 2012), contra diferentes patógenos (hongos, virus y bacterias) (Ryals *et al.*, 1996; Oostendorp *et al.*, 2001; Soyly *et al.*, 2003). Estas moléculas no deben ser tomadas como sustitutos de fungicidas, sino como una alternativa adicional dentro del manejo integrado (Lyon y Newton, 1999).

En 1994 existían pocos reportes sobre la inducción química de la resistencia en árboles frutales (Kessmann *et al.*, 1994); derivado de esto, años más tarde se demostró que la resistencia sistémica inducida también puede ser activada en cultivos perennes (Riveros, 2001).

Los productos químicos que inducen SAR son el ácido salicílico (SA) (White, 1979), ácido isonicotínico (INA) (Ward *et al.*, 1991), el ácido jasmónico (Cohen *et al.*, 1993), acibenzolar-S-metil (Friedrich *et al.*, 1996), probenazol (Sekizawa y Mase, 1981)  $\beta$ BL  $\beta$ -ácidoaminobutírico (BABA) (Cohen *et al.*, 1994). Las plantas pueden reconocer estructuras generales asociadas a microorganismos, llamados elisitores o PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) (Nürnberg y Brunner, 2002), tales como la flagelina (Felix *et al.*, 1999), proteína de harpin (Donget *et al.*, 1999), quitina (Felix *et al.*, 1993), ergosterol (Granado *et al.*, 1995) y glucanos de la pared celular (Sharp *et al.*, 1984).

A continuación se describen tres moléculas activadoras con gran potencial para ser incluidas en el manejo integrado de enfermedades en diferentes cultivos.



### 3.4.1 Acibenzolar-S-metil (ASM)

Mediante el modelo biológico para SAR propuesto por Kuc en 1982, se descubrieron dos moléculas activadoras: el ácido, 6-dicloro isonicotínico (INA) y el S-metil benzo [1, 2, 3] thiadiazole-7-carbothiate (acibenzolar-S-metil o BTH). Estas moléculas actúan como sustitutos del ácido salicílico (AS) (Daayf *et al.*, 1997). El ASM no tiene efecto directo sobre los patógenos y es compatible con la mayoría de agroquímicos (Reglinski *et al.*, 2007). El ASM ha sido efectivo en pera japonesa (*Pyrus pyrifoliae*) contra la roya (*Gymnosporangium asiaticum*) y roña (*Venturia nashicola*) (Ishii *et al.*, 1999). Protegió plántulas de café contra *Cercospora coffeicola* durante 60 días (Manzano *et al.*, 2010). En combinación con fosfonato de potasio redujo la incidencia de *P. cinnamomi* en especies forestales (*Pinus radiata*, *Banksia integrifolia* e *Isopogon cuneatu*) (Ali *et al.*, 2000). La resistencia del banano se activó al ser tratadas con CGA 245704 =ASM, en la provincia de Limón, Costa Rica. La inclusión de ASM redujo entre 15 y 18% el número de aplicaciones de fungicidas para el control de la sigatoka negra (Madrigal *et al.*, 1998); La reducción fue altamente significativa en invernadero y significativa en campo, al mezclarlo con fungicidas convencionales (Patiño, 2002).

### 3.4.2 Proteína de harpin (Messenger®)

Elisitor codificado por el gen hrpN (reacción de hipersensibilidad y patogenicidad) de *Erwinia amylovora*. Proteína caracterizada por ser un ácido, estable al calor, rico en glicina, de 44kDa (Beer *et al.*, 1992). La empresa Eden Biosciences (WA-USA) registró esta molécula con el nombre comercial de Messenger TM, estimula respuestas de defensa contra enfermedades bacterianas y fungosas por las vías de señalización del ácido salicílico y el ácido jasmónico (Barón, 2001). Cuando la planta reconoce a este elisitor, se generan una serie de reacciones internas que estimulan la resistencia sistémica adquirida (Blaine, 2000). Estas respuestas se pueden manifestar con la producción de oxígeno activo (por ejemplo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el cambio en la relación K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> a través de la membrana plasmática y están asociados a una interacción incompatible planta-bacteria que resulta en una respuesta hipersensitiva (Baker *et al.*, 1993; Desikan *et al.*, 1998).

También actúa como una señal molecular para la expresión de genes de defensa involucrados en diversas respuestas como la codificación de fenilalanina amonio-liasa (PAL), la cual es una enzima clave para la biosíntesis de lignina y ácido salicílico; Glutathion S15 transferasa, una familia de enzimas que protegen contra el estrés oxidativo y por último para la codificación de enzimas requeridas para la síntesis de fitoalexinas (Desikan *et al.*, 1998).

Este producto no es antimicrobiano, ni altera el ADN de las plantas tratadas (Jang *et al.*, 2006; Barón, 2001). Sin embargo, mejora la fotosíntesis y la absorción de nutrientes (Jang *et al.*, 2006). De acuerdo a EPA (2014) Messenger® se formuló para aplicarse en sistemas de manejo integrado de cultivos con el objetivo de reducir el uso de agroquímicos ya que combina biotecnología y tecnologías no contaminantes (rápida degradación y no tóxica). Ha mostrado resultados positivos en los cultivos de tomate, pimienta, trigo, fresa, uva, pepino, melón, arroz y manzana, café, entre otros. Capdeville *et al.* (2002) aplicaron la proteína harpin en manzanas cv. “Red Delicious” recién cosechadas contra *Penicillium expansum*; el tratamiento aplicado 96 horas antes de la inoculación mostró los mejores resultados, debido a que el hongo no entró en contacto con el producto aplicado; se concluyó que es capaz de inducir resistencia en la fruta.

Existen pocos estudios sobre la interacción de la resistencia inducida y la infección de patógenos en especies perennes de importancia económica (huertas forestales maderables), sin embargo Hubbes y Jeng (1981) han llevado a cabo extensas investigaciones sobre el potencial de la resistencia inducida por el control de la grafiosis causada por *Ophiostoma novo ulmi* (*Ceratocystis novo ulmi*).

### **3.4.3 Fosetil-Al (Aliette®)**

Fosetil-Al (Aluminio tris-o-etil- fosfonato) fue desarrollado por Rhône-Poulenc agroquímicos de Lyon Francia (Schwin, 1979). Se transloca en el xilema y el floema (El-Hamalawiet *et al.*, 1995). Se degrada en la planta como ácido fosforoso ( $H_3PO_3$ ), es considerado como un activador de mecanismos de defensa contra enfermedades fungosas (Vo- Thi- Han *et al.*, 1979; Bompeix *et al.*, 1980; Trique *et al.* 1981). Este producto tiene poca actividad contra el crecimiento micelial in vitro, aunque Farih y colaboradores (1981) indicaron que inhibió el crecimiento de *Phytophthora*

*parasitica* y *P. citrophthora* in vitro bajo concentraciones de igual o más de 1000 µg, sin embargo, con modificaciones en el medio RMSM (modificado por Ribeiro) a pH 6.1 se demostró que se requería menos de 200 µg/ mL (Feen y Coffey, 1984) para inhibir al patógeno. Una conclusión del efecto sobre *Phytophthora* spp es que se da por una combinación de la actividad fungitóxica directa y la estimulación de mecanismos de defensa del huésped (Smillie *et al.*, 1989; Hardy *et al.*, 2001). Con relación al efecto directo sobre los patógenos, Thomidis y Michailidis (2002) concluyeron que tuvo limitada capacidad para reducir el crecimiento micelial in vitro de *P.cactorum* y *P.citrophthora*.

### **3.5 *Phytophthora cinnamomi***

Rands (1922) fue el primero en reportar esta especie en canela (*Cinnamomum burmanni* Blume). Importante patógeno de suelo con una amplia distribución a nivel mundial, reportado en más de 75 países afectando a un gran número de cultivos y ecosistemas forestales. El aguacate es un frutal susceptible a este patógeno, la cual induce la enfermedad denominada “la tristeza del aguacatero” (Téliz y García, 1982) o pudrición de raíces (Menge y Ploetz, 2003) ha provocado graves pérdidas en la producción (Zentmyer, 1980) y la industria (Pérez, 2008). Infecta a plantas en diferentes etapas fenológicas (Menge y Ploetz, 2003). En México ha provocado la desaparición de regiones aguacateras en Querétaro (Téliz *et al.*, 1989) y está presente en las principales zonas productoras de Michoacán, Puebla, Morelos, Nayarit y Veracruz, coincidencias que varían entre 5-90% (Morales, 1983; Téliz, 2000; Téliz y Mora, 2007).

#### **3.5.1 Importancia**

##### **3.5.1.1 Internacional**

*P. cinnamomi* es un parásito facultativo y cosmopolita, habitante natural de la mayoría de los suelos de todo el mundo, puede infectar raíces y cuello de más de 600 plantas de importancia económica (Téliz y Mora, 2007). En California causó entre 60-90 % de pérdidas económicas (Coffey, 1991). Pegg *et al.*, 1987 señalaron que en el oriente de Australia afectó en gran medida

la producción del aguacate. En Sudafrica Milne y Chamberlain (1971) señalaron un 20% de arboles afectados en huertas juvenes de este frutal. En Andalusia, España el 40 % de las huertas de aguacate se encontraron con la presencia de *P. cinnamomi* (Pérez *et al.*, 2005). *P. cinnamomi* causó pérdidas del 30 al 50% de los árboles en vivero y durante los dos primeros años de establecimiento del cultivo en Colombia (Tamayo, 2007). También se le ha encontrado en Brasil, Trinidad, Cuba, Puerto Rico, Hawái, Honduras y Argentina (Vidales, 1999).

### **3.5.1.2 Nacional**

*P. cinnamomi* apareció en Michoacán en la década de los setentas de tal manera que en 1979 se encontraron 13 mil árboles afectados (Vidales, 1999). En Michoacán en 1994, se encontraron 100 mil árboles enfermos en los municipios de Uruapan, San Juan Nuevo, Tinguindín, Los Reyes, Tancítaro, Peribán y Ziracuaretiro con pérdidas estimadas en 640 millones de pesos (Vidales, 1996). En Morelos y Puebla se han encontrado incidencias que fluctúan entre 45 y 95% y en Michoacán se estimó la presencia de la tristeza en aproximadamente 5% (5,500 ha) de la superficie cultivada (Téliz y Mora, 2007).

### **3.5.2 Taxonomía**

La taxonomía establecida de los oomyecetes está cambiando, especialmente después de la incorporación de herramientas moleculares para estudios filogenéticos, que se basan principalmente en el análisis de pequeñas subunidades de ARN ribosomal y diferentes genes que codifican a proteínas (Pérez, 2008). De acuerdo a NCBI (2014) este pseudohongo se clasifica de la siguiente manera:

Dominio: Eukaryota

Phyllum: Stramenopiles

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

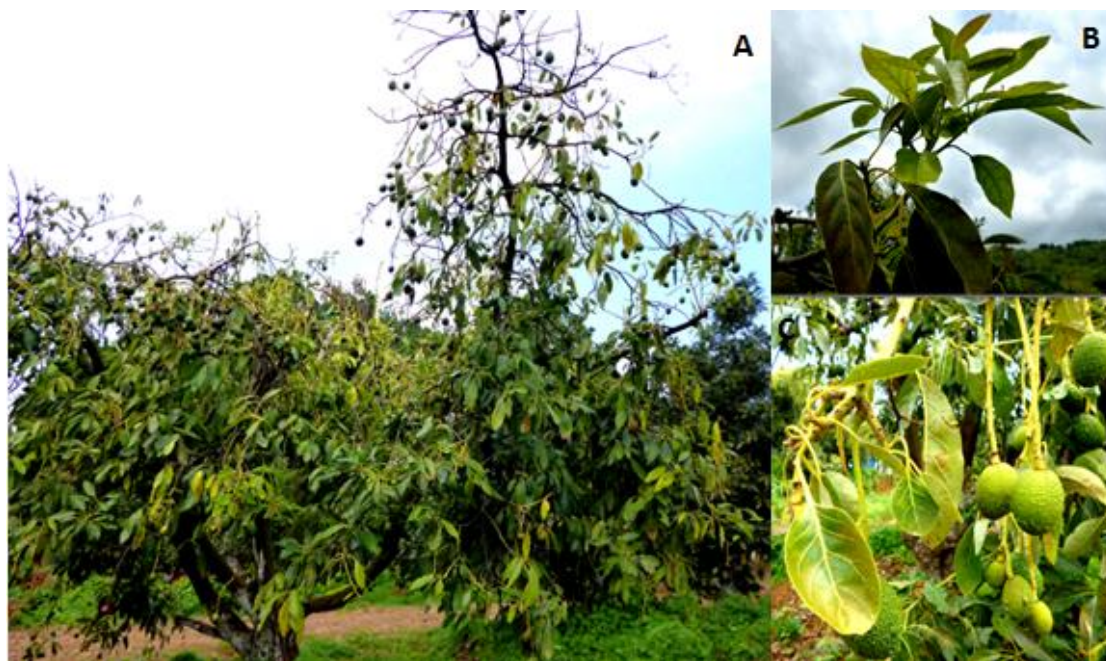
Familia: Peronosporaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *P. cinnamomi*

### 3.5.3 Síntomas

Los síntomas iniciales son lesiones necróticas en las raíces absorbentes, el patógeno invade el tejido cortical de las raíces, rodeándolas individualmente, causando lesiones de color marrón oscuro, a medida que la enfermedad avanza irrumpe al sistema vascular, tornándolas quebradizas (Zentmyer, 1980; Phillips, 1993; Menge y Ploetz, 2003, Téliz y Mora, 2007), escasas (Zentmyer, 1980) y necróticas; limitando la capacidad de absorción de agua y nutrientes (Menge y Ploetz, 2003; Téliz y Mora, 2007). El nitrógeno se incrementa y se detiene la translocación del fósforo hacia los tejidos, y disminuye la absorción de manganeso, cobre, y fierro (Labanauskas *et al.*, 1975 citado por Téliz y Mora, 2007) esto causa el amarillamiento, escaso follaje y aborto de flores y frutos. En consecuencia de esta infección se manifiesta un decaimiento progresivo, escaso o nulo crecimiento de hojas y yemas, clorosis, marchitez, muerte descendente de ramas, provoca la proliferación de frutos de bajo calibre y un agotamiento gradual (Zentmyer, 1980; Tamayo, 2007; Pérez, 2008).



**Figura 2.**-A) árbol infectado con *P. cinnamomi*, B) proliferación de frutos de bajo vigor, C) brotes carentes de vigor.

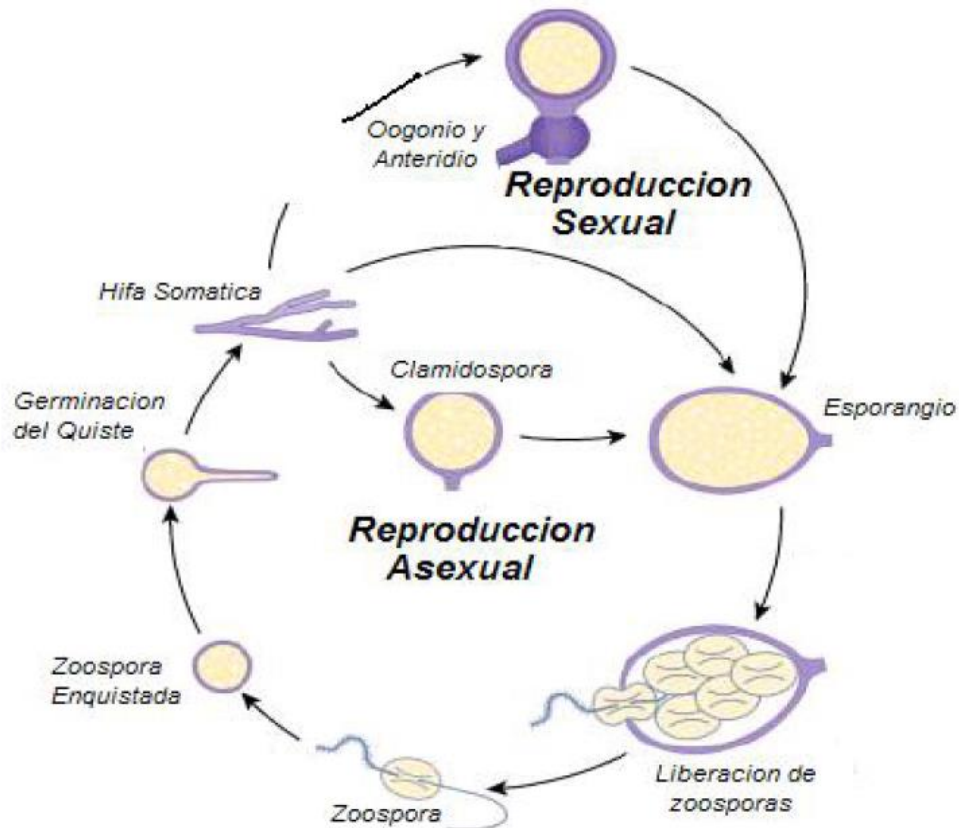
En ocasiones, se encuentran canchales en raíces y la base del tronco (Crandall, 1948). Se ha observado que los árboles con tristeza manifiestan mayor humedad en la periferia del tronco que en los árboles sanos. Existe mayor transpiración que absorción la cual resulta en un marchitamiento. Se ha demostrado que la falta de agua reduce la producción de clorofila y hormonas (Téliz y Mora 2007).

#### **3.5.4 Hospederos**

*P. cinnamomise* ha encontrado en diferentes hospederos, por ejemplo, durante los años cincuenta el número de hospederos incrementó notablemente principalmente en zonas cálidas y tropicales (Pérez, 2008). Los hospederos incluyen cultivos importantes y plantas forestales como la piña, durazno, manzano, mango, macadamia, papaya, azalea, canela, pino, ciprés, eucalipto, encino, arbustos ornamentales, entre otros (Zentmyer, 1980).

#### **3.5.5 Ciclo de la enfermedad**

Cuando el patógeno está en condiciones adversas sobrevive en el suelo por medio de clamidosporas u oosporas en raíces o residuos vegetales. Las clamidosporas son estructuras de resistencia que se forman bajo condiciones adversas como sequía, bajas temperaturas, falta de alimento, alta humedad, entre otras. Estas estructuras dan origen al micelio y este a su vez producen esporangios la cual contienen en su interiores estructuras móviles llamadas zoosporas, bajo condiciones idóneas de humedad las zoosporas se dispersan con ayuda de flagelos sobre la superficie del agua para infectar las raíces adventicias. Con el avance de la infección se pudren gran cantidad de raíces hasta provocar el decaimiento y la muerte del hospedante. Al morir el árbol y al presentarse condiciones no idóneas el patógeno forma nuevamente clamidosporas. Cuando se vuelven a presentar condiciones favorables, estas estructuras de resistencia reinician el ciclo de la enfermedad (Téliz y Mora, 2007).



**Figura 3.-** Ciclo de vida de *Phytophthoracinnamomide* acuerdo con Hardham (2005)

### 3.5.6 Factores que influyen en la biología y patogenicidad de *P. cinnamomi*

La actividad de *P. cinnamomi* se reduce a los 12°C y a los 30°C (Menge, 1999). La temperatura óptima del suelo para el desarrollo de este patógeno es de 20 °C, el micelio se desarrolla entre 7.5 y 28 °C con una óptima entre 17.5 y 19.5 °C. Los esporangios se desarrollan a una temperatura óptima de 24 °C mientras que las zoosporas no se producen a temperatura inferiores de 17 °C (Zentmyer, 1985; Hardham *et al.*, 1991). En general, este oomyceto *in vitro* crece a un pH entre 4.5-5.5 con la presencia de arginina y N (Cameron y Milbrath 1965), las clamidosporas germinan a un pH de 3 a 9 con un óptimo de 5 a 7 (Mircetich *et al.*, 1968) mientras que la producción de esporangios se eleva a un pH de 4 a 7 (Chee y Newhook 1965). En condiciones naturales el pH óptimo es 6, abajo de 3 o arriba de 8 la enfermedad no progresa (Crandall *et al.*, 1945; Zentmyer, 1980).

Los suelos arcillosos con deficiente drenaje fomentan el desarrollo de la enfermedad (Menge, 1999) . El exceso de humedad causada por riegos pesados o lluvias fomentan la diseminación del patógeno en campo por medio de zoosporas (Duniway, 1983; Grove y Boal, 1991). Estas condiciones fomentan el desarrollo de la infección. Altos niveles de humedad fomentan el desarrollo de micelio y una mayor producción de clamidosporas, esporangios y con ello mayor liberación de zoosporas (Grove y Boal, 1991, Sivasithamparam, 1981). Una mala aireación de las raíces afecta tanto a la planta como al patógeno (Zentmyer, 1980). En aguacate, el estrés por salinidad limita el crecimiento de las raíces (Bernstein *et al.*, 1996) considerando que la regeneración de raíces es un mecanismo de defensa contra *P. cinnamomi* (Kellam y Coffey, 1985) la salinidad afecta al desarrollo del patógeno y fomenta la susceptibilidad del hospedero.

### **3.5.7 Manejo de la enfermedad en México**

Las técnicas regionales basadas en la aplicación aislada de métodos de control han sido inefectivas, por tal motivo es importante abordar a la enfermedad integrando diferentes tácticas que den vigor a la planta y que puedan bajar los niveles de inóculo en el suelo. Téliz y Mora (2007) recomiendan establecer un sistema de riego subterráneo, goteo, microaspersión o en cajetes individuales para hacer más eficiente el recurso y evitar la marchitez por falta de agua. Se busca conservar un contenido de humedad mínima de 70% de la capacidad de campo. Incorporar de manera periódica estiércol de bovino en los primeros 30 cm de suelo, manteniendo el contenido de materia orgánica entre 3 y 5 %. Fertilización química periódica del suelo y follaje, complementaria al abono orgánico de acuerdo a las necesidades detectadas en el análisis químico. La poda es una actividad de gran importancia, esta actividad se recomienda realizarla para restablecer el balance entre el follaje y el volumen de raíces. Reducir los problemas de acidez o salinidad por medio de mejoradores de suelo. Así como la aplicación de un programa fitosanitario contra plagas que reducen el vigor de los árboles.

El control de *P. cinnamomi* en aguacate se hace principalmente con productos químicos que tienen alto costo, y contaminan al ambiente. Esta situación evidencia la necesidad de convivir con este patógeno de acuerdo con tácticas conjuntas de manejo integrado de la enfermedad y del



cultivo que den vigor al árbol y mantengan bajas las poblaciones del patógeno (Téliz y Mora, 2007). Existen pocas moléculas químicas registradas para este cultivo que sean eficientes, ya que la presencia de residuos de plaguicidas representa una barrera no arancelaria para el comercio internacional de aguacate (APEAM, 2013). Los activadores de resistencia, por las características antes mencionadas, podrían ser una opción para integrarlos en el manejo integrado de esta enfermedad.

## **4.- MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio se llevó a cabo en un invernadero del Colegio de Postgraduados campus Montecillo (19°27'39.09" N y 98°54'14.58" O, a 2246 msnm) en Texcoco Estado de México. Este municipio tiene un clima semifrío subhúmedo, templado subhúmedo con lluvias en verano, las temperaturas medias mínimas y máximas son de 6 y 16°C, con una precipitación anual de 500 a 1200 mm (INEGI, 2009).

### **4.1 Aislamiento de raíz**

*P. cinnamomi* se aisló de raíces de árboles de aguacate enfermos de tristeza de una huerta ubicada en la localidad de Arroyo Colorado, municipio de Uruapan, Michoacán (19°59'47.25" N; 101°18'49.40" O, y 1921 msnm). Raíces adventicias fueron lavadas con agua destilada estéril y desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % durante un minuto; se enjuagaron con agua estéril y después sesecaron con sanitas estériles. Diez segmentos de 1 cm de raíces se sembraron en un ángulo de 45° incrustadas en cajas Petri con medio selectivo PARPH (pimaricina, ampicilina, rifampicina, PCNB e himexazol) (Erwin y Ribeiro, 1996). Las cajas de Petri con los aislamientos se colocaron en una incubadora a 28 ° C durante siete días. Las cepas obtenidas se purificaron e incrementaron en medio v8. La identificación se llevó a cabo en base a la morfología mediante claves de Waterhouse, 1956 y Erwin y Ribeiro (1996).

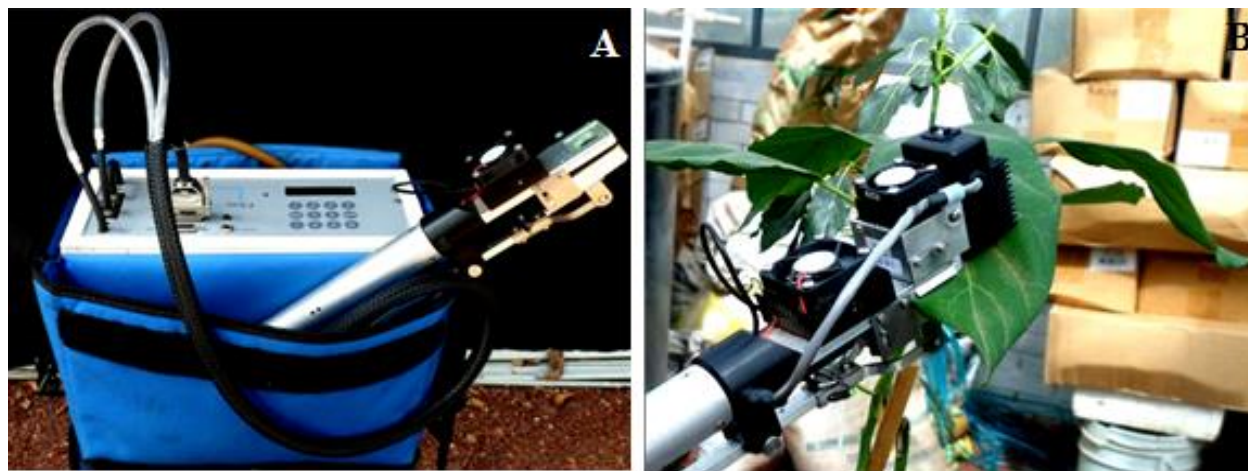
### **4.2 Diseño experimental**

El periodo de evaluación fue del 15 de octubre al 05 de noviembre del 2014. Las unidades experimentales consistieron de 20 plántulas sanas de aguacate "Hass" de 13 meses de edad del vivero "El tronco" del municipio de Uruapan Michoacán. Se establecieron cuatro grupos de cinco plántulas "Hass" que recibieron los siguientes tratamientos: 1) *Pc*: inoculación (250 mL/planta) de las raíces con *P. cinnamomi* (35000 fragmentos de micelio/ mL) (testigo positivo sin activadores); 2) *A+Pc*: Aspersión al follaje (15 mL/planta) de los activadores en mezcla (fosetil- aluminio 4.5 g/L, acibensolar- S- metil 0.3 g/L y proteína de harpin 1.5 g/L) y siete días

después estas plántulas se inocularon con 250 mL/plántula de *P. cinnamomi* (35000 fragmentos de micelio/mL) sobre las raíces; 2) ASM+Pc: Aspersión al follaje (15 mL/ plántula) de acibensolar-S-metil (0.3 g/L) y siete días después estas plántulas se inocularon con 250 mL/plántula de *P. cinnamomi* (35000 fragmentos de micelio/mL) sobre las raíces; 4)Test: aspersión de las raíces con 250 mL de agua destilada estéril (testigo negativo sin hongo ni activadores). Para promover la infección de *P. cinnamomi* el drenaje de cada maceta se cerró con bolsas de polietileno por 24 horas.

#### 4.3 Medición de fotosíntesis neta como parámetro del progreso de la enfermedad

Para determinar la influencia de los tratamientos en las plántulas, se midió la fotosíntesis neta (FN) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) con un sistema portátil de fotosíntesis LI-6400® (Licor, Inc.; Lincoln, NE, USA). Las mediciones se hicieron semanalmente, antes de cada muestreo, en un horario de 11 a 13 h con una radiación fotosintéticamente activa. Las lecturas se efectuaron en dos hojas (sanas y maduras) por planta, ubicadas en el estrato medio y bajo.



**Figura 4.-** A) Sistema portátil de fotosíntesis LI-6400® (Licor, Inc.; Lincoln, NE, USA), B) medición de fotosíntesis neta como parámetro del progreso de la enfermedad.

#### **4.4 Muestreo**

Cinco a seis hojas (peciolo + lamina foliar) se colectaron para el análisis enzimático foliar a los 0, 7, 14, y 21 días después de la inducción con los activadores de resistencia. El muestreo inicial (0 días) se realizó tres horas antes de aplicar los tratamientos; el segundo muestreo se efectuó tres horas antes de la inoculación de *P. cinnamomi* en el tratamiento 2 (A+Pc).

#### **4.5 Polvo vegetal (“polvos de acetona”)**

Para evitar la oxidación del material vegetal, las muestras del invernadero (8 g/muestra) fueron envueltas en tela de limpieza (magitel®) y se sumergieron en nitrógeno líquido (-195°C) durante 24 h, después se liofilizaron durante 72 horas. Las muestras liofilizadas se trituraron en un mortero de porcelana adicionando nitrógeno líquido para facilitar la maceración y la obtención de “polvos de acetona”. Este procedimiento fue la base para el análisis posterior de peroxidasa y fenoles totales. La muestra previamente triturada con nitrógeno líquido se maceró en licuadora doméstica, con 50 mL de acetona al 100% (4 °C) y se filtró al vacío separando la acetona con pigmentos. Esta actividad se repitió siete veces con el mismo tejido hasta despigmentar lo más posible el tejido. El polvo obtenido se secó a temperatura ambiente, se pesó y se almacenó a -4 °C y el lixiviado (acetona con pigmentos) se preservó en un frasco de vidrio a -4 °C (Alia *et al.*, 2002).

#### **4.6 Curva de ácido gálico**

La determinación de fenoles totales en tejido de aguacate se realizó con la curva del ácido gálico coincidiendo con Bekker y colaboradores (2007). Diez mg de ácido gálico se homogenizaron en 10 mL agua destilada. Cinco mL de esta suspensión se aforaron a 250 mL con agua destilada; 0.5, 1, 2, 3 y 4 mL de esta mezcla se vaciaron en tubos de fondo plano, con cuatro repeticiones. Los tubos se ajustaron a 8 mL de agua destilada y se agregaron 0.5 mL de folín y 1.5 mL de

bicarbonato de sodio. Las muestras se agitaron durante 30 s y se dejaron reposar durante 2 h en la oscuridad. Después cada muestra se midió en el espectrofotómetro de luz a 760 nm. Con esta curva se determinó la ecuación del área bajo la curva en la cual se sustituyeron los valores de fenoles totales de cada muestra.

## **4.7 Determinación de enzimas y metabolitos secundarios**

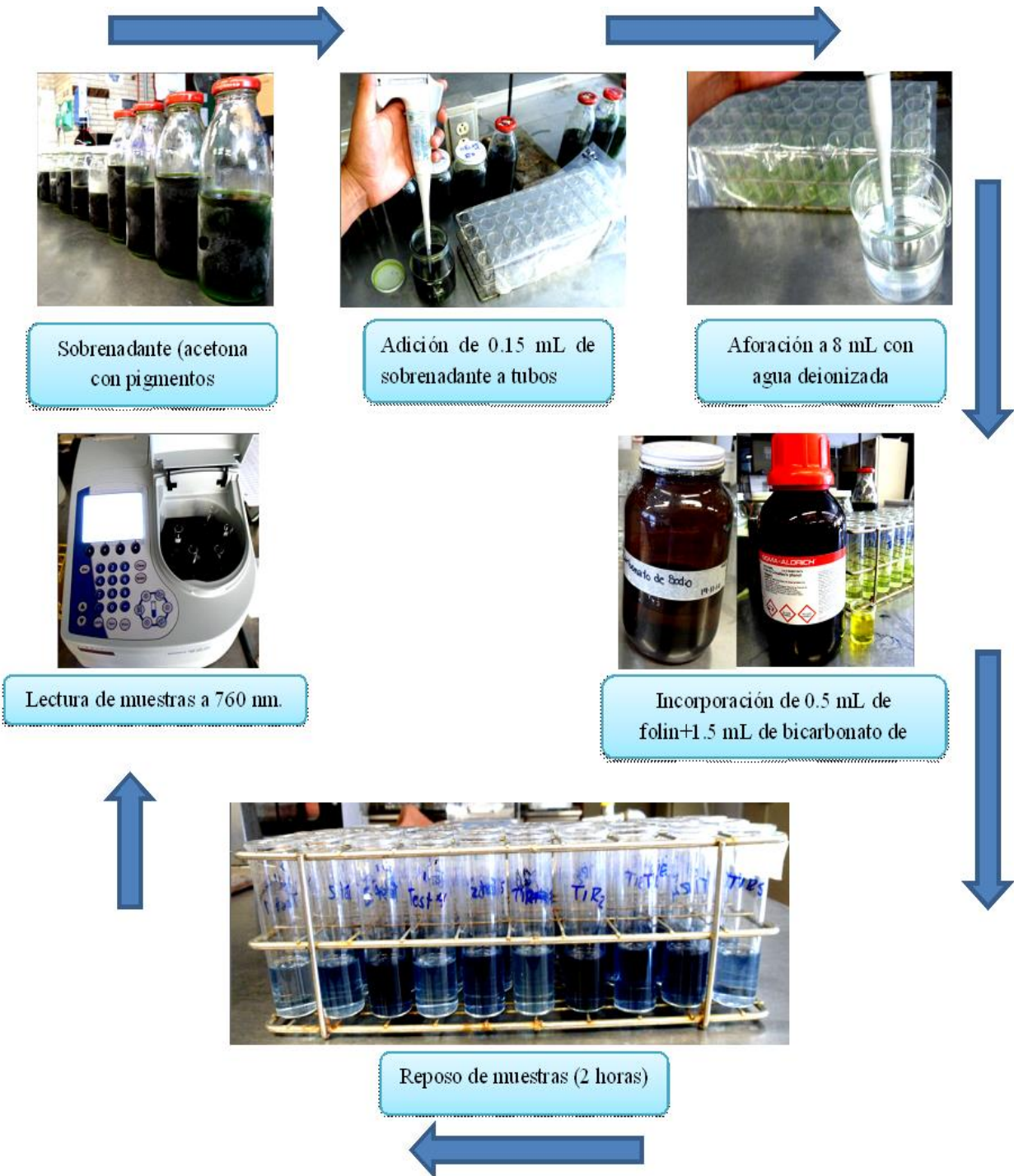
### **4.7.1 Fenoles totales (FEN)**

De acuerdo con el método de Folin y Ciocalteu, (Waterman y Mole, 1994), se midió el volumen del sobrenadante (acetona con pigmentos); 0.15 mL se vaciaron en un tubo de fondo plano, cada muestra contó con cuatro repeticiones. Los tubos se aforaron a 1 mL y luego a 8 mL con agua destilada; se agregaron 0.5 mL de folín y 1.5 mL de bicarbonato de sodio al 20%. Las muestras se agitaron durante 30 s y se dejaron reposar durante 2 h en la oscuridad. Después cada muestra se midió en el espectrofotómetro de luz Spectronic 21D (Milton Roy) a 760 nm. Con la curva patrón de ácido gálico se cuantificó y se reportó la concentración en mg fenoles totales/gramo de peso fresco de tejido.

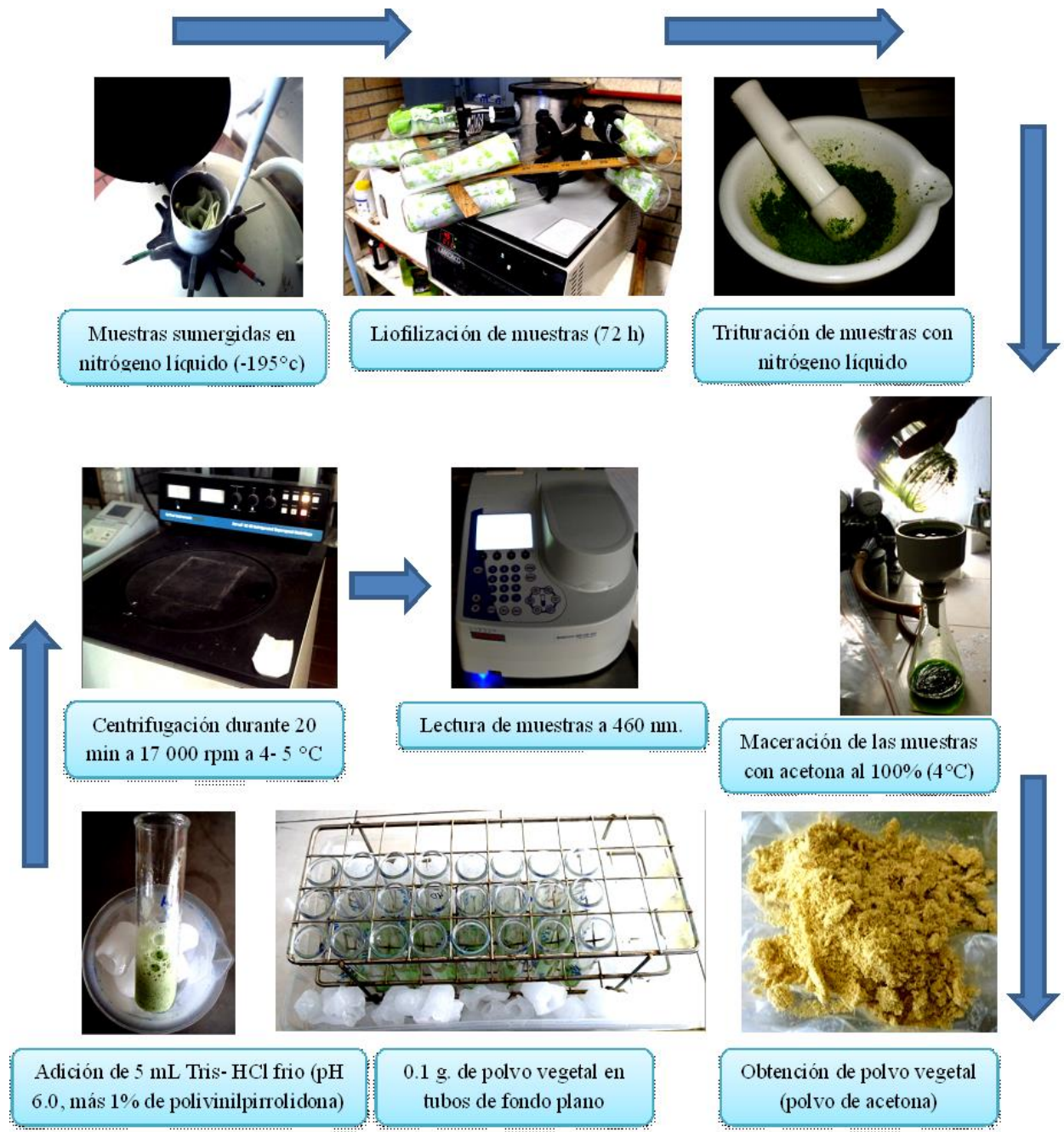
### **4.7.2 Peroxidasa (POX)**

De acuerdo con la metodología modificada de Alia *et al.* (2002) se determinó la expresión de esta enzima a partir de 0.1 g de polvo vegetal (“polvo de acetona”) más 5 mL Tris- HCl frío (pH 6.0, adicionando 1% de polivinilpirrolidona (PVP 40)). Esta mezcla se homogenizó por 1 min y se centrifugó durante 20 min a 17 000 rpm a 4- 5 °C, se extrajo el sobrenadante para utilizarlo en el ensayo. Para la lectura se realizó una mezcla de 3 mL con 2.5 mL Tris- HCl (pH 6.0), 0.25 mL de guaicol 0.1 M, 0.1 mL de peróxido de hidrógeno y 0.15 mL del sobrenadante. El cambio de absorbancia se analizó a 460 nm en 30, 60, 120 s en un espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy). La expresión enzimática se cuantificó como U. g de peso fresco (U es la Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 mmol/min de tetraguayacol). Los

resultados de todas las variables se analizaron con los programas SAS y Excel. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 5.-** Diagrama del proceso para la determinación de fenoles totales presente en hojas de aguacate "Hass".



**Figura 6.-** Diagrama del proceso para la determinación de peroxidasas presentes en hojas de aguacate “Hass”.

### 4.7.3 Evaluación efectividad biológica *in vitro*

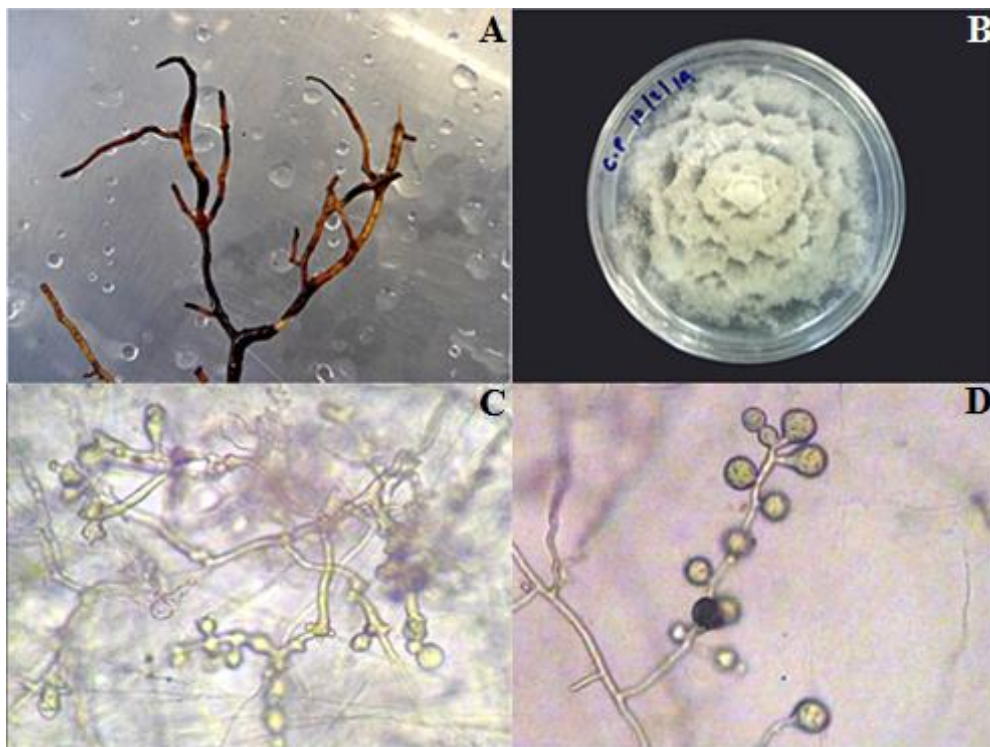
Se evaluaron tres productos activadores de resistencia (acibensolar-S-metil, proteína de harpin y fosetil-Al) y el fungicida Garbus® ((tiociano metiltio) benzotiazol) a diferentes concentraciones (1, 10 y 100 ppm). Se utilizó el producto Garbus® (testigo positivo) por su eficacia en el control de este oomycete en la huerta “Arroyo colorado” Uruapan Mich. Las unidades experimentales consistieron de cajas Petri, cada concentración contó con cinco repeticiones. Los tratamientos fueron: 1) ASM1 (1 ppm), 2) ASM10 (10 ppm), 3) ASM100 (100 ppm), 4) Mes1 (1 ppm), 5) Mes10 (10 ppm), 6) Mes100 (100 ppm), 7) Fos1 (1ppm), 8) Fos10 (10 ppm), 9) Fos100 (100 ppm), 10) Gar1 (1ppm), 11) Gar10 (10 ppm), 12) Gar100 (100 ppm) y Test (testigo absoluto, *P. cinnamomi* en PDA). De acuerdo a las concentraciones de los productos se pesó 6 g de Garbus, 0.6 g de Actigard, 0.375 g de Aliette y 4 g de Messenger para preparar una solución madre de 300 mL a 1000 ppm de cada ingrediente activo (IA). De la solución madre de cada IA se extrajo 10 mL y se colocó en un matraz con medio PDA estéril (90 mL de agua destilada estéril más 3.51 g de PDA) para hacer una suspensión a 100 ppm. Para establecer una suspensión de 10 ppm se tomó 1 mL de la solución madre y se vertió en un matraz con PDA estéril (99 mL de agua destilada y 3.86 g de PDA). Para la suspensión de 1 ppm se sustrajo 100  $\mu$ m y se depositó en un matraz con medio PDA estéril (99.9 mL de agua destilada y 3.89 g de PDA). Se homogenizaron los productos y se vaciaron a cajas Petri, y se dejaron solidificar por 24 horas. Las cajas Petri se inocularon con discos de medio v8 con crecimiento de *P. cinnamomi*. Se incubaron a 28 °C durante diez días. Se midió el diámetro horizontal y vertical de *P. cinnamomi* cada 24 horas.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Identificación

Las cepas aisladas presentaron micelio cenocítico, toruloso o coraloide, hifas típicamente hinchadas, clamidosporas globosas o piriformes, estas características morfológicas corresponden a *P. cinnamomi* (Rands, 1922; Erwin y Ribeiro, 1996). El crecimiento de la colonia en PDA fue de color blanco y de aspecto algodonoso en forma de camelia, la cual es típica de la especie (Waterhouse, 1956; Zentmyer 1980). En V8- agar proliferó una abundante producción de clamidosporas (Zentmyer 1980). Las colonias desarrolladas en PARPH fueron blancas y el micelio presentó un crecimiento coraloide esto coincide con Almaraz y colaboradores (2013).



**Figura 7.-** A) raíz de planta de aguacate cv Hass con síntomas de *P. cinnamomi*, B) crecimiento camelioide de *P. cinnamomi* en medio de cultivo PDA, C) micelio toruloso de *P. cinnamomi* (a 40X), D) células hinchadas de *P. cinnamomi* (a 40X).

## 5.2 Progreso de la enfermedad (síntomas)

El experimento se llevó a cabo bajo una temperatura promedio de 19°C y 65 % de humedad relativa. La temperatura mínima fue 8.4 y la máxima 33.9 °C de acuerdo con el data logger HOBO ® U23-001. Al día 21 después de la inoculación, solo se observaron síntomas de flacidez y marchitamiento de hojas, muerte de raíces adventicias en plántulas inoculadas con *Phytophthora cinnamomi* que no fueron expuestas a ningún tratamiento (*Pc*=testigo positivo); estos síntomas coinciden con lo señalado por Zentmyer, 1980; Tamayo, 2007; Téliz y Mora, 2007; GIIIA, 2013; Mientras que las plántulas inoculadas con la mezcla de activadores, ASM en forma individual y el testigo absoluto (sin "hongo" y sin activadores) no mostraron síntomas.



**Figura 8.-** A) Plántula sin hongoni activadores, B) Plántula inoculada con *P. cinnamomi* (Testigo absoluto), C) Plántula asperjada con activadores en mezcla e inoculada con *P. cinnamomi*, D) Plántula asperjada con ASM e inoculada con *P. cinnamomi* en el día 21.

### 5.3 Polvo vegetal (“polvos de acetona”)

El polvo vegetal obtenido de cada muestra varió de 1.5- 3 g

### 5.4 Curva de ácido gálico

La ecuación bajo la curva fue  $y=0.1795x-0.118$ ,  $R^2= 0.9849$  donde se despejó “x” y se sustituyeron los valores de cada muestra (lecturas realizadas en espectrofotómetro a 760 nm).

### 5.5 Progreso de la enfermedad medido por la fotosíntesis neta

Durante las tres primeras lecturas no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, pero en la cuarta el T2 (A+Pc) fue diferente respecto a los demás seguido del T3 y el testigo absoluto mientras que el T1 (inoculado con *P. cinnamomi*) registró la menor fotosíntesis neta ( $p \leq 0.05$ ). Después de la aplicación de los activadores en mezcla y la aspersión individual del ASM (T2 y T3) se registró un incremento en FN a diferencia del T1 (inoculado con *P. cinnamomi*) que comenzó a disminuirla. Después de inocular *P. cinnamomi* (7 días) a los T2 y T3 la FN descendió un 38.9 y 44.27 % para el día 14, esto no coincidió con Benhamou y Bélanger (1998a) la cual señalaron que la manifestación de reacciones de defensa en plantas tratadas con acibensolar-S-metil ocurre con mayor magnitud después de la infección del patógeno (oomyceto). Sin embargo Patiño (2008) señaló que luego del tratamiento de inducción, usualmente ocurre un corto período de rezago antes de que se exprese la resistencia local o sistémica; es posible que en el T2 y T3 este periodo de atraso se diera en el día 14. A los 14 días el patógeno continuó disminuyendo la fotosíntesis neta del testigo positivo (Pc).

El pseudohongo manifestó su efecto negativo al disminuir significativamente la fotosíntesis neta (1.730) de las plántulas de aguacate a los 21 días de su inoculación (testigo positivo). Esto coincide con Agrios (2013) quien señaló que los fitopatógenos disminuyen la fotosíntesis neta, en particular en las últimas etapas cuando afectan los cloroplastos y ocasionan su degradación. Los patógenos inhiben directa o indirectamente la acción de algunas de las enzimas que intervienen

en el proceso fotosintético; en patógenos vasculares, los estomas permanecen parcialmente cerrados, el contenido de clorofila disminuye y la fotosíntesis se inhibe incluso antes del marchitamiento de las plantas.

Del día 14 al 21, los activadores de defensas aplicados en el T2 (activadores en mezcla + *Pc*) y el T3 (ASM+ *Pc*) confirieron protección a las plántulas contra el efecto de *P. cinnamomi* al recuperar la fotosíntesis neta a diferencia de las plántulas inoculadas inicialmente con *P. cinnamomi* (testigo positivo). La máxima fotosíntesis neta, significativamente mayor (9,930), se presentó en las plántulas protegidas con la mezcla de activadores a los 14 días (día 21) de su inoculación con *P. cinnamomi* (Cuadro 2). Jang y colaboradores (2006) mencionaron que la proteína de harpin mejora la fotosíntesis y la absorción de nutrientes en las plantas; de acuerdo a esto es posible que el T2 (activadores en mezcla+ *Pc*) haya alcanzado la mayor FN por el efecto de este activador y el sinergismo con los demás activadores (ASM y fosetil-Al). Durrant y Dong (2004) afirmaron que las rutas de señalización pueden interactuar de manera sinérgica o antagónica de acuerdo al tipo de interacción patogénica. Por ejemplo, la acumulación del ácido salicílico (AS) puede inhibir la síntesis del ácido jasmónico (JA) y viceversa (Kourneef y Pieterse, 2008). Daayf y colaboradores (1997) señalaron que el ASM actúa como sustituto del ácido salicílico (AS) y estimulan las respuestas de defensa de las plantas por la vía del AS. Mientras que la proteína de harpin activa el sistema de defensa de las plantas por la señalización del AJ y AS (Barón, 2001). De acuerdo con el análisis conjunto de la actividad del AS y AJ, Riveros (2001), señaló que no deben usarse ambos productos simultáneamente porque podría haber una reacción de bloqueo que inhibiría ciertas reacciones de defensa; esto, no coincidió con el T2 (activadores en mezcla+*Pc*) ya que a los 21 días mostró un efecto de sinergismo al ser el tratamiento con la mejor fotosíntesis neta. Esto coincide con Molinay y colaboradores (1998) ya que demostraron que la aplicación de BTH (ASM) en combinación con fosetil-Aluminio, metalaxil y hidróxido de cobre (Cu (OH)<sub>2</sub>) dio como resultado un efecto sinérgico sobre la resistencia a patógenos en plantas silvestres de *Arabidopsis*. Este sinergismo entre productos activadores se ha observado en otros trabajos por ejemplo: el ácido  $\beta$ -amino-butírico (BABA) es un activador de defensa de las plantas contra una amplia gama de patógenos (Jakab *et al.*, 2001; Cohen, 2002); en experimentos de campo sobre vides Chardonnay y Cabernet Sauvignon se demostró que la combinación de fosetil-Al+BABA mejoraron la actividad del fungicida folpet (N- (triclorometil) ftalamida) contra *Plasmopara viticola* con resultados similares a metalaxil-

Cu (Ridomil®-Cu) o dimetomorf + mancozeb (Reuveni *et al.*, 2001). Obradovic y colaboradores (2004) manifestaron el efecto sinergista entre ASM (=BTH), proteína de harpin y bacterifagos (Agriphage, OmniLytics, Inc., Salt Lake City, UT) contra la mancha bacteriana del tomate causada por *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; ambos activadores+bacteriófagos redujeron la enfermedad en comparación con el testigo positivo (hidróxido de cobre+mancozeb). ASM+bacteriófagos fue el tratamiento más eficaz, mientras que la proteína de harpin sola no redujo los síntomas, pero, cuando se combinó con los bacteriófagos, dio lugar a los más altos rendimientos de fruta. De acuerdo a esto, es posible que la proteína de harpin en algunas interacciones planta-patógeno funcione mejor en combinación con otros activadores de defensa.

Manzano y colaboradores (2010) señalaron que el ASM en plántulas de café confirió protección durante 60 días contra *Cercospora coffeicola*, mientras que la proteína de harpin protegió durante 30 días. Ali y colaboradores (2000) señalan que ASM en combinación con fosfonato de potasio redujeron la incidencia de *P. cinnamomi* en especies forestales (*Pinus radiata*, *Banksia integrifolia* e *Isopogon cuneatus*).

A los 21 días, el ASM mostró su efecto positivo al resultar con una fotosíntesis neta similar a las plántulas testigo, no inoculadas con *P. cinnamomi*. Esto coincide con Walters y colaboradores (2007) que afirmaron que el ASM ha demostrado un efecto positivo contra infecciones causadas por patógenos transmitidos por el suelo. Buzi *et al.*, 2004 demostraron que remojar semillas de melón en ASM proporcionó control eficaz contra *S. sclerotiorum* y *Didymella bryoniae*. En soya se encontraron reducciones (20-60%) de la enfermedad causada por el moho blanco (*S. sclerotiorum*) con cuatro aplicaciones en campo a una dosis de 375 mg/L (Dann *et al.*, 1998). La eficacia de este activador (ASM) se ha demostrado contra enfermedades vasculares (Walters *et al.*, 2007). Benhamou y Bélanger (1998b) demostraron que la aspersión de BTH (Benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester) (=ASM) brindó protección sistémica a tomates contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*; en las plantas tratadas con BTH el desarrollo del patógeno se restringió a la epidermis y la corteza exterior por lo tanto la entrada del hongo aparentemente se detuvo por la formación de aposiciones de pared constituido por callosa enriquecida. El BTH protegió a plantas de cacao cv. Theobahia contra la infección de *Verticillium dahliae* reduciendo la severidad en más de un 50 % y en la cv. Catongo redujo la incidencia (84.5 %) de escoba de bruja (*Crinipellis perniciososa*) (Resende *et al.*, 2002). La protección de ASM contra *P. cinnamomi* en aguacate se asemeja con los resultados obtenidos por

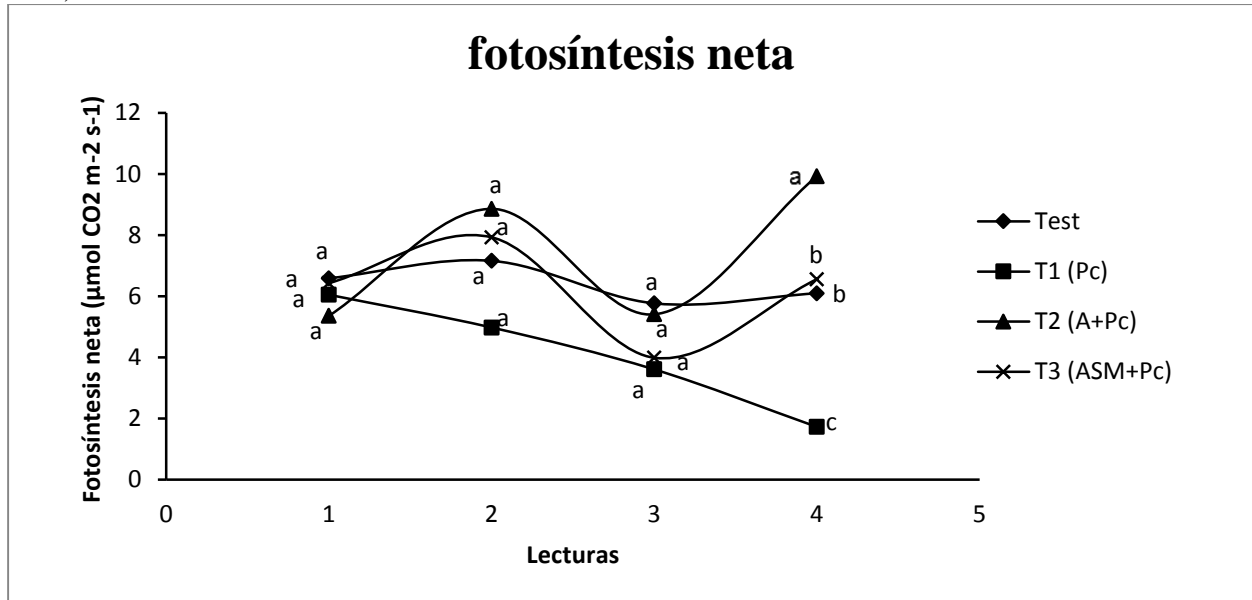
Zhu y colaboradores (2003) la cual señalaron que el BTH fue eficaz contra la pudrición de la raíz causado por *Phytophthora palmivora* en papaya; este ensayo se realizó en invernadero, donde se aplicó el BTH en “drench” y siete días después se inoculó el patógeno a las raíces; seis semanas después de la inoculación, el BTH a 5  $\mu\text{M}$  redujo el desarrollo de la enfermedad, mientras que las plántulas tratadas con 100 y 500  $\mu\text{M}$  no mostraron síntomas de la enfermedad.

En otros trabajos, el BTH redujo significativamente la pudrición de la raíz y el declive del melón causado por *Monosporascus cannonballus* (Aleandri *et al.*, 2010). La preocupación por la residualidad de plaguicidas en los alimentos ha generado restricciones en el uso de ciertas moléculas; debido a esto, existe la necesidad de encontrar métodos viables para reducir el uso de fungicidas. El Comité de Acción de Resistencia a los Fungicidas (FRAC) recomienda el uso de mezclas o alternancia de diferentes modos de acción (Reglinski *et al.*, 2007). Se sugirió como una estrategia anti-resistencia el uso de productos activadores de resistencia de la planta con fungicidas (Ortega *et al.*, 1998; Gullino *et al.*, 2000). Existen pocas moléculas químicas registradas para el aguacate que sean eficientes para el manejo de *P. cinnamomi*, ya que la presencia de residuos de plaguicidas representa una barrera no arancelaria para el comercio internacional de aguacate (APEAM, 2013). De acuerdo a la protección que confirieron los productos activadores de defensa a las plántulas de aguacate contra *P. cinnamomi* existe la posibilidad de integrar el uso de los activadores evaluados en el manejo integrado del cultivo y de la enfermedad; tomando en cuenta que este trabajo es pionero en el uso de SAR contra este patógeno en aguacate y se necesitaría futuras investigaciones en campo.

**Cuadro 2.-** Relación de la fotosíntesis neta con la inoculación inicial de *Phytophthora cinnamomi*; y la aplicación de activadores de defensa de la planta y la inoculación, siete días después, con *P. cinnamomi* en plantas de aguacate cv “Hass” a los 0, 7, 14 y 21 días después de la aplicación de los tratamientos.

Tratamientos	Día0	Día7	Fotosíntesis neta( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	
			Día14	Día21
Test	6.590a	7.160a	5.770a	6.100b <sup>z</sup>
T1( <i>Pc</i> )	6.050a	4.980a	3.610a	1.730c
T2(A+ <i>Pc</i> )	5.360a	8.860a	5.410a	9.930a
T3(ASM+ <i>Pc</i> )	6.430a	7.160a	3.990a	6.560b

Test: Testigo negativo (sin *P. cinnamomi* ni activadores), T1 (Pc): *P. cinnamomi* (Testigo positivo sin activadores), T2 (A+Pc): Activadores en mezcla + *P. cinnamomi*, T3 (ASM+Pc): Acibensolar-S-metil + *P. cinnamomi*. La concentración se expresó en ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) zMedias con distinta letra en una misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 9.-** Fotosíntesis neta y su relación con los tratamientos 1) Pc: *P. cinnamomi* (testigo positivo sin activadores); 2) A+Pc: Activadores en mezcla y *P. cinnamomi*; 3) ASM+Pc: Acibensolar-S-metil +*P. cinnamomi*; 4)Test: Testigo negativo (sin *P. cinnamomi* ni activadores). La concentración se expresó en ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

## 5.6 Fenoles totales (FEN).

Dai y colaboradores (1995) señalaron que los compuestos fenólicos, compuestos naturales en plantas sanas, aumentan su actividad tras la infección por un patógeno. *P. cinnamomi* en el tratamiento 1 (testigo positivo) incrementó los niveles de fenoles totales a los siete días después de la inoculación a las raíces de las plántulas (0.53024 mg. g<sup>-1</sup> p. f) esto coincidió con Cahill y colaboradores (1993) la cual indicaron que la presencia de *P. cinnamomi* en eucalipto incrementó los niveles de lignina y fenoles totales. La posible explicación a este incremento es, que las plantas trataron de contrarrestar la infección del patógeno estimulando metabolitos secundarios (fenoles). DeAscensao y Dubery (2003) señalaron que la acumulación rápida y temprana de estos compuestos es la característica de una defensa de base fenólica. Brune y van lelyveld (1982)

llevaron a cabo estudios sobre la composición bioquímica de las hojas de aguacate y su correlación con la susceptibilidad a la pudrición de la raíz causada por *P. cinnamomi*; llegaron a la conclusión que la mayoría de los fenoles detectados fueron ácidos fenólicos (C6-C1) y derivados del ácido cinámico (C6-C3). Existe la posibilidad de que las plantas de aguacate pudieran convertir fenoles específicos en cumarinas, a partir de los cuales pueden derivarse fitoalexinas. Del día 7 al 21 la concentración fenólica en T1 (*Pc*) disminuyó un 42.1%; finalizando con la menor cantidad de fenoles frente a los demás tratamientos ( $p \leq 0.05$ ). *P. cinnamomi* manifestó su efecto negativo al disminuir significativamente la actividad fenólica (0.30702c) de las plántulas de aguacate (T1) a los 21 días de su inoculación. Cornide y colaboradores (1994) señalaron que los patógenos pueden inducir alteraciones metabólicas como la síntesis de metabolitos secundarios (fenoles) y enzimas; la resistencia de este tipo ocurre cuando una o más de estas sustancias alcanzan una concentración suficiente para inhibir el avance de la infección (Goodman *et al.*, 1986). Es posible que las plantas inoculadas con el patógeno (testigo positivo) no sintetizaron la cantidad suficiente de metabolitos secundarios para contrarrestar la infección. De acuerdo con Macheix *et al.*, 1990; De Ascensao y Dubery, (2003) los patógenos generan sustancias que degradan fitoalexinas como respuesta a los mecanismos de defensa de las plantas. Las plantas han desarrollado una diversidad de mecanismos de defensa contra patógenos e insectos durante su evolución; aunque los patógenos también han co-evolucionado para ir superando estas barreras físicas y químicas (Riveros, 2001). Cabe la posibilidad que *P. cinnamomi* haya evadido las defensas de las plántulas de aguacate.

La máxima actividad fenólica, significativamente mayor (0.51690a), se presentó en las plántulas T2, protegidas con la mezcla de activadores a los 14 días (día 21) de su inoculación con *P. cinnamomi*. El ASM no estimuló la actividad fenólica, ya que fue similar (0.39047b) a las plántulas testigo, no inoculadas con *P. cinnamomi*. De acuerdo a la concentración del T2 (activadores en mezcla+*Pc*) (0.51690a) y del T1 (testigo positivo) (0.39047b) se puede deducir que la estimulación de los fenoles se dio por un sinergismo entre los productos activadores de defensa de las plantas a diferencia del efecto individual del ASM (T1); posiblemente el ASM basó la protección a las plántulas del T3 con la activación de otros compuestos, mecanismos, acciones o señales (peroxidases, quitinasas, lipoxigenasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas, ácido salicílico, fosfolipasas o proteínas PR) o que la combinación con proteína de harpin, fosetil-Al se refuerzó la activación de este metabolito secundario. Patiño (2008) señaló que la quitinasa es un marcador



útil para determinar SAR, ya que los niveles de esta enzima en los tejidos no inducidos son bajos. Por ejemplo, Yigit (2011) señaló que la aplicación de ASM a plántulas de lechuga infectadas con *Xanthomonas campestris* pv *vitians*, generó un incremento de quitinasas; las concentraciones máximas se registraron a los 6 y 8 días después de la aspersión. En pepino, ASM promovió la acumulación de quitinasas como una respuesta de resistencia contra *Cladosporium cucumerinum*; la SAR fue transferida de hojas tratadas a las hojas no tratadas (superiores e inferiores) (Narusaka et al., 1999). Brisset y colaboradores (2000) determinaron la SAR por medio de la determinación de  $\beta$  -1,3-glucanasas en plántulas de manzana (Golden delicious) la cual indicaron que el acibensolar-S-metil promovió la acumulación de  $\beta$  -1,3-glucanasas contra tizón de fuego, y se mantuvo al menos 17 días. ASM indujo la síntesis la resistencia sistémica adquirida en plantas como arabidopsis (Dietrich et al., 2005), coliflor (Ziadi et al., 2001), melón (Buzi et al., 2004), cacao (Resende et al., 2002), papa (Bokshi et al., 2003) y papaya (Zhu et al., 2003).

Otros productos se han evaluado contra la tristeza del aguacatero; como las aplicaciones de silicio que aumentaron la resistencia contra la infección de *P. cinnamomi* a través de un incremento de los niveles de fenoles totales en raíces (Bekker et al., 2007). El BTH asperjado a las hojas confirió resistencia sistémica a tomates contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* al incrementar la formación de aposiciones de callosa impidiendo la entrada del patógeno (Benhamou y Bélanger, 1998b). Andrade y colaboradores (2015) encontraron que en porta injertos de aguacate con síntomas de marchitez y asintomáticas, la formación de tilosas y la deposición de compuestos fenólicos contribuyeron a la defensa contra *P. cinnamomi*. Las selecciones de la raza Mexicana de Tepeyanco, Atlixco y Tepetl mostraron resistencia debido probablemente a que activaron sus mecanismos de defensa histológica estructural y química previo a la infección por *P. cinnamomi*. Los portainjertos de las plántulas utilizadas en este ensayo fueron de la raza Mexicana. La posible explicación de la protección a las plántulas de aguacate por el efecto individual del ASM es que se basara en otros mecanismos de defensa a diferencia de la mezcla de ASM, fosetil- Al y proteína de harpin. Bekker et al. (2007) encontraron en raíces de árboles de aguacate infectados con *P. cinnamomi* al ácido 3,4-hidroxibenzoico y el ácido vanílico, compuestos que al contacto con el patógeno funcionaron como barreras físicas y confirieron a la pared celular cierta resistencia a la penetración de *P. cinnamomi*. En pruebas *in vitro* se demostró que la presencia de polifenoles como el ácido cinámico, p- hidroxibenzoico, ácido vanílico y ácido salicílico tuvieron la capacidad de inhibir el

crecimiento de *P. capsici* (Candela *et al.*, 1995). Los compuestos fenólicos inhiben la producción de la cutinasa de los patógenos (Bostock *etal.*,1999). Esto sugiere que los fenoles inducen resistencia al suprimir la actividad de enzimas degradadoras de la pared celular producidas por los patógenos (Vidhyasekaran, 2008). Brune y van Lelyveld (1982) encontraron en hojas de aguacate cv. Hass compuestos ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido p-hidroxi-benzoico, ácido cafeico, aesculetin, ácido 3, 4- dihidroxi-benzoico y cinco compuestos no identificados; es posible que a partir de estos compuestos se deriven fitoalexinas que confieren protección a las plantas. Los activadores en mezcla que protegieron a las plántulas del T2, posiblemente estimularon estos metabolitos secundarios por medio de una resistencia sistémica. Sería conveniente realizar trabajos con técnicas de determinaciones más avanzadas como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para determinar fenoles específicos como el ácido ferúlico, ácido gálico y ácido clorogénico; ya que este trabajo se basó de manera general en fenoles totales.

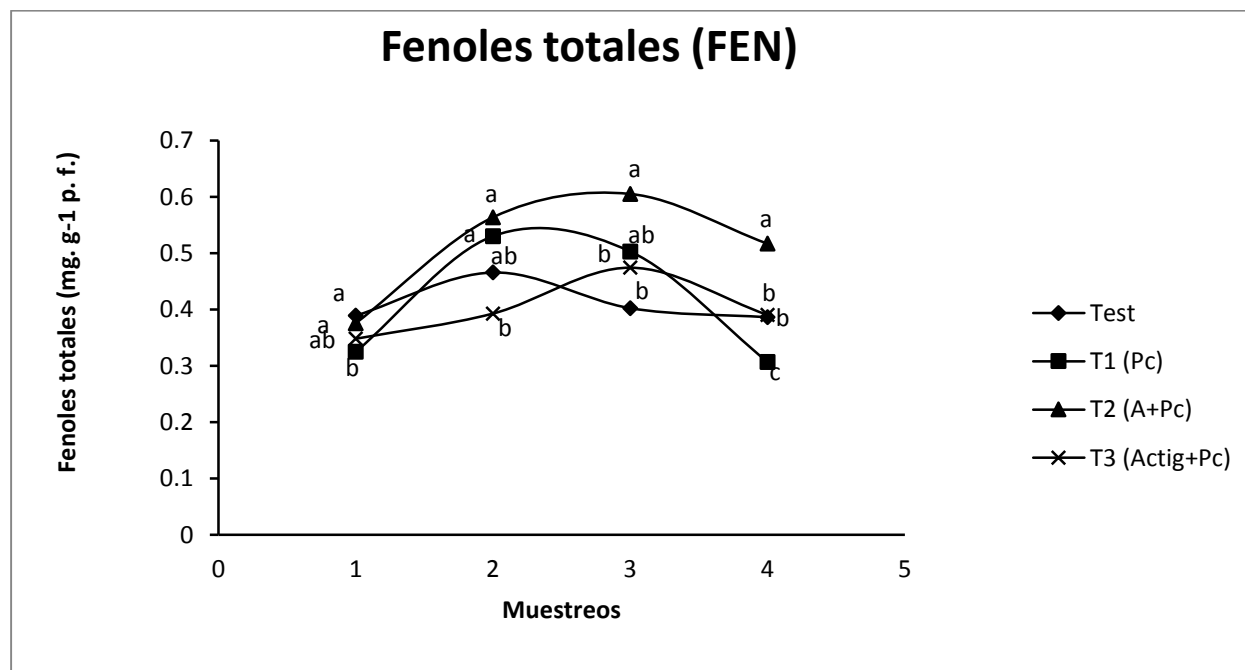
Por otra parte, la proteína de harpín indujo la respuesta hipersensible; en *Arabidopsis thaliana* promovió la SAR contra *Peronospora parasitica* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* por medio de la inducción de genes PR-1 y PR-2 (Dong *et al.*, . 1999). La proteína de harpin actúa como una señal molecular para la expresión de genes de defensa involucrados en diversas respuestas como: a) la codificación de fenilalanina amonio-liasa (PAL), la cual es una enzima clave para la biosíntesis de lignina, fenoles y ácido salicílico; b) para la codificación de glutation S-transferasa la cual protege contra el estrés oxidativo; c) y por último para la codificación de enzimas requeridas para la síntesis de fitoalexinas (Desikan *et al.*, 1998). Guest y Grant (1991) señalaron las características inusuales de los fosfonatos y una de ellas fue que mejora la actividad del sistema de defensa de las plantas. El fosetil-Al (10- 250 µg/mL) estimuló la formación de zonas necróticas de bloqueo en hojas de tomate contra *Phytophthora* spp. (Bompeix *etal.*,1980). El fosetyl-Al promovió en hojas de jitomate cambios citológicos contra *P. capsici*; estimuló una capa necrótica de bloqueo, depósitos internos de callosa y polifenoles (Durand y Salle, 1981). Estimuló la síntesis de etileno y de fenilalanina amonio liasa (PAL) y la acumulación de fitoalexinas en tabaco contra *Phytophthora nicotianae* var. *Nicotianae* (Nemestothy y Guest, 1990). Al inducir la PAL es posible que la proteína de harpin en mezcla con fosetil-Al y ASM hayan estimulado esta enzima vital para la formación de fitoalexinas y compuestos fenólicos.

**Cuadro 3.-** Comparación de la concentración de fenoles totales analizada en hojas de aguacate cv “Hass” como respuesta de protección con activadores de defensa a los 0, 7, 14 y 21 días de la inducción con los activadores de resistencia.

Tratamientos	Actividad de fenoles totales (mg. g-1 p. f.)			
	Día0	Día7	Día14	Día21
Test	0.38907 <sup>a</sup>	0.46566ab	0.40239b	0.38627b <sup>z</sup>
T1(Pc)	0.32477b	0.53024a	0.50302ab	0.30702c
T2 (A+ Pc)	0.37547 <sup>a</sup>	0.56372a	0.60519a	0.51690a
T3 (ASM+Pc)	0.34805ab	0.39282b	0.47426b	0.39047b

Test: Testigo negativo (sin *P. cinnamomi* ni activadores), T1 (Pc): *P. cinnamomi* (Testigo positivo sin activadores), T2 (A+Pc): Activadores en mezcla + *P. cinnamomi*, T3 (ASM+PC): Acibensolar-S-metil + *P. cinnamomi*.

La concentración se expresó en mg fenoles totales –1 peso fresco de tejido. zMedias con distinta letra en una misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 10.-** Presencia de fenoles totales y su relación con los tratamientos 1) Pc: *P. cinnamomi* (testigo positivo sin activadores); 2) A+Pc: Activadores en mezcla y *P. cinnamomi*; 3) ASM+Pc:

Acibensolar-S-metil +*P. cinnamomi*; 4)Test: Testigo negativo (sin *P. cinnamomi* ni activadores). La concentración se expresó en mg fenoles totales –1 peso fresco de tejido.

### **5.7 Peroxidasa (POX)**

Esta enzima esta presente en los tejidos de plantas, animales y microorganismos (Welinder *et al.*, (1991). En plantas son clasificadas como peroxidasa de clase III y son secretadas fuera de la célula o transportadas dentro de la vacuola (Hiraga *et al.*, 2001).

A los siete días todos los tratamientos alcanzaron la máxima actividad de peroxidasa; la infección con *P. cinnamomi* incrementó un 47 % en T1 (testigo positivo), esto coincide con Whetten *et al.*, (1998) la cual señalaron que las peroxidases en plantas, son inducidas por la infección de patógenos, lo que sugiere la importancia de esta enzima en el sistema de defensa de las plantas. Es posible que este incremento se diera en respuesta a la infección por este oomycete. Aunque *P. cinnamomi* repercutió de manera negativa al disminuirla actividad de la peroxidasa (28.902b) de las plántulas de aguacate (T1) a los 21 días de su inoculación. No hubo diferencia estadística, pero, si numérica entre las concentraciones del T1 (28.902b) y el testigo absoluto (40.058b); es probable que esa diferencia numérica de concentraciones sea significativa en la protección de la planta. La actividad de la peroxidasa estimulada en las plantulas a apartir de la infección de *P. cinnamomi* no logró protegerlas al final del experimento; posiblemente por la disminución a partir del segundo muestreo, ya que del día 7 al 21 disminuyó un 72.4 %. Van Lelyveld y Broderick (1975) reportaron la disminución de POX en hojas con síntomas tristeza y cuando los síntomas fueron avanzando, la actividad de POX fue disminuyendo. van Lelyveldy Bester (1978) señalaron que la actividad de la peroxidasa en hojas maduras y viejas de aguacate fue menor en comparación con las hojas de árboles sanos; ya que posiblemente *P. cinnamomi* indujo alguna sustancia que disminuyó la actividad de la peroxidasa. Esto coincide con el comportamiento de la actividad de la peroxidasa en las plántulas del T1, es posible que la infección en las raíces repercutiera en la disminución de esta enzima en las hojas. van Lelyveld y Broderick (1975) hicieron una comparación bioquímica de cinco cultivares y su posible asociación con la susceptibilidad a *P. cinnamomi*; el cultivar Fuerte tuvo la mayor actividad de peroxidasa seguido

de Hass, Edranol, Zutano y Duke. Los autores asocian la actividad enzimática de la peroxidasa con la posible resistencia a enfermedades del aguacate.

La mezcla de activadores protegió a las plántulas del T2 frente a la infección de *P. cinnamomi*, al finalizar con la máxima actividad de peroxidasa (68.985a). El efecto individual del ASM estimuló la actividad de la peroxidasa, ya que a los 21 días fue similar (62.814a) a las plántulas tratadas con la mezcla (T2) de activadores. La aplicación de ASM protegió a las plántulas T3.

Fosetil-Al, se degrada en la planta como ácido fosforoso ( $H_3PO_3$ ), es considerado como un activador de mecanismos de defensa contra enfermedades fungosas (Bompeix *et al.*, 1980; Trique *et al.* 1981; Vo- Thi- Han *et al.*, 1979). Fosetil-Al induce áreas de bloqueo (barreras) (Bompeix *et al.*, 1980); cambios citológicos, deposición de callosa, y polifenoles (Durand y Salle, 1981); la síntesis de etileno, la fenilalanina amonio liasa (PAL) (enzima importante para la síntesis de metabolitos secundarios) y fitoalexinas (Nemestothy y Guest, 1990). Por lo contrario, López y colaboradores (1994) determinaron que el fosetil-Al no aumentó los niveles de peroxidasa (*in vitro*) en células de vid.

Resende y colaboradores (2002) evaluaron ASM en cacao cv. Catongo y cv. Theobahia contra *Verticillium dahliae* y *Crinipellis pernicioso*; en la cv. Catongo, BTH (=ASM) indujo la mayor actividad de peroxidasa en hojas a los 15 días después de la elicitación, a los 30 días, la actividad de POX disminuyó significativamente. La actividad de POX fue mayor (con diferencia significativa) en las plantas tratadas con BTH que en las plantas testigo. En la cv. Theobahia la mayor actividad de POX se encontró en los tallos leñosos después de la aspersion de ASM y de la inoculación de *V. dahliae*. El testigo positivo (inoculado solo con *V. dahliae* y sin ASM) manifestó actividades intermedias de POX. Los autores concluyen que el BTH protegió a las plantas de cacao y que las respuestas de defensa por BTH dependieron del genotipo del hospedero. Brisset y colaboradores (2000) reportaron la actividad de peroxidasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas promovida por ASM contra *Erwinia amylovora* (tizón de fuego) en plántulas de manzana (Golden delicious). ASM tiene efecto positivo contra enfermedades transmitidas por el suelo, por ejemplo; Buzi *et al.*, (2004) afirmaron que el BTH proporcionó protección a semillas y plantulas de melon inoculadas con *S. sclerotiorum* y *Didymella bryoniae*. La aplicación de BTH fue a semillas, cinco días después de haber germinado las plántulas, la peroxidasa alcanzó su máxima actividad, seguido por una disminución pronunciada; también los niveles máximos de

quitinasa lo manifestaron las plántulas tratadas con BTH, alcanzando la máxima expresión a los 4 días. Los autores señalaron que la aplicación del BTH a semillas de melón puede activar en plántulas diversas rutas metabólicas que conducen a la mejora de la resistencia sistémica frente a diferentes patógenos. De acuerdo a Buzi y colaboradores (2004) y Resende et al.,(2002) la peroxidasa estimulada por ASM tuvo una máxima expresión y después descendió; en este ensayo, la máxima expresión de POX promovida por el efecto individual de ASM (T3) y en combinación con otros activadores (T2) fue a los siete días, posteriormente la actividad disminuyó en los tratamientos (T2 y T3) sin embargo, a los 21 días finalizan con concentraciones significativas respecto a las plantas inoculadas con *P. cinnamomi* sin activadores (T1) y es testigo sin “hongo” y sin activadores. Yigit (2011) señaló que el ASM fue efectivo en la reducción de la severidad de *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* en lechuga en comparación con el testigo absoluto y el tratamiento con hidróxido de cobre; ASM incrementó la actividad de la quitinasa en función de la disminución del crecimiento bacteriano en la planta. Bokshi y colaboradores (2003) evaluaron en invernadero y campo al ASM en el follaje de la papa contra *Erysiphe cichoracearum* y *Alternaria solani*; el ASM (50 mg ia/ L) controló a ambos patógenos inoculados bajo invernadero, y en campo solo redujo la severidad de *Alternaria solani*; el ASM aumentó la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa en hojas, tallos, tubérculos y estolones pero no en las raíces. La protección del ASM duró 45 días.

Otros trabajos han señalado la relación de ASM con la estimulación de proteínas PR; por ejemplo, esta relacionada con la activación de proteínas PR; Maxson-Stein y colaboradores (2002) evaluaron el ASM en manzana contra *Erwinia amylovora*; el ASM estimuló la expresión de genes putativos a SAR específicamente PR-1 y PR-8 RNA la cual se incrementaron 10 veces y PR-2 ARN que aumentó 100 veces en plántulas tratadas con ASM. Estos autores afirmaron que este activador no fue superior al control con estreptomomicina, sin embargo, sería una opción idónea para integrarlo en el manejo de la enfermedad. ASM activó la quitinasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y la PR2 y ligeramente la PR-1 y PR5 de plántulas de coliflor variedad Billabong contra el mildiu veloso (*Peronospora parasítica*) (Ziadi et al., 2001). La resistencia sistémica adquirida en papaya fue inducida por BTH, se manifestó por un aumento de la tolerancia a la infección por *Phytophthora palmivora*; el BTH estimuló las actividades de  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa, y la acumulación de un ARNm PR1, a los 14 días después de la inducción se incrementó la acumulación de PR-1d,

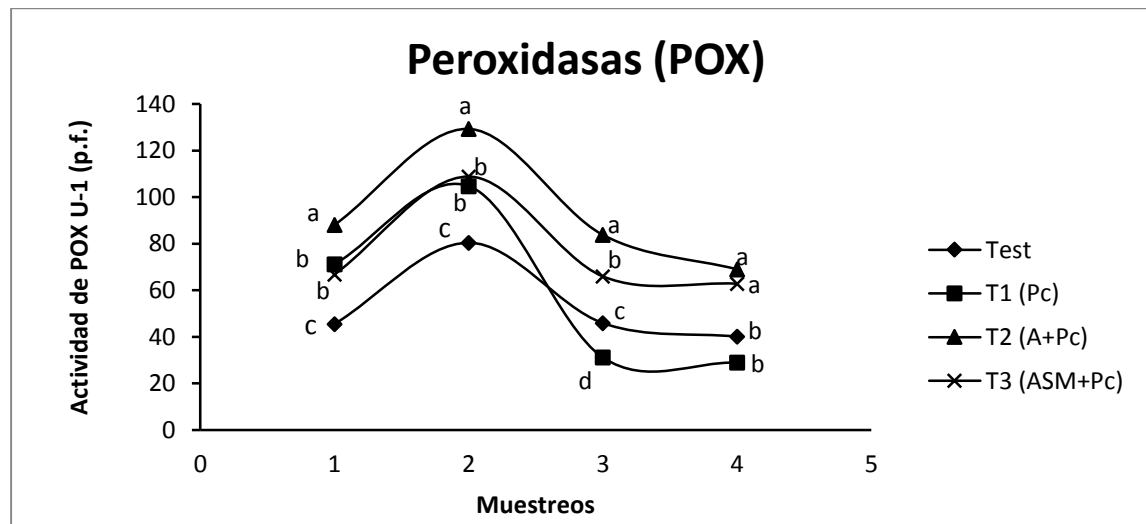
mientras que la quitinasa y la  $\beta$ -1,3-glucanasa alcanzaron su máxima actividad después 1-2 días, y a los 10 días volvieron a sus niveles iniciales (Zhu *et al.*, 2003).

**Cuadro 4.-** Comparación de la actividad de peroxidasa, determinada en hojas de aguacate cv Hass a los 0, 7, 14 y 21 días después de la inducción con los activadores de resistencia.

Tratamientos	Actividad de la peroxidasa U <sup>-1</sup> (p.f.)			
	Día0	Día7	Día14	Día21
Test	45.5c	80.404c	45.882c	40.058b <sup>z</sup>
T1(Pc)	71.146b	104.721b	31.109d	28.902b
T2 (A+ Pc)	88.081a	132.568a	83.772a	68.985a
T3 (ASM+Pc)	66.811b	108.832b	65.938b	62.814a

Test: Testigo negativo (sin *P. cinnamomi* ni activadores), T1 (Pc): *P. cinnamomi* (Testigo positivo sin activadores), T2 (A+Pc): Activadores en mezcla + *P. cinnamomi*, T3 (ASM+PC): Acibensolar-S-metil + *P. cinnamomi*.

U.g de peso fresco (U es la Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 mmol min<sup>-1</sup> de tetraguayacol). z Medias con distinta letra en una misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).



**Figura 11.-** Presencia de peroxidasas y su relación con los tratamientos 1) Pc: *P. cinnamomi* (testigo positivo sin activadores); 2) A+Pc: Activadores en mezcla y *P. cinnamomi*; 3) ASM+Pc: Acibensolar-S-metil + *P. cinnamomi*; 4) Test: Testigo negativo (sin *P. cinnamomi* ni activadores).

La expresión enzimática se cuantificó como U.g de peso fresco (U es la Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 mmol min<sup>-1</sup> de tetraguayacol).

## 5.8 Evaluación efectividad biológica

En la mayoría de los tratamientos, *P. cinnamomi* inició su crecimiento al tercer día después de la siembra a diferencia de los tratamientos con Garbus (1,10 y 100 ppm). Los tratamientos Mes1, Mes10 y Mes100 presentaron diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) respecto a los tratamientos del testigo positivo (concentraciones de Garbus). La proteína de harpin no presentó efecto inhibitorio sobre el patógeno. El crecimiento de *P. cinnamomi* fue algodonoso y abundante, el valor de las medias fue proporcional a la concentración aplicada. Estos resultados concuerdan con lo señalado por Barón, 2001; Jang *et al.* 2006 y EPA, 2014 la cual indican que tal molécula no tiene acción directa sobre patógenos; Manzano y colaboradores (2010) señalaron que este producto no inhibió el crecimiento micelial y la germinación de conidios *in vitro* de *Cercospora coffeicola*. La formulación utilizada en este ensayo fue Messenger STS constituida por 3% de proteína harpin más aminoácidos (PHC). La presencia de aminoácidos en la formulación posiblemente influyó en el crecimiento rápido y abundante del “hongo”. Fosetil- aluminio (Aliette) no presentó efecto fungistático sobre este patógeno. La concentración de 10 ppm presentó mayor crecimiento micelial respecto a 100 ppm. Estadísticamente no existe diferencia significativa entre las tres concentraciones de este producto y el testigo absoluto pero si con las concentraciones del Garbus (testigo positivo). Los resultados obtenidos para estos tratamientos coinciden con lo reportado por Thomidis y Michailidis (2002) la cual encontraron que el fosetil-Al tuvo una capacidad muy limitada para reducir el crecimiento de *P. cactorum* y *P.citrophthora* en medio agar. Farih y colaboradores en 1981 indicaron que fosetil-Al interviene en el crecimiento de *P. cinnamomi* a concentraciones de 1000 µg o más. En este ensayo la concentración más alta fue de 100 ppm posiblemente a concentraciones más altas haya un efecto sobre el crecimiento micelial de este oomycete. En 1984 Feen y Coffey demostraron que se requería menos de 200 µg/ mL de fosetil-Al para inhibir el crecimiento micelial en medio RMSM (pH6.1). Es posible que los resultados difieran al cambiar el medio de cultivo PDA por RMSM y el pH. El tratamiento con acibensolar-S- metil los resultados fueron semejantes a los demás activadores de resistencia, no existe efecto directo sobre el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*. Resultados similares



coinciden con lo reportado por (Manzano *en al* 2010) la cual señalaron que acibenzolar S-metil no presentó efecto *in vitro* sobre *Cercospora coffeicola*. Reglinski *et al.*, 2007 indicaron que esta molécula no tiene efecto directo sobre las plagas objetivo. Daayf *et al.*, 1998 afirmaron que esta molécula actúa como sustituto del ácido salicílico (AS). García y colaboradores (2010) comprobaron que el AS no tuvo efecto inhibitorio del micelio de *P. cinnamomi* en medio V8. Garbus (2-(tiocianometiltio) benzotiazol) inhibió el crecimiento miceliar. El efecto fungistático fue proporcional a las concentraciones utilizadas. La concentración de 100 ppm presentó la mayor inhibición miceliar seguida de 10 ppm y 1 ppm. Existen diferencias significativas entre las concentraciones. De acuerdo con la lista del APEAM (2013) este producto no está registrado para el cultivo de aguacate contra *P. cinnamomi*. Los resultados de este ensayo demuestran un prometedor potencial para registrarlo en el manejo integrado de esta enfermedad en campo.

**Cuadro 5.-** Comparación de medias del crecimiento de *P. cinnamomi* en los diferentes tratamientos a los 7 días después de la inoculación.

Tratamientos	Crecimiento promedio de <i>P. cinnamomi</i>	
	medias¶	
ASM1	3.18086bc <sup>z</sup>	
ASM10	3.07042c	
ASM100	3.21089abc	
Mes1	3.39782ab	
Mes10	3.41945a	
Mes100	3.42470a	
Fos1	3.39418ab	
Fos10	3.41092ab	
Fos100	3.19356abc	
Gar1	2.69512d	
Gar10	2.44550e	
Gar100	0f	
Test	3.13536c	

Mes1, 10, 100=Messenger (1, 100, 100 ppm.); Fos1, 10,100= Fosetyl-Al (100, 10, 1 ppm.); ASM1, 10, 100=Acibensolar- s metil (100, 10, 1 ppm), Gar1, 10, 100= Garbus (100, 10, 1 ppm)(testigo positivo con acción fungicida),Test= Testigo absoluto (solo PDA)

¶ El crecimiento de *P. cinnamomi* se transformó de cm a logaritmo natural

zMedias con distinta letra en una misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

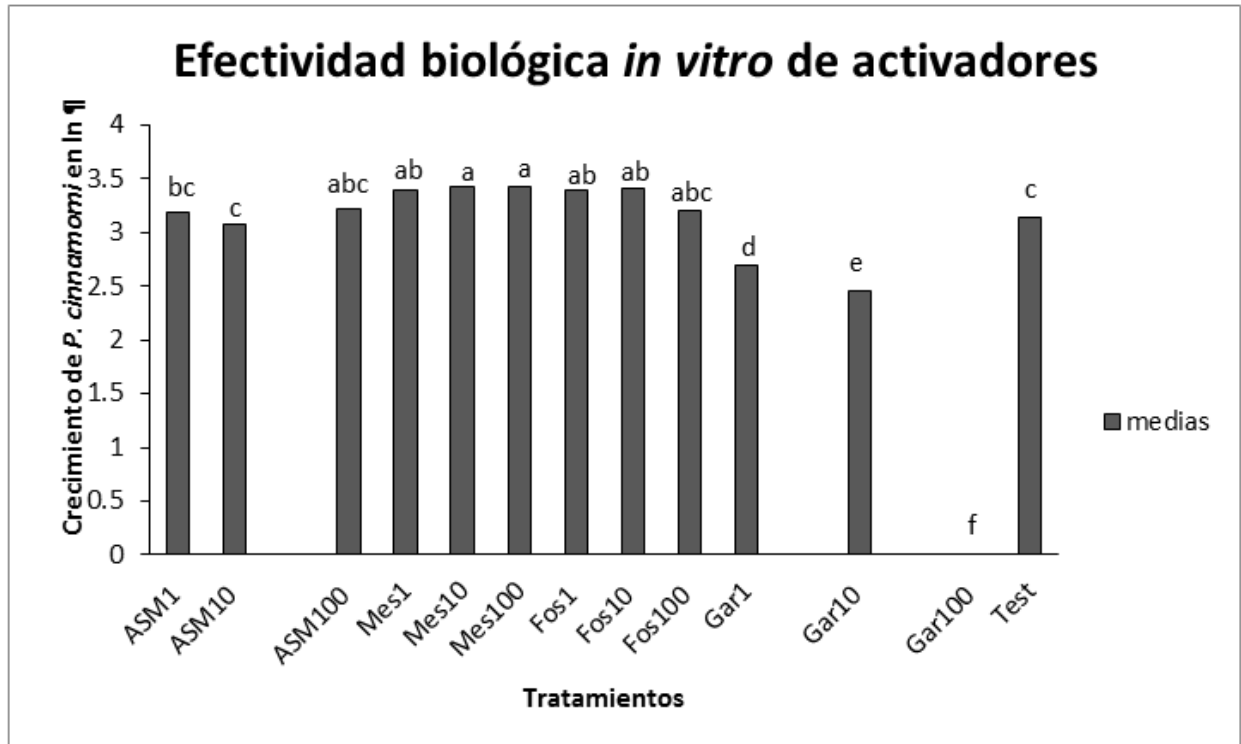


Figura 12.- Actividad biológica de Messenger (proteína de harpin), Actigar (acibensolar-s metil), Alette (foseyl-Al) y Garbus (2-(tiocianometiltio) benzotiazol) sobre el crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi* a 1, 10 y 100 ppm. Los tratamientos fueron: 1) ASM1 (1 ppm), 2) ASM10 (10 ppm), 3) ASM100 (100 ppm), 4) Mes1 (1 ppm), 5) Mes10 (10 ppm), 6) Mes100 (100 ppm), 7) Fos1 (1ppm), 8) Fos10 (10 ppm), 9) Fos100 (100 ppm), 10) Gar1 (1ppm), 11) Gar10 (10 ppm), 12) Gar100 (100 ppm) y Test (testigo absoluto, *P. cinnamomi* en PDA). El crecimiento de *P. cinnamomi* se transformó de cm a logaritmo naturalzMedias con distinta letra en una misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

## 5.9.- Consideraciones

En 1960, Ross demostró que las plantas de tabaco inoculadas con el virus causante del mosaico del tabaco (TMV) desarrollaron resistencia a una infección secundaria en tejidos distantes del punto de infección. Riveros (2001) señaló que las infecciones causadas por patógenos inician la transferencia de señalización a otras partes de las plantas, que son reforzadas con la aspersión de productos protectores o moléculas activadoras, logrando que los mecanismos bioquímicos de resistencia alcancen niveles similares a los que se dan en un tejido inducido biológicamente. En este ensayo se midieron las concentraciones de fenoles totales y la expresión de las peroxidasas a consecuencia de la infección de *P. cinnamomi* y el efecto de los inductores frente a la enfermedad. La determinación de fenoles y peroxidasas no se realizaron en raíces por el carácter destructivo de los muestreos hacia el sistema radicular de las plántulas, esto intervendría en la activación del mecanismo de defensa de las plántulas, por lo tanto, sería conveniente que en trabajos posteriores las determinaciones de los metabolitos secundarios y enzimas se midieran en raíces y hojas.

## 6.- CONCLUSIONES

- Las plantas tratadas con los productos activadores en mezcla finalizaron con la mayor fotosíntesis neta (9.930a (mg. g<sup>-1</sup> p. f)), actividad de peroxidasas (68.985a (U.g de peso fresco)) y la mayor concentración de fenoles totales (0.51690a) en respuesta de resistencia contra la infección de *P. cinnamomi*.
- La mezcla de activadores y el efecto individual de ASM protegieron a las plántulas de aguacate ya que no manifestaron síntomas de la enfermedad.
- Los inductores de resistencia respondieron positivamente frente a la infección de *P. cinnamomi*, la cual es una opción en el manejo integrado de esta enfermedad.
- Este trabajo aporta información valiosa para la realización de investigaciones futuras bajo condiciones no controladas (campo y viveros).
- Los activadores de resistencia no tuvieron efecto antimicrobiano *in vitro*.

## 7.- LITERATURA CITADA

- Agrios G.N. 2013. Fitopatología. 2ª. Editorial Limusa, México. 856 pp.
- Alia T. I., Martínez D. M. T., y Soto H. M. R. 2002. Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H. E. Moore & Stearn) durante poscosecha. Revista Chapingo. Serie Horticultura 8:263-271.
- Ali Z., Smith I. and Guest D. I. 2000. Combinations of potassium phosphonate and Bion (acibenzolar-S-methyl) reduce root infection and dieback of *Pinus radiata*, *Banksia integrifolia* and *Isopogon cuneatus* caused by *Phytophthora cinnamomi*. Australasian Plant Pathology 29: 59-63.
- Aleandri M. P., Reda R., Tagliavento V., Magro P. and Chilosi G. 2010. Effect of chemical resistance inducers on the control of *Monosporascus* root rot and vine decline of melon. Phytopathologia Mediterranea 49:18-26.
- Almaraz S. A., Alvarado R. D., Saavedra R. L. L. 2013. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de su esporulación. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestale y Ambiente 19: 5-12.
- Andrade H. P., Molina G. E., De León C., Espíndola B. M. C., Alvarado R. D. y López J. A. 2015. Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacateante *Phytophthora cinnamomi* Rands. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 6:347-360
- Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán (APEAM). 2013. Sistema Integral de Información de Cosecha [En línea]. Disponible en: <https://cosecha.apeamac.com/> (revisado el 24 de octubre de 2014).
- Apel K. and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55:373-399.
- Arcas M.C., Botia J.M., Ortuño A. M. and Del Rio J. A. 2000. UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of citrus aurantium fruits against *Penicillium digitatum*. European Journal of Plant Pathology 106:617-622.

- Bari R. and Jones J. D. G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular Biology* 69:473-488.
- Baker C. J., Orlandi E. W. and Mock N. M. 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiology* 102:1341-1344.
- Baron J. 2001. Estrategias de manejo de la resistencia. IR-4. Project Eden Bioscience, WA, USA.
- Beer S. V., Wei Z. M., Laby RJ, He S. Y., Bauer D. W., CollMER A., Zumoff C. (1992) Are Harpins Universal Elicitors of the Hypersensitive Response of Phytopathogenic Bacteria?. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* 2: 281-286.
- Baysal O., Laux P. and Zeller W. 2002. Further studies on the induced resistance (IR) effect of plant extract from *Hedera helix* against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Acta Horticulturae* 590: 273-277.
- Bekker T. F., Labuschagne N., Aveling T., Kaiser C. and Regnier, T. 2007. Accumulation of total phenolics due to silicon application in roots of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 30:53-64.
- Benhamou N. and Bélanger R. R. 1998a. Induction of systemic acquired resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *The Plant Journal* 14:13-21.
- Benhamou N. and Belanger R. R. 1998b. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiology* 118:1203-1212.
- Benezer B. M., Castro M. E. y García P. E. 2008. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de fitopatología* 26:56-61.
- Beer S. V., Wei Z. M., Laby R. J., He S.Y., Bauer D. W., CollMER A. and Zumoff C. 1992. Are harpins universal elicitors of the hypersensitive response of phytopathogenic bacteria?. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* 2: 281-286.

- Bernstein N., Zilberstaine M. and Meiri A. 1996. Inhibition of avocado root growth by CINa stress. *Phytoparasitica* 24:81-89.
- Blaine P. 2000. [En línea]. EPA approves use of Cornell-discovered protein that enables plants to resist disease and insect while enhancing growth. Disponible en: <http://www.news.cornell.edu/release/april00/fireblight.bpf.html>. Consulta realizada el 12 de noviembre de 2014.
- Bokshi A. I., Morris S. C. and Deverall B. J. 2003. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on  $\beta$ -1, 3-glucanase activity and disease resistance in potato. *Plant Pathology* 52:22-27.
- Bompeix, G., Ravisé, A., Raynal, G., Fettouche, F., and Durand, M. C. 1980. Modalités del obtention des necroses bloquantes sur feuilles détachées de tomate par l'action du tris-*O*-éthyl phosphonate d'aluminium (phoséthyl d'aluminium), hypothèses sur son mode d'action in vivo. *Annual Phytopalogy* 12:337-351.
- Bostock R. M., Wilcox S. M., Wang G. and Adaskaveg J. E. 1999. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiology Molecular Plant Pathology* 54:37-50.
- Bradley D. J., Kjellbom P and Lamb C. J. 1992. Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein-a novel, rapid defense response. *Cell* 70:21-30.
- Brisset M. N., Cesbron S., Thomson S. V and Paulin J. P. 2000. Acibensolar-S- methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106:529-536.
- Brune W., and van Lelyveld L. J. 1982. Biochemical comparison of leaves of five avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and its possible association with susceptibility to *Phytophthora cinnamomi* root rot. *Journal Phytopathology* 104:243-254.
- Buzi A., Chilosi G., De Sillo D. and Magro P. 2004. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-

- methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal of Phytopathology* 152:34-42.
- Cahill D. M., Bennett I. J. and McComb J. A. 1993. Mechanisms of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated *Eucalyptus marginata*. *Plant pathology* 42:865-872.
- Camarena G. G. and de la Torre A. R. 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual. *Revista Chapingo. Series Ciencias Forestales y del medio Ambiente* 12:25-30.
- Cameron H. R. and Milbrath G. M. 1965. Variability in genus *Phytophthora*. I. Effects of nitrogen sources and pH on growth. *Phytopathology* 55: 653-657.
- Candela M. E., Alcazar M. D., Espín A., Egea C. and Almela L. 1995. Soluble phenolic acids in *capsicum annum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44:116-123.
- Capdeville, G., Wilson, C. L., Beer, S. V. and Aist, J. R. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested “Red Delicious” apple fruit. *Phytopathology* 92:900-908.
- Chee K. H. and Newhook F. J. 1965. Variability in *Phytophthora cinnamomi* Rands. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 8: 96-103.
- Chen H., Morrell P.L., De La Cruz M. and Clegg M.T. 2008. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Heredity* 99:382-389.
- Chen Z., Zheng Z., Huang J., Lai Z., and Fan B. 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior* 4:493-496.
- Coffey M. 1991. Cause and diagnosis avocado root-rot. *California Grower* 15:17-23.
- Cohen Y., Gisi U. and Niderman T. 1993. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* 83: 1054-1062.
- Cohen Y. and Gisi U. 1994. Systemic translocation of C-14 DL-3- aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45:441-456.



- Cohen Y. R. 2002. s-Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease* 86:448-457.
- Cornide M., Lima T.H., y Surlí J. 1994. La Resistencia Genética de las Plantas Cultivadas. Ed. Científico- Técnica. La Habana, Cuba. 194 pp.
- Cortes R. M. A., Campos G. J., López G. R. y Salgado G. R. 2009. *Persea americana* var. *drymifolia* PR-5 gene, partial cds. GenBank: FJ840440.1
- Crandall B. S., Gravatt G. F. and Ryan M. M. 1945. Root diseases of *Castanea* species and some coniferous and broadleaf nursery stocks, caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 35:162-180.
- Crandall B. S. 1948. *Phytophthora cinnamomi* root rot of avocados under tropical conditions. *Phytopatology* 38:123-130.
- Cuartero J., Laterrot H. and Van Lenteren J. C. 2002. Host plant resistance to pathogens and arthropods pest. 124-138 pp. In: Albajes R., Gullino M. L., VanLenteren J. C. and Elad Y. K. (Eds.). *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Academic Publishers. 545 pp.
- Daayf F., Schmitt A. and Belanger R. R. 1997. Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalensis*. *Plant Physiology* 113:719-727.
- Dai G. H., Andary C., Mondolot C. L., Boubals D. 1995. Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *European Journal of Plant Pathology* 101: 541-547.
- Dann E., Diers B., Byrum J. and Hammerschmidt R. 1998. Effect of treating soybean with 2,6 dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies. *European Journal of Plant Pathology* 104:271-278.

- De ascensao A.R.F.D.C. and Dubery I. A. 2003. Soluble and wallbound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry* 63: 679-686.
- Delannoy E., Jalloul I. A., Assigbetsé K., Marmey P., Geiger J. P., Lherminier J., Daniel J. F., Martinez C., Nicole M. 2003. Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *molecular plant-microbe interactions* 16:1030-1038.
- Del Río J. A., Báidez A. G., Botía J. M. and Ortuño A. 2003. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp.. *Food Chemistry* 83:75-78.
- Desikan R., Reynolds A., Hancock J. T. and Neill S. J. 1998. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemistry Journal* 330:115-120.
- Díaz V. P., Rubio M., Mesonero V., Periago P. M., Ros A., Martínez G. P and Hernández, J. A. 2006. The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany* 57:3813-3824.
- Di Gaspero G. and Cipriani G. 2003. Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. *Molecular Genetic Genomics* 269:612-623.
- Dietrich R., Ploss K. and Heil M. 2005. Growth response and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. *Plant Cell and Environment* 28:211-222.
- Domergue F., Helms G.L., Prusky D. and Browse J. 2000. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry* 54:183-189.
- Dong H., Delaney T. P., Bauer D. W., Beer S. V. 1999. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *The Plant Journal* 20:207-215.

- Du Q., Zhu W., Zhao Z., Qian X., and Xu Y. 2012. Novel benzo-1,2,3-thiadiazole-7-carboxylate derivatives as plant activators and the development of their agricultural applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:346-353.
- Duniway J. M. 1983. Role of physical factors in the development of phytophthora diseases. 175-187 pp. In: Erwin D. C., García B. and Tsao P. H. (Eds.). *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 392 pp.
- Durand M. C. and Sallé G. 1981. Effet du tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium sur le couple *Lycopersicon esculentum* Mill. – *Phytophthora capsici* Leon. Etude cytologique et cytochimique. *Agronomie* 1:723-732.
- Durrant W. E. and Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology* 42:185-209.
- El-Hamalawi Z. A., Menge J. A. and Adams J.C. 1995. Methods of fosetyl-Al application and phosphorous level in avocado tissue needed to control stem canker caused by *Phytophthora citricola*. *PlantDisease* 79:770-778.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2014. Pesticides: Regulating pesticides Harpin Protein (006477) [En línea]. Disponible en:[http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet\\_006477.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006477.htm). (revisado el 26 de Septiembre de 2014).
- Erwin D. C. and Ribeiro O. K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press. St. Paul Minnesota. 562 pp.
- Farih A., Tsao P. H. and Menge J. A. 1981. Fungitoxic activity of fosetyl aluminium on growth, sporulation, and germination of *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora*. *Phytopathology* 71:934-936.
- Feen M. E. and Coffey M. D. 1984. Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* 74:606-611.

- Felix G., Regenass M. and Boller T. 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* 4:307-316.
- Felix G., Duran J. D., Volko S. and Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* 18:265-276.
- Friedrich L., Lawton K., Ruess W., Masner P., Specker N., Gut R. M., Meier B., Dincher S., Staub T., Uknes S., Métraux J. P., Kessmann H. and Ryals J. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal* 10:61-70.
- Fry S. C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review Plant Physiology* 37:165-186.
- García R. M. y Pérez L. R. 2003. Fitoalexinas:mecanismos de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 9:5-10.
- García P. E., Benezzer B. M., Gutiérrez S. A., Rangel S. G., Arreola C. A. and Castro M. E. 2010. Regulation of defence responses in avocado roots infected with *Phytophthora cinnamomi* (Rands). *Plant Soil* 331:45-56.
- Garcion C. y Métraux J. P. 2006. Salicylic acid. In *Plant Hormone Signaling*. 24: 229-255. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Glazebrook J. 2005. Constrating mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43:205-227.
- Goodman N. R., Kiraly Z and Wood K. R. 1986. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press, Columbia, U.S. A. 433 pp.
- Granado J., Felix G. and Boller T. 1995. Perception of fungal sterols in plants. *Plant Physiology* 107:485-490.
- Grove G. G and Boal R. J. 1991. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature apple and pear fruit by *Phytophthora cactorum*. *Phytopathology* 81:1465-1471.

- Grupo Interdisciplinario e Interinstitucional de Investigación en Aguacate. 2013. El aguacate en Michoacán plagas y enfermedades. APEAM. México. 56 pp.
- Guest D. I. and Grant B. R. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews* 66:159-187.
- Gullino M. L., Leroux P. and Smith C. M. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection* 19:1-11.
- Halliwell B., Zhao K., and Whiteman M. 1999. Nitric oxide and peroxynitrite: the ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radical Research* 31:651-669.
- Hammerschmidt R. 1999a. Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Annual Review of Phytopathology* 37:285-306.
- Hammerschmidt R. 1999b. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:77-84.
- Hardy G.E. St. J., Barret S. and Shearer B. L. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* 30:133-139.
- Harborne J.B. 1989. *Methods in Plant Biochemistry. Plant Phenolics* 1. 552 pp.
- Hardham R. A., Gubler F. J., Duniec J. and Elliott J. 1991. A review of methods for the production and use of monoclonal antibodies to study zoosporic plant pathogens. *Journal of Microscopy* 162:305-310.
- Hiraga S., Katsutomo S., Hiroyuki I., Yugo O. and Hirakazu M. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42: 462-468.
- Hubbes M. and Jeng R. S. 1981. Aggressiveness of *Ceratocystis ulmi* strains and induction of resistance in *Ulmus americana*. *European Journal of Forest Pathology* 11:257-264.
- Humphreys J. M. and Chapple C. 2002. Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology* 5:224-229.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2009. [En línea]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=9#C>. Revisado el 10 noviembre de 2014).
- Ishii H., Tomita Y., Horio T., Narusaka Y., Nishimura K. and Iwamoto S. 1999. Induced resistance of acibenzolar-Smethyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. *European Journal of Plant Pathology* 105:77-85.
- Jakab G., Cottier V., Toquin V., Rigoli G., Zimmerli L., Metraux J-P. and Mauch-Mani B. 2001.  $\beta$ -aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107:29-37.
- Jang Y. S., Sohn S. I. and Wang M. H. 2006. The hrpN gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta* 223:449-456.
- Johnson G. and Schaal L. A. 1952. Relation of chlorogenic acid to scab resistance in potatoes. *Science* 115: 627-629.
- Johnson L.B and Cunningham B. A. 1972. Peroxidase activity in healthy and leaf-rust-infected wheat leaves. *Phytochemistry* 11:547-551.
- Kellam M. K. and Coffey M. D. 1985. Quantitative comparison of the resistance to *Phytophthora* root rot in three avocado rootstocks. *Phytopathology* 75:230-234.
- Kessmann H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T., Herzog J., Ward E., Uknes S. and Ryals J. 1994. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Plant Pathology* 32: 439-459.
- Kliebenstein D. J. 2004. Secondary metabolites and plant/environmental interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environmental* 27: 675-684.
- Koomneef A. and Pieterse C. M. J. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146: 839-844.
- Kristensen B. K., Bloch H. and Rasmussen S.K. 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. *Plant Physiology* 120: 501-512.

- Kuc J. 1982. Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32: 854-860.
- Kurosaki F., Tashiro N. and Nishi A. 1986. Induction of chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls. *Plant Cell Physiology* 27: 1587-1591.
- Labanauskas C. K., Stoltzy L. H. and Zentmyer G. A. 1975. The effect of root infection by *Phytophthora cinnamomi* and soil oxygen concentrations on total amount of nutrients. *California Avocado Society Yearbook* 59:110-116.
- Lagrimini L. M. and Rothstein S. 1987. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* 84:438-442.
- Lavania M., Chauhan P. S., Chauhan S. V., Singh H. B and Nautiyal C. S. 2006. Induction of plant defence enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Current Microbiology* 52:363-368.
- Lawton K., Weymann K., Friedrich L., Vernooij B., Uknes S. and Ryals J. 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:863-870.
- Lee S. and LeTourneau D. J. 1958. Chlorogenic acid content and *Verticillium* wilt resistance of potatoes. *Phytopathology* 48:268-274.
- Loake G., and Grant M. 2007. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* 10:466-472.
- López S. M., Ferrer M. A., Calderon A. A., Muñoz R., Ros B. A. 1994. Aluminum-mediated fosetyl-Al effects on peroxidase secreted from grapevine cells. *Environmental and Experimental Botany* 34:329-336.
- Luhová L., Lebeda A., Hederová D., Pěc P. 2003. Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. *Plant Soil Environment* 49:151-157.

- Lyon G. D. and Newton A. C. 1999. Implementation of elicitor mediated induced resistance in agriculture. In: Agrawal A. A., Tuzun S. and Bent E. (eds.). *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores*. APS Press, St. Paul. 299-318 pp.
- Macheix J. J., Fleuriet A. and Billo J. 1990. *Fruit Phenolics*. CRC Press, Paris. 361 pp.
- Madrigal A., Ruess W. and Staehle- Csech U. 1998. CGA 245704, a new plant activator to improve natural resistance of banana against black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*). 266-274 pp. En: *Memorias XIII Reunión Internacional ACORBAT 1998*. Acorbat, Quito, Ecuador.
- Madriz O. K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* 63:22-32.
- Makandar R., Nalam V., Chaturvedi R., Jeannotte R., Sparks A. A., and Shah J. 2010. Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in Arabidopsis interaction with *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:861-870.
- Manzano G. D., Días G. S., Rodrigues A. P. F., Harakava R. 2010. Proteção do cafeeiro contra cercosporiose por acibenzolar-S-metil e proteína harpina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:686-692.
- Maxson-Stein K., He S.-Y., Hammerschmidt R. and Jones A. L. 2002. Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Disease* 86:785-790.
- Mauch-Mani B. and M.traux J. P. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82:535-540.
- Maurhofer M., Reimann C., Schmidli- Sacherer P., Heep S., Hass D., and Défago G. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in Tobacco Necrosis Virus. *Phytopathology* 88:678-684.
- Menge J. A. and Ploetz R. C. 2003. Diseases of Avocado. 35-71. In: Ploetz R. C (ed.). *Diseases of Tropical and Subtropical Fruit Crops*, CABI Publishing, Wallingford, Oxon. GBR. 527 pp.



- Menge J. A. 1999. Environmental factors and their relationship to avocado root rot. *Memorias Relatorias IV Congreso Mundial del Aguacate*. Uruapan, Michoacán, México.
- Metraux J. P., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W. and Inverardi B. 1990. Increases in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250:1004-1006.
- Métraux J-P. and Raskin I. 1993. Role of phenolics in plant disease resistance. In I Chet (ed.). *Biotechnology in Plant Disease Control*. Wiley-Liss, New York, 191-209 pp.
- Mert-Turk F. 2002. Phytoalexins: Defence or just a response to stress?. *Journal of Cell and Molecular Biology* 1:1-6.
- Milne D. L. and Chamberlain J. 1971. Experimental control of avocado *Phytophthora* root rot in South Africa. *California Avocado Society Yearbook* 55:144-147.
- Mircetich S. M., Zentmyer G. A. and Kendrick J. B. 1968. Physiology of germination of chlamydospores of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 58:666-671.
- Mličková K., Luhová L., Lebeda A., Mieslerová B., Pěc P. 2004. Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersicici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:753-761.
- Molina A., Michelle D., Hunt M. D. and Ryals J. A. 1998. Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. *The Plant Cell* 10:1903-1914.
- Morales G. L. 1983. Estudio sobre las principales enfermedades radicales que atacan al aguacatero (*Persea americana* Mill) en los municipios de San Juan Nuevo y Uruapan, Michoacan. Tesis de licenciatura. Facultad de Agrobiología "Pte Juarez". Uruapan. Michoacán.
- Narusaka Y., Narusaka M., Horio T and Ishii H. 1999. Comparison of local and systemic induction of acquired disease resistance in cucumber plants treated with benzothiadiazoles or salicylic acid. *Plant Cell Physiology* 40:388-395.

- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2014. [En línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=622258&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f>. (revisado el 14 de diciembre de 2014).
- Nemestothy G. N. and Guest D. I. 1990. Stimulation of phenylalanine ammonia lyase activity, ethylene biosynthesis and phytoalexin accumulation in tobacco infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* following treatment with fosetyl-Al. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37:207-219.
- Nicholson R. L. and Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30:369-389.
- Niemann G. J., van der Kerk A., Niessen M. A. and Versluis K. 1991. Free and cell wall-bound phenolics and other constituents from healthy and fungusinfected carnation (*Dianthus caryophyllus*L.) stems. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38:417-432.
- Nürnberg T. and Brunner F. 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology* 5:318-324.
- Obradovic A., Jones J. B., Momol M. T., Balogh B. and Olson S. M. 2004. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease* 88:736-740.
- Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B. and Staub T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107:19-28.
- Ortega F., Steiner U. and Dehne H. W. 1998. Induced resistance: A tool for fungicide resistance management. *Pesticide Science* 53:193-196.
- Passardi F., Cosio C., Penel C and Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. *Plant Cell Reports* 24: 255-265.
- Patiño L.F. 2002. Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre Sigatoka Negra en banano. p. 135-142. En: *Memorias XV Reunión Internacional ACORBAT 2002*. Cartagena de Indias, Colombia). Augura, Medellín.

- Patiño H. L. F. 2008. Resistencia inducida mediante sustancias químicas a enfermedades en plantas causadas por hongos. *Politécnica* 7:103-115.
- Patra H. K. and Mishra D. 1979. Pyrophosphatase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during leaf development and senescence. *Plant Physiology* 63:318-323.
- Paxton J. D. 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Journal of Phytopathology* 101:106-109.
- Pegg K. G., Whiley A. W., Langdon P. W., Saranah and J. B. 1987. Comparison of phosetyl-Al, phosphorous acid and metalaxyl for the long-term control of *Phytophthora* root rot of avocado. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 27:471-474.
- Peng M. and Kuc J. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82:696-699.
- Pérez J. R. M., Zea B. T. and López H. C. J. 2005. Avocado root rots in Andalusia: a review. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 28: 43-46.
- Pérez J. R. M. 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2:1-24.
- Phillips D. R. 1993. Pathological anatomy of root diseases caused by *Phytophthora* species. In: Biggs, A. R (Eds). *Handbook of Cytology, Histology, and Histochemistry of Fruit Tree Diseases*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 205-235 pp.
- Pieterse C. M. J. and van Loon L. C. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4:52-58.
- Prusky D., Keen N. T., Sims J. J. and Midland S. L. 1982. Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits. *Phytopathology* 72: 1578-1582.
- Prusky D., Keen N. T. and Eaks I. 1983. Further evidence for the involvement of a preformed antifungal compound in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Physiology Plant Pathology* 22: 189-198.

- Rands R. D. 1922. Streepkancker van kaneel, veroorzaakt door *Phytophthora cinnamomi* n. sp. Mededeelingen van het Instituut voor Plantenziekten 54:1.
- Raskin I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 43:439-463.
- Razem F. A. and Bernards M. A. 2003. Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH- dependent oxidase. *Journal of Experimental Botany* 384: 935-941.
- Reglinski T., Dann E. and Deverall B. 2007. Integration of induced resistance in crop production. 201-228 pp. In: Walters D., Newton A. and Lyon G. (eds.). *Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection*, Blackwell Publishing, Oxford, UK. 269 pp.
- Resende M. L.V., Nojosa G. B. A., Cavalcanti L.S., Aguilar M. A. G., Silva L. H. C. P., Perez J. O., Andrade G. C. G., Carvalho G. A and Castro R. M. 2002. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-*S*-methyl (ASM). *Plant Pathology* 51:621-628.
- Reuveni M., Zahavi T. and Cohen Y. 2001. Controlling downy mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with beta-aminobutyric acid (BABA). *Phytoparasitica* 29:125-133.
- Riveros A. A. S. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Manejo Integrado de Plagas* 61:4-11.
- Ross A. F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection of plants. *Virology* 14:340-358.
- Ruiz M. R., Xoconostle C.B., and Lucas W.J. 2001. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 202-209.
- Ryals J. A., Neuenschwander U. H., Willits M. G., Molina A., Steiner H-Y. and Hunt M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1809-1819.

- Sánchez R. C., García G. M. L., Pliego A. F. and Heredia A. 1993. Peroxidase activities and isoenzyme profiles associated with development of avocado (*Persea americana*, M.) leaves at different ontogenetic stages. *Journal of Plant Growth Regulation* 12:95-100.
- Sasaki K., Iwai T., Hiraga S., Kuroda K., Seo S., Mitsuhashi I., Miyasaka A., Iwano M., Ito H., Matsui H and Ohashi Y. 2004. Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. *Plant Cell Physiology* 45:1442-1452.
- Sasaki K., Yuichi O., Hiraga S., Gotoh Y., Seo S., Mitsuhashi I., Ito H., Matsui H and Ohashi Y. 2007. Characterization of two rice peroxidase promoters that respond to blast fungus infection. *Molecular Genetics Genomics* 278:709-722.
- Schwinn F. J. 1979. Control of phycomycetes: a changing scene. 791-802 pp. In: Proc. Br. Crop Protection. Conf., Pest and Diseases. 19-22 November 1979, Brighton, England. 891 pp.
- Sekizawa Y. and Mase S. 1981. Mode of controlling action of probenazole against rice blast disease with reference to the induced resistance mechanism in rice plant. *Journal of Pesticide Science* 6:91-94.
- Sharp J. K., Valent B. and Albersheim P. 1984. Purification and partial characterization of a  $\beta$ -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *Journal of Biological Chemistry* 259:11312-11320.
- Sels J., Mathys J., De Coninck B. M. A., Cammue B. P. and De Bolle M. F. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:941-950.
- Sirvasithamparan K. 1981. Some effects of extracts from tree barks and sawdust on *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Australasian Plant Pathology* 10: 18-20.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Anuario estadístico de la producción agrícola. SAGARPA [en línea]. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo>. (Revisado el 10 septiembre de 2014).

- Smillie R., Grant B. R. and Guest D. 1989. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology* 79:921-926.
- Sowka S., Hsieh L. S., Krebitz M., Akasawa A., Martin B. M., Starrett D., Peterbauer C. K., Scheiner O. and Breiteneder H. 1998. Identification and cloning of prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *The Journal of Biological Chemistry* 273:28091-28097.
- Soylu S., Baysal Ö., Soyly E. M. 2003. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science* 165:1069-1075.
- Staswick P. E., Lehman C. C. 2000. Jasmonic acid-signaled responses in plants. In: Agrawal A. A., Tuzun S. and Bent E. *Induced Plant Defenses against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture*, APS Press, St. Paul Minnesota. 390 pp.
- Sticher L., Mauch-Mani B. and Métraux J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology* 35:235-270.
- Tamayo P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica* 4:52-71.
- Téliz O. D. y García. E. R. 1982. Manejo integrado de la tristeza del aguacatero. X Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Fitopatología. Culiacan, Sinaloa. Resumen. 55p.
- Téliz O. D., Mora A. G. y Rodríguez P. 1989. Manejo integrado de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi*) del aguacate (*Persea americana*) en Atlixco, Pue. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7:225-239.
- Téliz O. D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Editorial Mundi-Prensa, 236 p.
- Téliz O. D. y Mora A. A. 2007. Enfermedades del aguacate. 170-208 p. In: Téliz O. D. y Mora A. J. A (eds.). *El Aguacate y su Manejo Integrado*. Segunda Edición. Mundi-Prensa, D.F., 321 pp.

- Téliz O. D. y Marroquín F. 2007. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. 1-28 p In: Téliz D. y A. Mora (eds.). El aguacate y su manejo integral parcial. Segunda Edición. Mundi-Prensa. México, D.F. 321 pp.
- Thomidis T. and Michailidis Z. 2002. Preliminary evaluation of nine fungicides for control of *Phytophthora cactorum* and *P. citrophthora* with crown rot in peach trees. *Phytoparasitica* 30:52-60.
- Trique B., Ravisé A. and Bompeix G. 1981. Modulation des infections à *Phytophthora* spp. Provoquées chez la tomate. *Agronomie* 1:823-324.
- Tognolli M., Penel, C., Greppin H. and Simon P. 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288:129-138.
- Turner J. G., Ellis C. and Devoto A. 2002. The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* 14: S153-S164.
- Tuzun S. 2006. Terminology related to induced systemic resistance: Incorrect use of synonyms may lead to a scientific dilemma by misleading interpretation of results. 1- 8 p. In: Tuzun S. and Bent E. (Eds.). *Multigenic and induced systemic resistance in plants*. Springer. USA. 139 pp.
- Vallad G E. and Goodman R. M. 2004. Systemic acquired resistance and induced resistance in conventional agricultura. *Crop Science* 44: 1920-1934.
- Van lelyveld L. J. and Brodrick H. T. 1975. Enzymic responses of avocado leaves to *Phytophthora* root rot. *Agroplanta* 7:13-16.
- Van Lelyveld L. J and Bester A. I. J. 1978. A *Phytophthora*-induced inhibitor of peroxidase activity in avocado leaves. *Journal of Phytopathology* 93:69-79.
- Van Loon L. C., Pierpoint W. S., Boller T. and Conejero V. 1994. Recommendations on naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:245-264.
- Van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology* 44: 135-162.

- Van Loon L.C and van Kammen A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun NN". Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.
- Van Loon L. C. and van Strien E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97.
- Verberne M. C., Verpoorte R., Bol J. F., Mercado-Blanco J. and Linthorst H. J. M. 2000. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology* 18: 779–783.
- Vidales F. J. A. 1999. Acción de solarización y de materia orgánica en el control de la tristeza (*Phytophthora cinnamomi* Rands.) del aguacate (*Persea americana* Mill cv Hass). *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 5: 225-259.
- Vidales F. J. A. 1996. Control de la tristeza *Phytophthora cinnamomi* del aguacatero (*Persea americana*) en la región de Uruapan, Michoacán. IV simposio La Investigación y el Desarrollo Tecnológico en Michoacán. Morelia, Mich. México.
- Vidhyasekaran P. 1997. *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops, Molecular Biology and Host Defence Mechanisms*. Marcel Dekker, Inc., New York, 223 pp.
- Vidhyasekaran P. 2008. *Fungal pathogenesis in plants and crops. Molecular Biology and host defense mechanisms*. Second Edition. CRC Press. 509 pp.
- Vlot A. C., Klessig D. F. and Park S. W. 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* 11: 436-442.
- Vlot A. C., Dempsey D. A. and Klessig D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Vo- Thi- Han, Bompeix G., and Revisé A. 1979. Rôle du tris-*O*-éthyl phosphonate d'aluminium dans la simulation des réactions de défense des tissus de tomate contre le *Phytophthora capsici*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series D* 288: 1171-1174.



- Walker J. C. and Stahmann M. A. 1955. Chemical nature of disease resistance in plants. *Annual Review Plant Physiology* 6:351-366.
- Walters D., Newton A. and Lyon G. 2007. Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. Eds: Dale Walters, Gary Lyon and Adrian Newton, pp. 243-250. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Ward E. R., Uknes S. J., Williams S. C., Dincher S. S., Wiederhold D. L., Alexander D. C., Ahl-Goy P, Métraux J. P. and Ryals J. A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3:1085-1094.
- Waterhouse G. M. 1956. The genus *Phytophthora*, diagnoses or description, and figures from the original papers. *Miscellaneous Publication* 12. Kew, Surrey. 120 pp.
- Waterman P. G. and Mole S. 1994. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 238 pp.
- Wehner F. C., Bester S. and Kotzé J. M. 1982. Sensitivity of fungal pathogens to chemical substances in avocado trees. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 5: 32-34.
- Welinder K. G. 1991. In *biochemical, Molecular and Physiological Aspect of plant peroxidases*. Lobarzewiski, J., Greppin, H., Penel, C. and Gasper, Th (Eds.). University of Geneva Switzerland. 3-13 pp.
- Welinder K. G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2:388-393.
- Whetten R. W., MacKay J. J., Sederoff R. R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 585-609.
- White R. F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-412.
- Wildermuth M. C., Dewdney J., Wu G. and Ausubel F.M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-571.

- Wilson C. L. and Wisniewski M. E. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review Phytopathology* 27: 425-441.
- Wolter K. E. and Gordon J. C. 1975. Peroxidases as indicators of growth and differentiation in aspen callus cultures. *Physiologia Plantarum* 33:219-223.
- Yigit F. 2011. Acibenzolar-S-methyl induces lettuce resistance against *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *African Journal of Biotechnology* 47: 9606-9612.
- Young S. A., Guo, A., Guikema J. A., White F. F. and Leach J. E. 1995. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Physiology* 107:1333-1341.
- Zaki A. L., Zentmyer G. A., Keen N. T. and Sims J. J. 1973. Isolation of an antifungal substance from *Persea borbonia*. *International Congress of Plant Pathology*, Abstract No. 0960.
- Zaki A. I., Zentmyer G. A., Pettus J., Sims J. J., Keen N. T. and Sing V. O. 1980. Borbonol from *Persea* spp-chemical properties and antifungal activity against *Phytophthora cinnamomi*. *Physiology Plant Pathology* 16:205-212.
- Zentmyer G. A. 1961. Resistance to *Phytophthora* root rot of avocado. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 5:85-89.
- Zentmyer G. A. 1980 *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. *Phytopathological Monograph* no. 10. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.96 pp.
- Zentmyer G. A. 1985. Origen and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. *California Avocado Society Yearbook* 69:89-94.
- Ziadi S., Barbedette S., Godard J. F., Monot C., Le Corre D. and Silué D. 2001. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)-downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology* 50:579-586.

Zhu Y. J., Xiaohui Qiu X., Moore P. H., Borth W., Hu J., Ferreira S. and Albert H. H. 2003.  
Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. *Physiological and Molecular Plant Pathology*63:237-248.