

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

M.A. JOSÉ EDUARDO CALZADA ROVIROSA
Secretario

LIC. JORGE ARMANDO NARVÁEZ NARVÁEZ
Subsecretario de Agricultura

M.C. MELY ROMERO CELIS
Subsecretario de Desarrollo Rural

M.C. RICARDO AGUILAR CASTILLO
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. LUIS FERNANDO FLORES LUI
Director General

DR. RAÚL G. OBANDO RODRÍGUEZ
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M. C. JORGE FAJARDO GUEL
Coordinador de Planeación y Desarrollo

MTRO. EDUARDO FRANCISCO BERTERAME BARQUÍN
Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL NORTE CENTRO

DR. HOMERO SALINAS GONZÁLEZ
Director Regional

DR. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ
Director de Investigación

ING. RICARDO CARRILLO MONSIVÁIS
Director de Administración

DR. FRANCISCO GPE. ECHAVARRÍA CHÁIREZ
Director de Coordinación y Vinculación en Zacatecas

**CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE LOS
FENILPROPANOIDES EN PLANTAS DE CHILE TIPO
MIRASOL INFECTADAS POR FITOPLASMA**

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina
Delegación Coyoacán
México, D.F.
C.P. 04010 México, D.F.
Teléfono (55) 3871-8700

ISBN: 978-607-37-0665-0

Primera Edición: Diciembre 2016

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia o por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito a la institución.

Cita correcta:

Herrera, M.D., Reveles-Torres, L.R. Velásquez-Valle, R. 2016. Cambios en el metabolismo de los fenilpropanoides en plantas de Chile tipo mirasol infectadas por fitoplasma. Folleto Técnico Núm 79. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 34 páginas.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 1 |
| Infección de fitoplasmas en Chile | 3 |
| Características de los fitoplasmas | 5 |
| Estrés biótico provocado por fitoplasmas... | 6 |
| Efecto de los fitoplasmas a nivel bioquímico | 7 |
| Vía de los fenilpropanoides..... | 10 |
| Ruta del ácido shikímico y síntesis de corismato..... | 12 |
| Procesos bioquímicos involucrados en la activación de la | 15 |
| Síntesis de compuestos fenólicos..... | 17 |
| Estudio exploratorio en tejido foliar..... | 18 |
| Resultados..... | 19 |
| Conclusiones..... | 28 |
| Literatura citada | 29 |

CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE LOS FENILPROPANOIDES EN PLANTAS DE CHILE TIPO MIRASOL INFECTADAS POR FITOPLASMA

*Mayra Denise Herrera¹
Luis Roberto Reveles Torres¹
Rodolfo Velásquez Valle¹*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades asociadas a la infección por fitoplasmas son importantes para diferentes cultivos de interés agrícola distribuidos a nivel mundial (Junqueira et al., 2004). En este sentido, es poco común encontrar estudios relacionados con los cambios bioquímicos causados por este tipo de microorganismos; sin embargo, algunos estudios han demostrado que la infección por fitoplasma puede modificar los niveles de algunos compuestos en diferentes tejidos de la planta, ya que exhiben una amplia variedad de síntomas en respuesta al ataque del patógeno, las cuales se manifiestan por modificaciones en la pared celular y la acumulación local de metabolitos secundarios como los polifenoles (Himeno et al., 2014; Musetti et al., 2000).

Estos metabolitos son producidos por las plantas como parte de un inmenso número de compuestos secundarios que interactúan con organismos benéficos o dañinos; estos componentes actúan

¹ Investigadores de los programas de “Frijol y Garbazo”, “Recursos Genéticos” y “Sanidad Forestal y Agrícola” del Campo Experimental Zacatecas.

principalmente como compuestos de señalización y fitoquímicos de defensa (Leiss et al., 2012). Sin embargo, Margaria y colaboradores (2014) mencionan que el fitoplasma se esparce a través de los tejidos de la planta infectada sin inducir una respuesta de resistencia efectiva. No obstante, dicha infección se asocia con alteraciones en algunos parámetros fisiológicos y rutas metabólicas, las cuales se ven modificadas por la incidencia del estrés biótico.

Bajo el contexto anterior, los metabolitos son los productos finales de la expresión génica, por lo tanto, se puede considerar que los cambios existentes en su perfil son una de las principales características en cuanto a la interacción de la planta con el patógeno y el medio ambiente, es decir, la descripción metabólica es una herramienta que ayuda a revelar la compleja naturaleza interactiva entre las redes metabólicas de la planta y sus respuestas a los factores ambientales como la incidencia de patógenos (Ying-Ping et al., 2014).

La diferenciación bioquímica que existe entre una planta infectada y una sana ocurre en diferentes niveles de sus procesos metabólicos. La vía biosintética de los fenilpropanoides es una de las más estudiadas y relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas ante una amplia

gama de factores de estrés, y es responsable de la síntesis de un gran número de compuestos fenólicos (Fan et al., 2015).

El cultivo de chile para secado en Zacatecas ocupa el primer lugar nacional debido a su superficie sembrada, con más de 30,040 hectáreas destinadas a este cultivo. Sin embargo, a lo largo del proceso de producción, se ve afectado por diversos microorganismos que provocan enfermedades y consecuentemente reducen la población de plantas, y por ende la productividad. Actualmente, existen pocos estudios que demuestren el efecto por estrés biótico ocasionado por fitoplasmas en chile sobre el metabolismo de las plantas. El objetivo de este folleto es divulgar los resultados de un primer ensayo de los diferentes cambios bioquímicos en el tejido foliar de plantas de chile tipo Mirasol infectadas por fitoplasmas con sintomatología de yema grande en tres etapas de la enfermedad: inicial, intermedia y avanzada.

INFECCIÓN DE FITOPLASMAS EN CHILE

El rendimiento y la calidad del chile dependen de varios factores, como el genotipo del cultivar y los factores abióticos y bióticos, por ejemplo, la sequía, el estrés osmótico, altas y bajas temperaturas, entre otros, y la presencia de plagas y enfermedades respectivamente (Brindis *et al.*, 2000; Pineda-

Pineda *et al.*, 2008). En el cultivo de chile se han reportado infecciones causadas por bacterias, virus y hongos que afectan la producción y reducen el rendimiento (Chiarappa y Gambogi, 1986).

Adicionalmente, se ha reportado la incidencia de infecciones causadas por organismos pleomórficos denominados fitoplasmas (Ertunc, 2013). Debido a que en la región Norte Centro de México, la información sobre sintomatología causada por la presencia de fitoplasmas es escasa, y aunque estimaciones precisas sobre pérdidas en rendimiento no están disponibles, está visto que este tipo de patógenos son capaces de causar pérdidas en el rendimiento (Velásquez-Valle *et al.*, 2013). Según Arredondo-Pérez y colaboradores (2013) algunos de los síntomas presentes en chile causados por fitoplasmas son el alargamiento y fusión de los sépalos en las flores o faroles chinos, follaje reducido amarillento o clorótico, y follaje compactado en la parte terminal o más joven de la planta, con producción de frutos de tamaño reducido y deformes y, por último, una proliferación excesiva de raíces.

Como los fitoplasmas habitan en las células cribosas del floema, su infección produce serias alteraciones a nivel bioquímico en la planta, como en el balance de fitohormonas y reguladores de crecimiento, provocando con ello diferentes sintomatologías.

Estos síntomas son causados por la acción de proteínas efectoras producidas por los fitoplasmas y modulan los procesos celulares en el desarrollo vegetal y probablemente también están involucrados en la defensa de la planta.

Bajo el contexto anterior, Choi et al; (2004) reveló que la presencia de fitoplasmas desencadena un aumento en la biosíntesis de fenilpropanoides; es decir, los cambios bioquímicos causados por la infección de estos patógenos causan una mayor concentración de compuestos fenólicos. A menudo se ha observado que ciertas sustancias fenólicas comunes son tóxicas a patógenos y se acumulan en las plantas después de la infección, especialmente en variedades resistentes (Schulz *et al.*, 2002).

CARACTERÍSTICAS DE LOS FITOPLASMAS

Los fitoplasmas son microorganismos a menudo descritos como organismos pleomórficos, los cuales se diferencian de las bacterias porque no tienen una pared celular verdadera, pero en su lugar disponen de una simple membrana la cual se describe como una cubierta. Estos no pueden ser cultivados en medios artificiales dado que no tienen la capacidad genética de sintetizar todos los nutrientes necesarios para su metabolismo, estos son específicos y los adquieren de células vegetales en

las que se hospedan. Su tamaño varía entre los 50 hasta los 1,000 nm, y su genoma va desde los 530 a 1,350 kb (es uno de los más pequeños organismos auto-replicables conocidos). El hábitat de los fitoplasmas es intracelular por lo que en las plantas se localizan en los tubos cribosos del floema colonizando lentamente las plantas, su propagación es por fisión binaria, fragmentación o gemación (Reveles-Torres et al., 2014). Debido a que los fitoplasmas no pueden ser cultivados *in vitro* estos se clasifican con el género de *Candidatus* (Firrao et al., 2004). Se han identificado 29 especies dentro de este género (Dubuk et al., 2011), ya que comparten un 97.5% de la identidad de la secuencia del gen 16SRNA_r (Wei et al., 2007).

ESTRÉS BIÓTICO PROVOCADO POR FITOPLASMAS

El estrés biótico es causado por la acción de seres vivos: animales, plantas (por competencia alelopática), microorganismos, (bacterias, hongos), y otros agentes fitopatógenos como virus y fitoplasmas, por lo que es usualmente definido como un factor externo que ejerce una alteración en la homeostasis de la planta, dando lugar a una serie de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particularmente diferente de un organismo, en comparación al observado bajo condiciones óptimas (Benavides, 2002; Peters et al., 1968; Suzuki et al., 2006).

Ante la presencia de un factor biótico durante el crecimiento y desarrollo de la planta, la resistencia a enfermedades es una de las adaptaciones más importantes y complejas, la cual involucra la generación de barreras físicas, químicas y metabólicas para contrarrestar las infecciones. Los mecanismos de defensa de la planta proveen la resistencia contra patógenos. Estos mecanismos pueden ser del tipo bioquímico y molecular, por ejemplo, la acumulación de sustancias tóxicas para los patógenos y los cambios en las condiciones de las plantas (Ordeñana, 2002). Es decir, la resistencia inducida en las plantas es un mecanismo activo de defensa el cual se activa solamente como una reacción al ataque de un patógeno y que involucra cambios en su metabolismo provocado por la expresión de genes (Ordeñana, 2002).

EFFECTO DE LOS FITOPLASMAS A NIVEL BIOQUÍMICO

La infección por fitoplasmas produce profundos disturbios en el balance de fitohormonas y en reguladores de crecimiento, provocando diferente sintomatología. Estos síntomas reflejan la acción de proteínas efectoras producidas por los fitoplasmas que modulan los procesos celulares en el desarrollo vegetal y probablemente también están involucrados en la defensa de la planta (Hogenhout y Loria, 2008).

Los cambios en la translocación de fotosintatos, junto con otras funciones fisiológicas con discapacidad, incluyendo la fotosíntesis reducida, la conductancia estomática, la respiración, la alteración del metabolismo secundario y el equilibrio hormonal vegetal perturbado, son posiblemente mediados por la disfunción de fitoplasmas en el floema de las plantas, lo que podría ser responsable de los síntomas exhibidos por las plantas infectadas (Choi et al., 2004; Taiz et al., 2006).

Por otro lado, ciertas investigaciones han acrecentado el conocimiento de los efectos de infección por fitoplasmas en metabolitos secundarios, principalmente en plantas herbáceas huéspedes (Choi et al., 2004; Musetti *et al.*, 2000), pero la literatura disponible es todavía escasa en cuanto a la fisiología de las infecciones por fitoplasmas en cultivos frutales (Bertamini et al., 2002; Lepka et al., 1999; Musetti *et al.*, 2004; Musetti *et al.*, 2005). La infección de estos microorganismos puede conducir a la producción de proteínas de defensa, aumentar los compuestos fenólicos y la participación de moléculas de señalización importantes, tales como Ca_2 , H_2O y ácido salicílico (Musetti et al., 2005; Musetti y Favali, 2003).

Pertot *et al.*, (1998) reportaron que *C. Roseus* micropropagada con fitoplasmas, elevó el nivel de ácido indol-3-acético (IAA), cuya concentración aumentó diez veces en comparación con las

plantas control. La adición exógena de la IAA u otras sustancias como la auxina a plantas sanas no indujo síntomas similares a los causados por la infección de fitoplasmas, por lo que el efecto podría ser atribuido a estos patógenos. Lo anterior apoya la hipótesis de que el aumento de los tejidos infectados por fitoplasmas podría ser no específica a las respuestas secundarias ante una condición de estrés. Por otro lado, Kesumawati *et al.*, (2006) informó sobre el papel de las citocinas en el desarrollo de síntomas en *Hydrangea macrophylla* por efecto de fitoplasmas; los autores encontraron que el desarrollo de flores verdes se correlaciona con la acumulación de altos niveles de citocinas en las partes florales (Davey *et al.*, 1981).

Según Avalos *et al.*, (2011) los productos naturales de mayor síntesis por efecto de fitoplasmas se agrupan en cuatro grupos principales.

- 1.-Terpenos (hormonas, pigmentos o aceites esenciales).
- 2.-Compuestos fenólicos (Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos).
- 3.-Glicósidos (Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos).

4.- Alcaloides (Brassicasterol, fucosterol, campesterol, estigmasterol, entre otros).

VÍA DE LOS FENILPROPANOIDES

La vía de los fenilpropanoides es precursora de muchos metabolitos en las plantas ya que, por medio de esta, se realiza la biosíntesis de fitoquímicos a partir de la estructura de carbono de la fenilalanina. Los fenilpropanoides juegan un papel muy importante en la habilidad que tienen las plantas para contrarrestar el ataque de patógenos, entre estos se incluye de manera general a las ligninas y compuestos fenólicos como los flavonoides, los cuales toman parte en alguna de las múltiples rutas precedidas por esta vía (Dixon et al., 2002; Vogt, 2010).

Este tipo de compuestos son comúnmente conocidos como “metabolitos secundarios” debido a que aparentemente no están involucrados en procesos celulares basales como la biosíntesis, respiración o síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, procesos que son del dominio de los llamados “metabolitos primarios”. Como resultado, los metabolitos secundarios parecen ser prescindibles para la supervivencia inmediata del organismo, pero están presentes ante condiciones de estrés (Fraser et al., 2011).

El metabolismo de los fenilpropanoides es un paso transitorio entre el metabolismo primario y el secundario en las plantas (Figura 1).

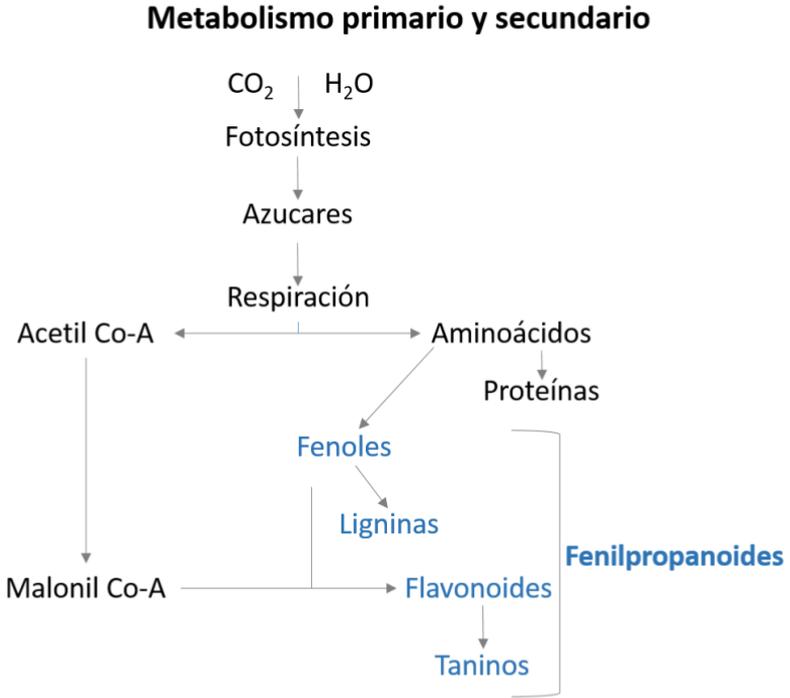


Figura 1. Relación generalizada entre el metabolismo primario y secundario. Procesos secundarios resaltados en color azul.

A pesar de que es una fuente de muchas moléculas cuyas funciones son relativamente poco estudiadas y entendidas, otros productos de la vía de los fenilpropanoides son de obvia importancia para las plantas. Específicamente, esta vía es

indispensable debido a la producción de los alcoholes hidroxicinámicos, precursores a su vez de otros compuestos fenólicos (Boerjan et al., 2003; Fraser et al., 2011).

La vía de los fenilpropanoides comienza con la desaminación del aminoácido fenilalanina hacia el ácido trans-cinámico, reacción catalizada por la fenilalanina amonoliasa. Sin embargo, es la ruta del ácido Shikímico o Shikimato por medio de la cual se lleva a cabo la síntesis de la fenilalanina (Tzin et al., 2010).

RUTA DEL ÁCIDO SHIKIMICO Y SÍNTESIS DE CORISMATO

Las siete reacciones enzimáticas de la ruta del ácido shikimico son responsables de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en las plantas y comienza con la interacción de productos del metabolismo primario: eritrosa 4-fosfato y fosfoenolpiruvato, procedentes de la vía de las pentosas y glucólisis, respectivamente (Figura 2) (Tolalpa et al., 2011).

Se ha demostrado que esta vía se lleva a cabo en bacterias, hongos, algunos protistas y plantas, pero está ausente en el reino animal, por lo que algunos productos derivados de esta vía son nutrientes esenciales en la dieta del ser humano. Por otro lado, algunos de los derivados de esta ruta biosintética tienen actividad farmacológica y biológica, por lo que son ampliamente

utilizados en la medicina y nutrición humana (Maeda et al., 2012).



Figura 2. Síntesis de fosfoenolpiruvato y eritrosa 4-fosfato.

A partir de la eritrosa 4-fosfato y del fosfoenolpiruvato se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis del ácido shikímico o shikimato que actúa como precursor del corismato (Figura 3). A su vez, el corismato es un metabolito central en la síntesis de productos primarios y es el sustrato de dos enzimas (Antralinato sintasa y Corismato mutasa) que actúan para definir

diferentes rutas específicas terminales que conducen a la formación de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, triptófano y tirosina (Figura 4) (Tzin et al., 2010).

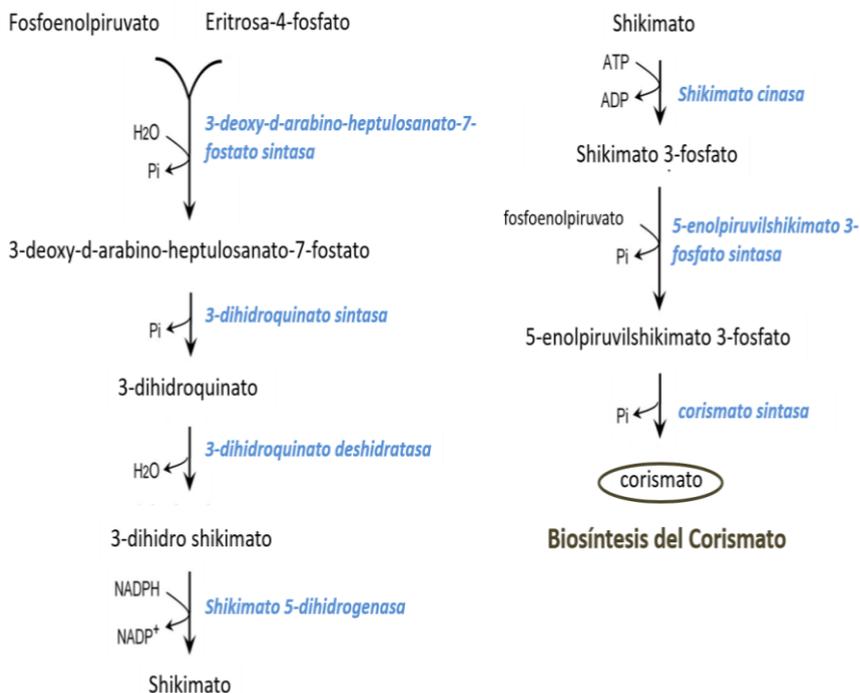


Figura 3. Ruta del shikimato o ácido shikimico y síntesis del corismato.

La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. La fenilalanina y el triptófano se encuentran entre los aminoácidos esenciales para los animales, y es necesario que se incorporen en la dieta. La tirosina no es esencial en el

sentido de que los animales pueden sintetizarla por hidroxilación de la fenilalanina (Herrmann 1995).

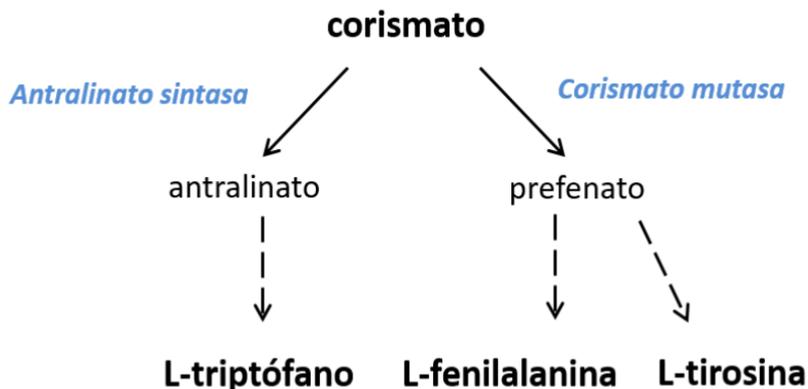


Figura 4. Corismato como sustrato para la síntesis de aminoácidos aromáticos.

Una vez que se ha sintetizado la fenilalanina en las plantas, la activación de la fenilalanina amonoliasa (PAL, por sus siglas en inglés) es el primer paso en el metabolismo de los fenilpropanoides, es decir, la activación de esta enzima desencadena la producción de compuestos fenólicos, como flavonoides, antocianinas y taninos entre otros, por medio de diferentes rutas biosintéticas.

PROCESOS BIOQUÍMICOS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN DE LA PAL

La PAL es una enzima del metabolismo secundario de las plantas, estudiada desde hace aproximadamente 50 años.

Según Camm et al. (1973) esta enzima fue ganado creciente atención debido a que, en diferentes tejidos, los niveles de PAL pueden fluctuar significativamente en intervalos de tiempo relativamente cortos por respuesta a una gran variedad de estímulos. También, debido a que el ácido cinámico (uno de los productos de la reacción de la PAL) es el precursor de una larga variedad de constituyentes secundarios.

La estructura de carbonos desaminada por acción de la PAL puede alcanzar una amplia variedad de rutas metabólicas, entre las que destaca la síntesis de compuestos fenólicos. Sin embargo, el tipo de productos sintetizados es ampliamente dependientes del tipo y estado de desarrollo de los tejidos vegetales, y el estímulo provisto por el medio ambiente. Por lo tanto, para explicar la magnitud y tiempo de activación de la PAL, debe existir cambios en el número de moléculas enzimáticas catalíticamente competentes, por encima de grandes variaciones en la eficiencia catalítica de una cantidad fija de PAL activadas. Adicionalmente, la producción de moléculas activas de PAL requiere de la transcripción y translocación del gen de la PAL (Hugh, 1984).

Por otro lado, Fraser et al. (2011) mencionan que en estudios sobre la expresión del gen que codifica la activación de la PAL y sus isoformas, se ha encontrado que la isoforma *PAL3* se

expresa únicamente en tallos a un nivel basal, mientras que *PAL1*, *PAL2* y *PAL4* se expresan en cantidades relativamente grandes en hojas y tallos durante etapas tardías de desarrollo; con la expresión de *PAL1* localizada en tejido vascular y *PAL2* y *PAL4* en semillas.

SÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Se ha mencionado que la defensa bioquímica representa una respuesta muy importante del sistema inmune de las plantas, sin embargo, la correlación negativa entre las concentraciones de metabolitos secundarios y la tasa de crecimiento de las plantas indica un equilibrio entre el crecimiento de las plantas y la producción de compuestos de defensa como los fenólicos; es decir, las plantas tienen recursos limitados para apoyar sus procesos fisiológicos, por lo tanto, no se pueden satisfacer todos los requisitos simultáneamente y se desvía más carbono del crecimiento hacia el metabolismo secundario cuando el crecimiento de la planta está restringido por cualquier factor fisiológico y/o ecológico (Latanzzio, 2013).

La figura 5 muestra un esquema general de la síntesis de los compuestos fenólicos, proceso que se lleva a cabo cuando las plantas censan la presencia de un agente causante de estrés. A partir del 4-cumaril CoA se obtienen las chalconas. Estos

procesos metabólicos llevan a la producción de diferentes grupos de compuestos fenólicos en diferentes tejidos vegetales.

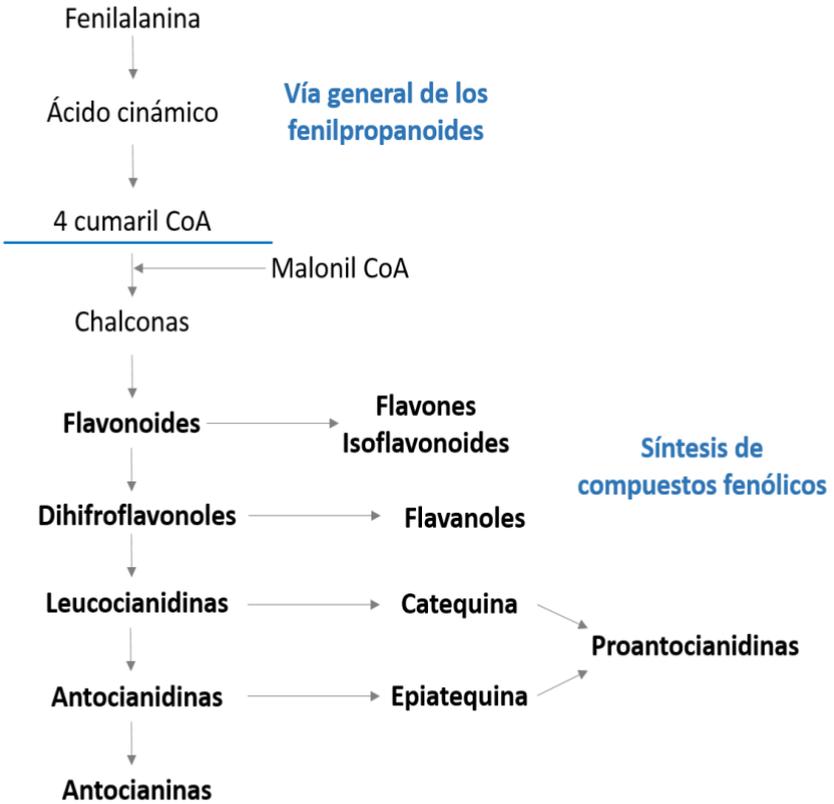


Figura 5. Síntesis de compuestos fenólicos.

ESTUDIO EXPLORATORIO EN TEJIDO FOLIAR

Debido a la importancia que tiene el cultivo de chile para secado en el estado de Zacatecas, resulta interesante conocer algunos cambios bioquímicos en chile Mirasol infectado con fitoplasma, específicamente la síntesis de algunos productos del metabolismo secundario. Para ello se colectó tejido foliar de plantas de chile de la variedad Mirasol en tres etapas de la infección por “yema grande”: inicial, intermedia y avanzada, contrastándolas con plantas sanas o libres de la infección por fitoplasmas. Se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos (fenoles totales, flavonoides, taninos condensados y antocianinas).

RESULTADOS

En este estudio, la síntesis de fenilpropanoides, como los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas totales, se incrementó en tejido foliar recolectado a partir de plantas de chile de la variedad Mirasol con síntomas de infección por fitoplasmas.

Se ha reportado que los fenilpropanoides juegan un papel muy importante en la habilidad que tienen las plantas para contrarrestar el ataque de patógenos, entre estos se incluye de manera general a los compuestos fenólicos como los

flavonoides, los cuales toman parte en alguna de las múltiples rutas precedidas por esta vía (Dixon et al., 2002). En este sentido, Vogt (2010) menciona que la vía de los fenilpropanoides es precursora de muchos metabolitos en las plantas ya que, por medio de esta, se realiza la biosíntesis de fitoquímicos a partir de la estructura de carbono de la fenilalanina.

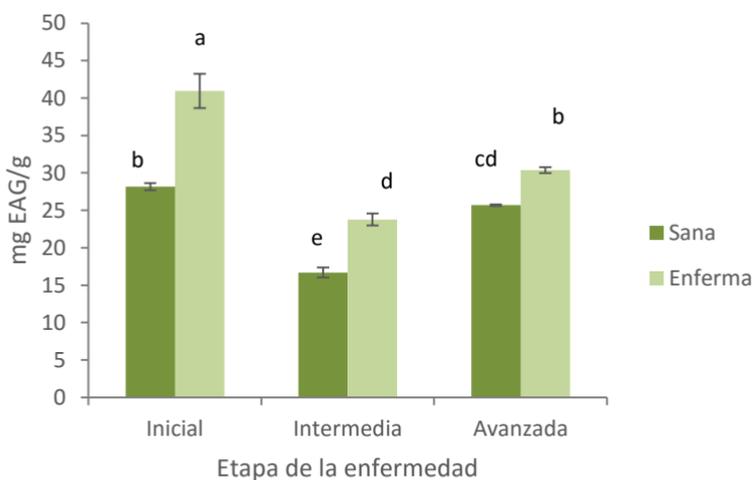


Figura 6. Concentración de fenoles totales en tejido foliar de plantas de chile Mirasol.

Los datos se expresan como la media \pm la DE. Letras diferentes entre barras representa diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con la prueba de Tukey. mg EAG/g, miligramos equivalentes de ácido gálico/ gramo de muestra seca.

En la Figura 6 se puede observar que el tejido foliar enfermo tuvo mayor síntesis de fenoles totales en la etapa inicial con un 45% respecto al control sano, y mantuvo esta tendencia de

incremento en las etapas intermedia (87%) y avanzada (18%) realizando la comparación contra el mismo control. Esto lo podemos observar en la gráfica de interacción (Figura 7) la cual indica que desde el inicio de la enfermedad por fitoplasmas, existe un incremento significativo de fenoles totales en los tejidos foliares enfermos respecto a los valores obtenidos de las plantas sanas en las diferentes etapas de la enfermedad.

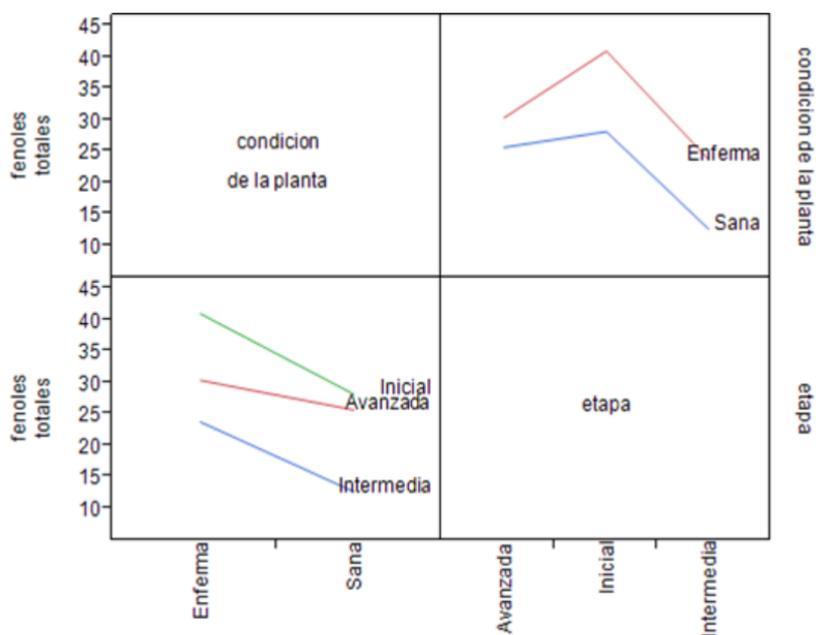


Figura 7. Gráfica de interacción de fenoles totales en tejido foliar.

En la cuantificación de flavonoides totales el mayor incremento es para el tejido foliar enfermo de la etapa avanzada, con un

aumento del 12% respecto al valor obtenido a partir de las plantas sanas. Contrariamente, la síntesis de flavonoides aumenta en los tejidos sanos en la etapa inicial con un 28% y en la intermedia con un 40% en comparación con las plantas enfermas (Figura 8).

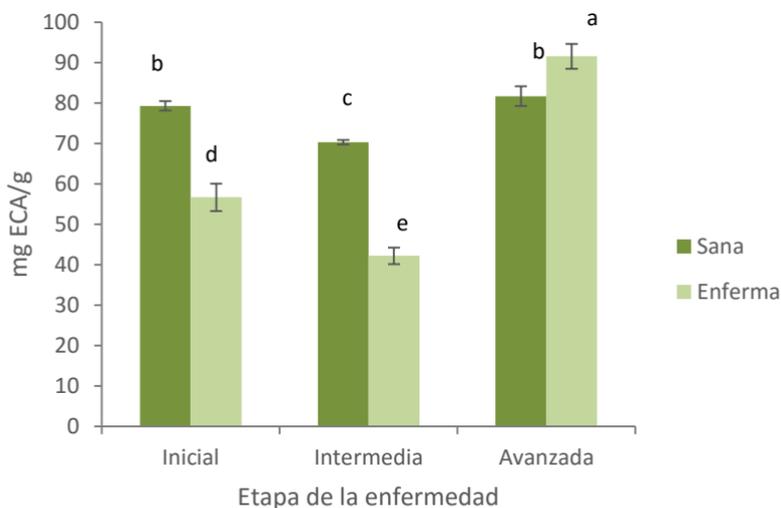


Figura 8. Concentración de flavonoides totales en tejido foliar de plantas de Chile Mirasol.

Los datos se expresan como la media \pm la DE. Letras diferentes entre barras representa diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con la prueba de Tukey. mg ECA/g, miligramos equivalentes de (+)-catequina/gramo de muestra seca.

Bajo el contexto anterior, en la Figura 9 se puede observar que existe un efecto de interacción entre los diferentes niveles de los factores considerados en este estudio en cuanto a la

concentración de flavonoides totales, la cual demuestra que, en la condición sana de la planta, la etapa inicial e intermedia tienen una síntesis de flavonoides elevada; sin embargo, en la etapa avanzada, el contenido de flavonoides es mayor en el tejido foliar de las plantas enfermas.

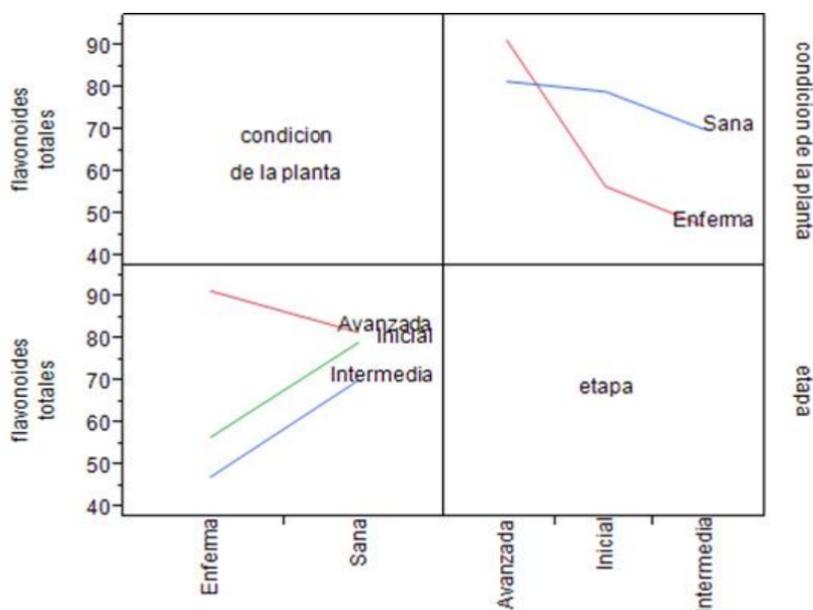


Figura 9. Gráfica de interacción de flavonoides totales en tejido foliar.

Por otro lado, la Figura 10 muestra que la menor síntesis de taninos condensados la presentaron los tejidos foliares enfermos en la etapa intermedia, con una disminución del 73% respecto al tejido enfermo, seguido de la inicial con 67% y la

avanzada con un 17% respecto a los tejidos sanos. Lo anterior se demuestra en la gráfica de interacción (Figura 11) en la cual se observa que cuando la planta se encuentra al inicio de la enfermedad, la síntesis de taninos es mayor en los tejidos sanos, y conforme la enfermedad avanza a la etapa intermedia, el contenido de taninos tiende al aumento.

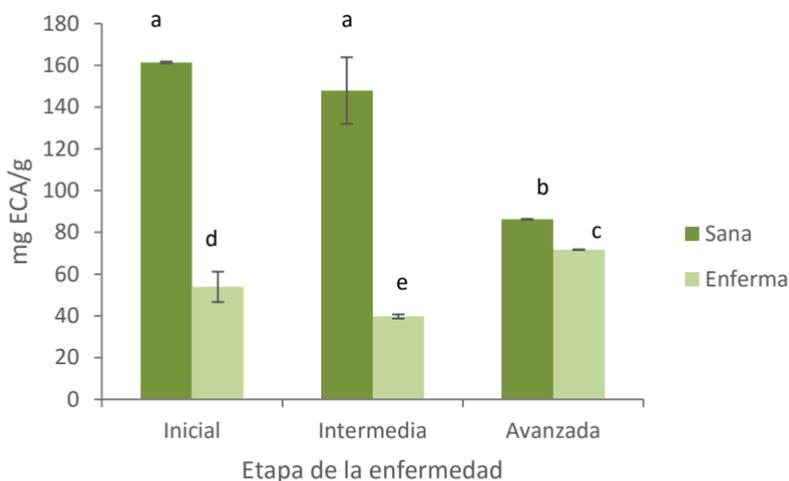


Figura 10. Concentración de taninos condensados en tejido foliar de plantas de chile Mirasol.

Los datos se expresan como la media \pm la DE. Letras diferentes entre barras representa diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con la prueba de Tukey. mg ECA/g, miligramos equivalentes de (+)-catequina/gramo de muestra seca.

Con los resultados obtenidos en relación a la síntesis de taninos condensados de plantas de chile de la variedad Mirasol infectadas por fitoplasma, se demuestra que cuando la planta

está sometida a cualquiera de las etapas de la enfermedad, causada por la infección por fitoplasma, el tejido foliar no es eficiente en su acumulación en comparación con las plantas sanas.

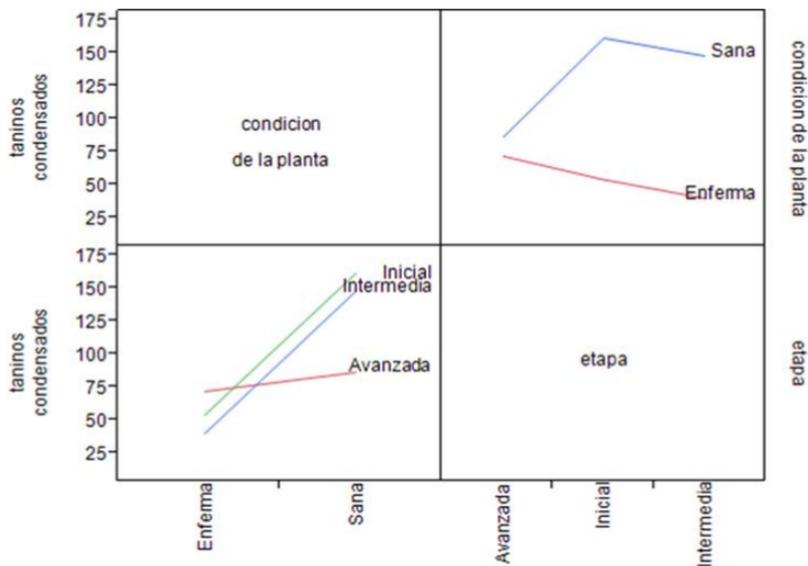


Figura 11. Gráfica de interacción de taninos condensados en tejido foliar.

En la cuantificación de antocianinas el incremento de metabolitos en los tejidos enfermos es significativo ($p < 0.05$). Desde el inicio de la enfermedad los tejidos enfermos tuvieron un incremento del 24%, este aumento en la concentración de antocianinas fue similar al obtenido a partir de las plantas pertenecientes a la etapa avanzada (26%). No obstante, la etapa intermedia permitió el máximo incremento con un 178% respecto

a los tejidos foliares sanos (Figura 12), sin embargo, esta etapa de la enfermedad permitió los niveles más bajos de antocianinas al realizar la comparación entre las diferentes etapas.

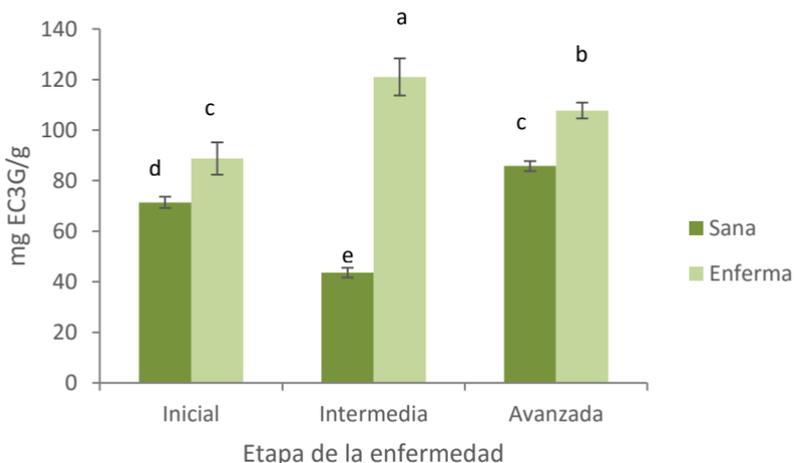


Figura 12. Concentración de antocianinas totales en tejido foliar de plantas de chile Mirasol.

Los datos se expresan como la media \pm la DE. Letras diferentes entre barras representa diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con la prueba de Tukey. mg EC3G/g, miligramos equivalentes de Cianidina 3-glucósido/gramo de muestra seca.

Es evidente que existe un efecto de interacción, el cual manifiesta que la concentración de antocianinas depende ampliamente de los niveles de ambos factores considerados en este estudio (Figura 13). Se observa en la gráfica de interacción que la síntesis de estos metabolitos secundarios es menor en

los tejidos sanos que en los enfermos. Sin embargo, es la etapa intermedia se observó el cambio más evidente: en las plantas sanas la concentración de antocianinas obtenida fue la menor entre ambas condiciones de la planta y las etapas de la enfermedad. Contrariamente, esta misma etapa permitió la máxima concentración de estos compuestos a partir de las plantas enfermas.

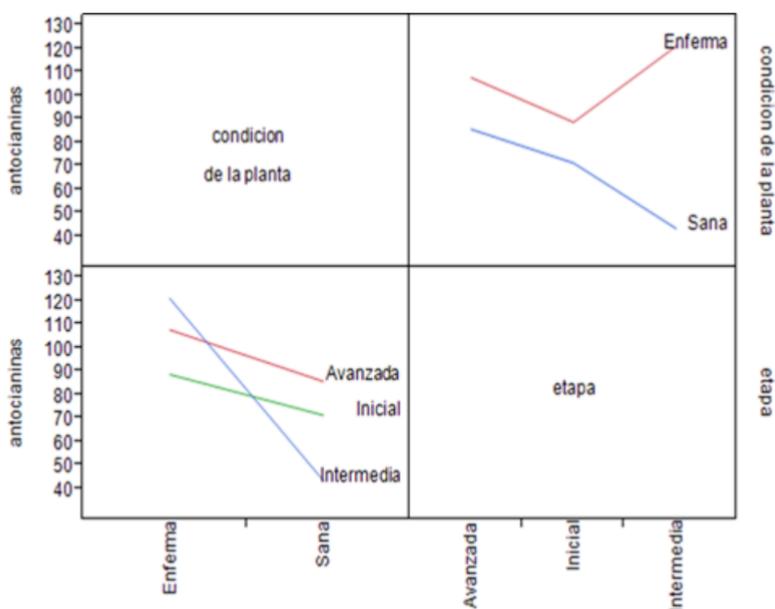


Figura 13. Gráfica de interacción de antocianinas totales en tejido foliar.

En general, la síntesis de compuestos fenólicos en el tejido foliar de las plantas infectadas se llevó a cabo después de la floración

y los resultados indicaron que existe una mayor acumulación de polifenoles que es dependiente de la etapa de la enfermedad, en comparación con las concentraciones de estos compuestos en tejidos de hojas sanas. Por lo anterior, los polifenoles pudieran ser considerados como metabolitos relacionados con los mecanismos de defensa.

CONCLUSIONES

El estrés biótico ocasionado por fitoplasmas en las plantas de Chile Mirasol produce cambios metabólicos en estas, debido a que se observaron alteraciones en el contenido de fenoles totales, flavonoides totales, taninos condensados y antocianinas totales en tejido foliar en plantas enfermas en diferentes etapas de la planta.

El aumento de compuestos fenólicos está relacionado con la condición de la planta y la etapa de la enfermedad en la que se encuentra, por lo que existe un efecto de interacción entre los diferentes niveles de los dos factores considerados en este estudio.

Los fitoplasmas modifican los procesos metabólicos de las plantas de Chile, pudiendo ser estos indicadores bioquímicos para diagnóstico de la infección por fitoplasmas.

LITERATURA CITADA

- Aredondo-Pérez, A., Reveles-Torres, L.R., Velásquez-Valle, R., 2013. Presencia de fitoplasmas asociados al síntoma de “yema grande” en chile para secado en Zacatecas, México. *Agrofaz Agrofaz* 13, 61-69.
- Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E., 2011. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)* 2
- Benavides, M., 2002. Ecofisiología y química del estrés en plantas. Departamento de agricultura/UAAAN.
- Bertamini, M., Grando, M.S., Muthuchelian, K., Nedunchezian, N., 2002. Effect of phytoplasmal infection on photosystem II efficiency and thylakoid membrane protein changes in field grown apple (*Malus pumila*) leaves. *Physiological and molecular plant pathology* 61, 349-356
- Brindis, R.C., García, P.S., Lomelí, A.P., González, G.A., Castillo, G.B., Romero, R.L., 2000. Niveles críticos, de suficiencia y toxicidad de N-NO₃ en el extracto celular de peciolo de tomate de cáscara. *Terra Latinoamericana* 18, 141-145.
- Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-46.
- Camm, E.; Neil, T.G.H. 1973. Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*. 12: 961-973.
- Chiarappa, L., Gambogi, P., 1986. Seed pathology and food production. *FAO Plant Protection Bulletin (FAO)*.
- Choi, Y.H., Tapias, E.C., Kim, H.K., Lefeber, A.W., Erkelens, C., Verhoeven, J.T.J., Brzin, J., Zel, J., Verpoorte, R., 2004. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiology* 135, 2398-2410.

- Davey, J., Van Staden, J., De Leeuw, G., 1981. Endogenous cytokinin levels and development of flower virescence in *Catharanthus roseus* infected with mycoplasmas. *Physiological Plant Pathology* 19, 193-200.
- Dixon, R.A.; Achnine, L.; Kota, P.; Liu, C.J.; Reddy, M.S.; Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. 3: 371–390.
- Duduk, B., Bertaccini, A., 2011. Phytoplasma classification: taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? *Phytopathogenic Mollicutes* 1, 3-13.
- Ertunc, F., 2013. A new threat for Turkish horticulture: phytoplasma diseases and their vectors. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg* 60, 221-224.
- Fan, G.; Xu, E.; Deng, M.; Zhao, Z.; Niu, A. 2015. Phenylpropanoid metabolism, hormone biosynthesis and signal transduction-related genes play crucial roles in the resistance of *Paulownia fortunei* to paulownia witches' broom phytoplasma infection. *BMC Genomics*. 16: 896- 912.
- Firrao, G., Andersen, M., Bertaccini, A., Boudon, E., Bove, J., Daire, X., Davis, R., Fletcher, J., Garnier, M., Gibb, K., 2004. *Candidatus Phytoplasma*, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1243-1255.
- Fraser, C.M.; Chapple, C. 2011. The Phenylpropanoid Pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*. 9:1-19.
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology*. 107: 7-12.
- Himeno, M.; Kitazawa, Y.; Yoshida, T.; Maejima, K.; Yamaji, Y.; Oshima, K.; Namba, S. 2014. Purple top symptoms are

- associated with reduction of leaf cell death in phytoplasma-infected plants. *Scientific Reports*. 4: 1-7.
- Hogenhout, S.A., Loria, R., 2008. Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current opinion in plant biology* 11, 449-456
- Hugh J.D. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its and its role in plant development. *Phytochemistry*. 23: 1349-1359.
- Junqueira, A.; Bedendo, I.; Pascholati, S. 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65: 181-185.
- Kesumawati, E., Kimata, T., Uemachi, T., Hosokawa, M., Yazawa, S., 2006. Correlation of phytoplasma concentration in *Hydrangea macrophylla* with green-flowering stability. *Scientia horticulturae* 108, 74-78.
- Lattanzio, V., 2013. Phenolic compounds: introduction, *Natural Products*. Springer, pp. 1543-1580.
- Leiss, K.; Choi, H.Y.; Verpoorte, R.; Klinkhamer, P.G.L. 2010. An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. *Phytochemistry Reviews*. 10: 205-216.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., Seemüller, E., 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 59-68.
- Maeda, H., Dudareva, N., 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology* 63, 73-105.
- Margaria, P.; Ferrandino, A.; Caciagli, P.; Kedrina, O.; Schubert, A.; Palmano, S. 2014. Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo

- and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by Flavescence dorée phytoplasma. *Plant, Cell and Environment*. 37:2183-2200.
- Musetti, R., Favali, M.A., 2003. Cytochemical localization of calcium and X-ray microanalysis of *Catharanthus roseus* L. infected with phytoplasmas. *Micron* 34, 387-393.
- Musetti, R., di Toppi, L.S., Ermacora, P., Favali, M., 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology* 94, 203-208.
- Musetti, R., Di Toppi, L.S., Martini, M., Ferrini, F., Loschi, A., Favali, M.A., Osler, R., 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology* 112, 53-61
- Musetti, R.; Favali, M.A.; Pressacco, L. 2000. Histopathology and polyphenol contents in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios*. 102: 133-147.
- Ordeñana, K.M., 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Revista Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica 63, 22-32.
- Pertot, I., Musetti, R., Pressacco, L., Osler, R., 1998. Changes in indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *catharanthus roseus* infected by the agent of the clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. *Cytobios* 95, 13-23.
- Peters, M.S., Timmerhaus, K.D., West, R.E., Timmerhaus, K., West, R., 1968. *Plant design and economics for chemical engineers*. McGraw-Hill New York
- Pineda-Pineda, J., Avitia-García, E., Castillo-González, A.M., Corona-Torres, T., Valdez-Aguilar, L.A., Gómez-

- Hernández, J., 2008. Extracción de macronutrientes en frambueso rojo. *Terra Latinoamericana* 26, 333-340.
- Reveles-Torres, L.R., Velásquez-Valle, R., Mauricio-Castillo, J.A., 2014. Fitoplasmas: otros agentes fitopatógenos.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K., Krohn, K., 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106, 996-1004
- Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H.-Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M., Namba, S., 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4252-4257.
- Taiz, L., Taiz, E., Zeiger, E., Uhart, S.A.E., Uhart, H.E.S.A., Echeverría, H.E., Rojo Hernández, C., Terrón, T.U., DE VILARDAGA, A., VINAS, X.N., 2006. Fisiología vegetal/Plant physiology. Universitat Jaume
- Tolalpa, L.C.; Carmona, S.B.; Cervantes, A.S.; García, M.A.; Gosset G.; Escalante, A.; Bolívar F. 2011. Ingeniería de vías metabólicas en *Escherichia coli* para la producción de shikimate como precursor para la síntesis de compuestos antivirales contra influenza. *Biotecnología*. 1: 30- 47.
- Tzin, V.; Galili, G. 2010. The biosynthetic pathways for Shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book*. 8: 1-18.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L.R., Chew-Madinaveitia, Y.I., Mauricio-Castillo, J.A., 2013. Virus y fitoplasmas asociados con el cultivo de chile para secado en el norte centro de México. Folleto Técnico Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*. 3: 2-20.

- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant* 3, 2-20.
- Wei, W., Davis, R.E., Lee, M., Zhao, Y., 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, 1855-1867.
- Ying-Ping, G.; Xue-Juan, H.; Yi-Qun, L.; Chuan-Zhong, Y.; Yao-Yao, M.; Fang-Yue, G.; Qing-Xin, L. 2014. *Metabolomic*

AGRADECIMIENTOS

Este folleto se publicó con apoyo financiero de fondos fiscales del INIFAP dentro del proyecto “Diversidad genética y caracterización de la infección por fitoplasmas en Chile para secado en el norte centro de México”.

REVISIÓN TÉCNICA Y EDICIÓN

Dra. Raquel Cruz Bravo
INIFAP Zacatecas

Dr. Jorge Armando Mauricio Castillo
Unidad Académica de Agronomía. UAZ

DISEÑO DE PORTADA
Mayra Denise Herrera

Código INIFAP
MX-0-310801-11-02-11-09-79

Grupo Colegiado del CEZAC

Presidente: Dr. Jaime Mena Covarrubias
Secretario: Dr. Francisco G. Echavarría Cháirez
Comisión Editorial y Vocal: Dr. Manuel de Jesús Flores Nájera
Vocal: Dr. Luis Roberto Reveles Torres
Vocal: Dr. Guillermo Medina García
Vocal: Ing. Manuel Reveles Hernández
Vocal: MC. Mayra Denise Herrera

La presente publicación se terminó de imprimir en el mes de
Diciembre de 2016 en “Paus” Impresiones, Calle Real del Calvario
#125, Col. Real de Calera. C. P. 98500, Calera de V. R.,
Zacatecas, México.
Tel. (478) 98 5 22 13

Su tiraje constó de 500 ejemplares

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DIRECTORIO

Dr. Francisco Gpe. Echavarría Cháirez
Director de Coordinación y Vinculación

| | | |
|------|-------------------------------|---|
| Dr. | Guillermo Medina García | Agrometeorología y Modelaje |
| MC. | Nadiezhdá Y. Ramírez Cabral* | Agrometeorología y Modelaje |
| Dr. | Manuel de Jesús Flores Nájera | Carne de Rumiantes |
| Dr. | Alfonso Serna Pérez | Fertilidad de suelos y nutrición vegetal |
| Ing. | José Ángel Cid Ríos* | Frijol y Garbanzo |
| MC. | Juan José Figueroa González | Frijol y Garbanzo |
| MC. | Mayra Denise Herrera | Frijol y Garbanzo |
| Dr. | Jorge A. Zegbe Domínguez | Frutales |
| MC | Valentín Meler Meraz | Frutales |
| Ing. | Manuel Reveles Hernández | Hortalizas |
| MC. | Miguel Servin Palestina | Ingeniería de Riego |
| Dra. | Raquel Cruz Bravo | Inocuidad de Alimentos |
| MC | Enrique Medina Martínez | Maíz |
| MC. | Francisco A. Rubio Aguirre | Pastizales y Cultivos Forrajeros |
| Dr. | Ramón Gutiérrez Luna | Pastizales y Cultivos Forrajeros |
| Ing. | Ricardo A. Sánchez Gutiérrez | Pastizales y Cultivos Forrajeros |
| Dr. | Luis Roberto Reveles Torres | Recursos Genéticos: Forestales, Agrícolas, Pecuarios y Microbianos |
| Dr. | Jaime Mena Covarrubias | Sanidad Forestal y Agrícola |
| Dr. | Rodolfo Velásquez Valle | Sanidad Forestal y Agrícola |
| MC. | Blanca I. Sánchez Toledano * | Socioeconomía |

* Becarios

WWW.INIFAP.GOB.MX

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias