

**UNIVERSITAT
JAUME·I**

**ESCUELA SUPERIOR DE TECNOLOGÍA Y
CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
ÁREA DE FISIOLOGÍA VEGETAL**

**ALTERACIÓN DE RUTAS METABÓLICAS Y
PROMOCIÓN DE DEFENSAS ENDÓGENAS EN
Lycopersicon esculentum Mill. y *Capsicum annuum* L.
INDUCIDAS POR LA APLICACIÓN DE NUEVOS
REGULADORES DE CRECIMIENTO**

Memoria presentada por:
VÍCTOR FLORS HERRERO
Para optar al grado de
DOCTOR en CIENCIAS QUÍMICAS
Directora:
PILAR GARCÍA AGUSTÍN
Castellón, Noviembre 2000

Dña PILAR GARCÍA AGUSTÍN, Dra en Ciencias Biológicas, Titular de Universidad en el Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias Experimentales de la Universidad Jaume I.

CERTIFICA: Que la memoria titulada “ALTERACIÓN DE RUTAS METABÓLICAS Y PROMOCIÓN DE DEFENSAS ENDÓGENAS EN *Lycopersicon esculentum* Mill. y *Capsicum annuum* L. INDUCIDAS POR LA APLICACIÓN DE NUEVOS REGULADORES DE CRECIMIENTO” que presenta Víctor Flors Herrero para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizada en el Departamento de Ciencias Experimentales de la Universidad Jaume I bajo su dirección.

Y para que conste a todos los efectos y a petición del interesado, se expide el presente certificado en Castellón a 28 de noviembre 2000

Pilar García Agustín

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en:

Flors V, Miralles M C, Muñoz S C, Lapeña L y García-Agustín P. Inducción de mecanismos bioquímicos de defensa naturales en plantas. XII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Córdoba (España). Septiembre 1997.

Flors V, Miralles M C, Muñoz S C, y García-Agustín P. Effect of carboxylic acids, amines and modified sugars on metabolism of tomatos plants. The 11th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology. Varna (Bulgaria). Septiembre 1998.

Flors V, Miralles M C, Pareja J M, y García-Agustín P. Efecto de ciertas aminas y ácidos de bajo peso molecular sobre el crecimiento, enzimas de senescencia y el intercambio gaseoso en plantas de pimiento. VII Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. Murcia (España). Abril 1999.

Flors V. Miralles M.C., Cerezo. M., Gómez-Cadenas A., García-Agustín P. Estudio agronómico de una nueva mezcla química en plantas de tomate. *Agrícola Vergel* . 2000, Marzo, 182-188.

Flors V, Miralles M C, Pareja J M, y García-Agustín P. Efecto de ciertas aminas y ácidos de bajo peso molecular sobre el crecimiento, enzimas de senescencia y el intercambio gaseoso en plantas de pimiento. *Actas de Horticultura*. 1999. Vol. 90 (17-22).

Patente de invención con Ref P-9702095. Muñoz S C, Miralles M C, Flors V, García-Aguatín P, Lapeña L. Glucósidos sustituidos, útiles como agentes promotores del desarrollo productivo en las plantas superiores y protectores del medio ambiente. Tramitada en Mayo 1998. (Aceptada, en fase de reclamaciones)

Patente de invención P200000881. Bresolí J, Flors V., Pareja J.M. Uso de combinaciones de ácidos dicarboxílicos de bajo peso molecular, de sus monoésteres y de sus carboxilatos para la elaboración de productos agrícolas. Tramitada en Abril de 2000.

Flors V, Miralles M.C., Cerezo M., García-Agustín P. Effect of some dicarboxylic acid monoesters, amines and modified sugars on growth, senescence, cell wall sugar and flavonoid metabolism in tomato and pepper plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (Aceptado para publicación enero 2001).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Ciencias Experimentales de la Universidad Jaime I de Castellón, bajo la dirección de la Dra. Pilar García Agustín, a quién quiero manifestar mi más sincero agradecimiento por sus enseñanzas, apoyo y ayuda prestados en todo momento.

También quiero agradecer el interés y la ayuda prestada por mis compañeros de área M^a Carmen, Esther y Luis por la ayuda inestimable que me han prestado durante la realización de los análisis. También quisiera mencionar la colaboración en esta tesis de Michel, Eva, Aurelio, Leonor, Carmen, Helena, Ximo y al resto de compañeros de laboratorio que me han aguantado durante los ratos de desahogo. Quisiera agradecer especialmente a Carmen González su colaboración y apoyo científico.

Agradezco igualmente a la empresa Codiagro S.L. el aporte económico, que me ha permitido disfrutar de varias becas de investigación, lo que ha sido de gran ayuda para la realización de esta tesis. Especialmente deseo agradecer la colaboración del equipo técnico de la empresa, Jose M^a Pareja y José Bresolí, por su apoyo, dirección y formación adquirida durante más de tres años de trabajo conjunto. También quisiera agradecer a Enrique Sales por la paciencia mostrada durante todo este tiempo y por no perder la ilusión en la investigación. La fórmula de los compuestos que se han estudiado en esta tesis se basa en una idea original de Salvador Muñoz.

Dedico esta tesis a mi padre y a mi madre, ya que muchas veces la motivación y el apoyo moral es más importante que el trabajo puramente intelectual.

Si de algún modo con esta dedicatoria puedo compensar las horas perdidas en la corrección de esta tesis, las horas de insomnio, los enfados, días de encierro y el eterno: " cuando acabe esta tesis haremos..." todo mi agradecimiento para Bea.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Reguladores de crecimiento hormonales y no hormonales	3
1.1.1 Hormonas vegetales	3
1.1.2 Reguladores del desarrollo no hormonales	10
1.1.3 Papel de los ácidos carboxílicos como reguladores del desarrollo	11
1.1.4 Papel de las poliaminas como reguladores del desarrollo	17
1.2. Mecanismos de defensa de plantas que se desencadenan durante ataques patogénicos	25
1.2.1 Comentarios generales	25
1.2.2 Mecanismos fúngicos en interacciones planta-hongo	28
1.2.3 Mecanismos naturales desencadenados en la planta por la infección de patógenos	31
1.2.4 Importancia de la ruta del ácido siquímico y de los compuestos fenólicos en interacciones planta-patógeno	38
1.2.5 Principal ruta de síntesis de flavonoides	43
1.2.6 Papel de los compuestos fenólicos en procesos oxidativos	45
1.3. Control de enfermedades fúngicas mediante el uso de compuestos fungistáticos	51
Anexo 1	56
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	59
3. METODOLOGÍA GENERAL	62
3.1 Material vegetal	62
3.2 Fertilización	63
3.3 Tratamientos	65
3.3.1 Compuestos utilizados para los experimentos	65
3.4 Experimentos	66
3.4.1 Efecto de la aplicación de reguladores del desarrollo sobre el crecimiento de plantas de pimiento y tomate	66
3.4.2 Efecto de la aplicación de reguladores del desarrollo en la interacción planta-hongo en diferentes sistemas	67

3.4.3 Caracterización bioquímica de los efectos producidos por la aplicación de reguladores del desarrollo	69
3.4.4 Efecto de la aplicación del monoéster éfilico del ácido adípico y furfurilamina en plantas	70
3.4.5 Efecto de la aplicación de reguladores del desarrollo de plantas sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos	71
3.5. Métodos analíticos	71
3.5.1 Estudio de la fotosíntesis	71
3.5.2 Determinación de la actividad peroxidasa total	72
3.5.3 Extracción y cuantificación de la proteína total. Determinación de la actividad proteasa	73
3.5.4 Determinación del contenido de clorofila total y actividad clorofilasa	73
3.5.5 Cuantificación de los compuestos fenólicos	74
3.5.6 Extracción y cuantificación de los azúcares de la pared celular vegetal	78
3.5.7 Electroforesis de proteínas	82
3.5.8 Actividad chalcona isomerasa	83
3.5.9 Síntesis del adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa	84
3.5.10 Extracción y cuantificación de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa, PAL	86
3.6. Estadística	87
4. RESULTADOS	89
4.1 Estudio de la aplicación de distintos principios activos como reguladores del desarrollo en plantas	89
4.1.1 Tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA	89
4.1.1.1. Plantas de tomate	89
a) Sobre el desarrollo	89
b) Respuesta frente a patógenos (planta entera y hojas aisladas)	90
4.1.1.2. Plantas de pimiento	94
a) Sobre el desarrollo	94
b) Respuesta frente a patógenos (planta entera y hojas aisladas)	94
4.1.1.3. Plantas de cítricos	99
a) Respuesta frente a patógenos (planta entera)	99
4.1.2 Tratamiento con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2	100
4.1.2.1. Plantas de tomate	100

a) Sobre el desarrollo	100
b) Respuesta frente a patógenos (planta entera y hojas aisladas)	103
4.1.2.2. Plantas de pimiento	105
a) Sobre el desarrollo	105
b) Respuesta frente a patógenos (planta entera y hojas aisladas)	106
4.1.2.3. Plantas de cítricos	107
a) Respuesta frente a patógenos (planta entera)	107
4.2 Caracterización bioquímica de los efectos producidos por la aplicación de distintos principios activos como reguladores del desarrollo en plantas	109
4.2.1 Tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA	109
4.2.1.1 Plantas de tomate	109
a) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso	109
b) Estudio de los mecanismos implicados en la defensa de las plantas:	
b.i.) Estudio de la ruta fenilpropanoide	111
b.i.i.) Cuantificación de carbohidratos de pared celular	112
c) Estudio de las enzimas implicadas en procesos de senescencia y del contenido de proteína y clorofila	114
4.2.1.2 Plantas de pimiento	115
a) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso	117
b) Estudio de los mecanismos implicados en la defensa de las plantas:	
b.i.) Estudio de la ruta fenilpropanoide.....	117
b.i.i.) Cuantificación de carbohidratos de pared celular	119
c) Estudio de las enzimas implicadas en procesos de senescencia y del contenido de proteína y clorofila	121
d) Identificación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida	122
4.2.2 Tratamiento con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2	123
4.2.2.1 Plantas de tomate	123
a) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso	124
b) Estudio de los mecanismos implicados en la defensa de las plantas:	
b.i.) Estudio de la ruta fenilpropanoide	125
b.i.i.) Cuantificación de carbohidratos de pared celular	125
c) Estudio de las enzimas implicadas en procesos de senescencia y del contenido de proteína y clorofila	126

4.2.2.2 Plantas de pimiento	128
a) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso	129
b) Estudio de los mecanismos implicados en la defensa de las plantas:	
b.i.) Estudio de la ruta fenilpropanoide	129
c) Estudio de las enzimas implicadas en procesos de senescencia y del	
contenido de proteína y clorofila	132
d) Identificación de proteínas por electroforesis en gel de	
poliacrilamida	134
4.3 Estudio del efecto de la aplicación de los reguladores del desarrollo de plantas	
sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos	135
4.3.1 Efecto de la aplicación de los compuestos de la mezcla FGA sobre el	
desarrollo de hongos	135
4.3.1.1 Estudio del crecimiento en placa	136
4.3.2 Efecto de la aplicación de los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2	
sobre el desarrollo de hongos	138
4.3.2.1 Estudio del crecimiento en placa	138
4.4 Estudio del efecto de la aplicación de los compuestos separados de la mezcla FGA	
(éster efílico del ácido adípico, furfuralamina y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-	
glucopiranososa)	145
4.4.1 Efecto sobre el desarrollo	145
4.4.2 Caracterización bioquímica	147
a) Estudio de la ruta fenilpropanoide	147
b) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso	149
4.4.3 Efecto sobre el crecimiento de hongos en placa	151
4.5 Estudio comparativo de los efectos de los tratamientos con los compuestos de las	
mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 en plantas de tomate, pimiento y cítricos frente a	
patógenos	153
a) Sobre la interacción planta-patógeno (planta entera)	153
b) Sobre la interacción planta-patógeno (hojas aisladas)	157
4.6 Estudio comparativo del efecto de los tratamientos con los compuestos de las	
mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 en plantas de tomate y pimiento sobre las	
diferentes actividades enzimáticas y el contenido de proteína y clorofila	162
4.7 Estudio comparativo del efecto de los tratamientos con los compuestos de las	
mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos	
cultivados <i>in vitro</i>	166

5. DISCUSIÓN	168
6. CONCLUSIONES	182
7. BIBLIOGRAFÍA	184

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas sintetizan reguladores de crecimiento endógenos que influyen de modo esencial en los procesos fisiológicos de los vegetales. Las prácticas agronómicas actuales están orientadas en su mayor parte a la modificación del desarrollo de las plantas mediante el uso de reguladores de crecimiento (Nickell, 1994). Estas prácticas agrícolas se ven facilitadas, en parte, por la gran cantidad de reguladores sintéticos existentes en el mercado que imitan los efectos de las propias hormonas vegetales.

Muchos de los reguladores del desarrollo propios de las plantas tienen como grupos funcionales compuestos como los ácidos carboxílicos, las aminas y algunos análogos de azúcares. Diversos estudios han demostrado que los compuestos de esta naturaleza poseen la capacidad de inducir diferentes efectos tanto en plantas como en hongos fitopatógenos (Alexieva, 1994; Dijan et al, 1994).

Se sabe que los ácidos carboxílicos pueden actuar como retardantes del crecimiento y retrasar los procesos de senescencia mediante la inhibición de la actividad clorofilasa y peroxidasa (Karanov y Alexieva, 1985; Alexieva y Karanov, 1987a, 1987b; Todorov et al, 1992). En el cultivo de maíz se ha demostrado que los tratamientos con ácidos polihidroxicarboxílicos pueden incrementar el crecimiento de la raíz (Gur et al, 1987), induciendo el crecimiento de pelos radiculares, lo que provocaría una mejor asimilación de nutrientes (Muñoz, 1994). También se conoce que los tratamientos con ácidos carboxílicos pueden inducir la síntesis de carbohidratos (Guo et al, 1993).

Por otro lado, la acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides es una respuesta habitual de las plantas ante la aparición de un estrés patogénico. Estos estreses suelen producir la acumulación de especies radicalarias oxidativas, que necesitan ser detoxificadas mediante la acumulación de compuestos fenólicos (Zähringer et al, 1978; Dixon et al, 1983; Gerrish et al 1985; Ortuño et al, 1997). Apenas existen estudios sobre la acumulación de compuestos fenólicos o compuestos de defensa en ausencia de ataques patogénicos. En este sentido, se conocen algunos trabajos que ponen de manifiesto la posibilidad de inducir la acumulación de fitoalexinas como respuesta a la aplicación de fitorreguladores (Fuster et al, 1994; García Puig et al, 1995, Del Río et al, 1995).

Respecto al potencial fitorregulador de las aminas se sabe que afectan a procesos esenciales de las plantas como la floración, la germinación de semillas, el crecimiento vegetativo, la senescencia de las hojas, etc. (Kaur-Sawhney y Galston, 1979; Shih et al, 1982).

Recientemente, han aparecido estudios en los que se demuestra la implicación de algunos reguladores del desarrollo vegetal en los procesos de crecimiento de los hongos fitopatógenos. Se sabe que tanto las aminas (Havis et al, 1994; Havis et al, 1997) como los análogos de azúcares (El Gaouth et al, 1995), pueden interferir en el crecimiento de hongos, reduciendo la incidencia de estos parásitos en cultivos y en frutos en post-cosecha.

El uso creciente de fitorreguladores hormonales sintéticos ha provocado la aparición de normativas agrícolas que restringen el uso de aquellos compuestos químicos que provocan alteraciones y disfunciones hormonales en los cultivos. Por otro lado, el control de las plagas típicas de campo ha derivado en un uso abusivo de los

pesticidas. Este hecho en muchas ocasiones induce la aparición de resistencia en los patógenos haciendo cada vez más difícil su erradicación (Fujiyama et al, 2000; Raposo et al, 2000). Al mismo tiempo, la mayoría de los pesticidas generan residuos más tóxicos si cabe que los propios fitorreguladores. Por tanto, es interesante la investigación básica para desarrollar nuevos fitorreguladores que promuevan alteraciones temporales encaminadas a la reducción de los estreses limitantes de la producción y mejoren la sanidad de los cultivos mediante la inducción de defensas endógenas, lo cual permitiría la reducción del uso de hormonas sintéticas y pesticidas. También es interesante estudiar nuevos compuestos menos tóxicos con capacidad para reducir la aparición de podredumbres en post-cosecha.

1.1. Reguladores de crecimiento hormonales y no hormonales

1.1.1. Hormonas vegetales

Las hormonas vegetales controlan el metabolismo y el desarrollo vegetal. Normalmente se entiende por hormona vegetal un compuesto orgánico sintetizado en una parte de la planta y traslocado a otra (tejido diana) en la que estimula un efecto; aunque en ocasiones una hormona vegetal puede actuar en el mismo tejido en el que se biosintetiza, como es el caso del etileno. Las zonas diana de las hormonas son capaces de responder a concentraciones muy bajas de estos compuestos (entre 1 mM y 1 μ M) (Salisbury y Ross, 1992).

En general, se aceptan una serie de condiciones para afirmar que un compuesto determinado es una hormona vegetal. Estas condiciones son básicamente tres. En primer lugar, una hormona debe estar presente a concentraciones adecuadas y en el lugar correcto. Segundo, se debe establecer un reconocimiento muy específico entre la hormona y las moléculas de respuesta. Por último, los receptores que responden a la señal hormonal deben desencadenar señales metabólicas que amplifiquen el mensaje hormonal.

El mecanismo de acción de las hormonas puede seguir dos vías diferentes dentro de la célula vegetal. Las hormonas esteroideas pueden atravesar membranas celulares y actuar directamente sobre un receptor que puede entrar en el núcleo y afectar directamente a la síntesis de mRNA. Por tanto, la acción fisiológica de esta hormona sería modular directamente la síntesis de mRNA (Wolfe, 1993; Arteca, 1996).

Otro modo de actuación de las hormonas se canaliza a través de receptores de membrana situados en las células diana. Estos receptores suelen ser complejos protéicos que cambian de conformación cuando se les une la hormona, y este cambio desencadena una reacción en cascada que, generalmente, modifica la actividad de una enzima que genera cambios fenotípicos (Wolfe, 1993; Arteca, 1996). Como resultado de la cascada de señal también se puede producir la modulación de la expresión de genes. La unión de una hormona a su receptor de membrana puede inducir cambios en procesos como: la transcripción, el procesado del mRNA, la estabilidad del mRNA, la

traducción y el procesado de proteínas (Salisbury y Ross, 1992; Arteca, 1996).

La regulación hormonal se basa en la síntesis de una hormona concreta cuando se producen condiciones propicias y, al mismo tiempo, la inhibición de la hormona antagonista. Por tanto, se trata de un equilibrio entre diferentes hormonas que causan efectos contrarios.

Las hormonas vegetales actualmente aceptadas son las auxinas, las giberelinas, el ácido abscísico, las citoquininas y el etileno.

Las auxinas se sintetizan en los brotes cuando todas las células están recibiendo aportes nutricionales abundantes de azúcares, CO₂ y O₂. Contrariamente, las giberelinas se sintetizan bajo condiciones de aportes pobres de nutrientes, especialmente bajo condiciones de deficiencias de azúcares, CO₂, O₂ o luz. Las citoquininas se sintetizan en las raíces cuando las células tienen aportes abundantes de agua y minerales. En contrapartida, el ácido abscísico se produce cuando el aporte radicular de agua y minerales es insuficiente. En cuanto al etileno, se admite que se sintetiza bajo cualquier condición de estrés, medioambiental, patogénico o por enfermedades. Por tanto, las hormonas aparecen integradas en un sistema controlado por el crecimiento, el estrés, el transporte de nutrientes y la senescencia.

En función de las condiciones que provoquen la aparición de una u otra hormona se pueden establecer dos grupos, el primero de "hormonas positivas", auxinas y citoquininas, y el segundo de "hormonas negativas", etileno, ácido giberélico (AGs) y ácido abscísico (ABA). Aunque ésto sea una visión muy simplista, es útil para una rápida comprensión de la regulación hormonal vegetal.

Las auxinas se sintetizan mayoritariamente en hojas jóvenes y en menor cantidad en hojas maduras (Sembdner et al, 1980). Si las condiciones son favorables, las células inmaduras son capaces de producir hormonas positivas en mayor medida que las células maduras. Sin embargo, si las condiciones son adversas, las células maduras producirán más hormonas negativas que las células jóvenes (Pruitt, 1999). Otros investigadores han demostrado que la síntesis de auxinas y citoquininas induce la toma de nutrientes. Este efecto provoca en los brotes apicales la síntesis de más auxinas y citoquininas, puesto que se trata de un tejido joven e induce la entrada de más nutrientes desde los tejidos próximos. Es una regulación por bucle positivo.

Por analogía, las hormonas negativas producen la salida de los nutrientes desde las células y tejidos maduros, con lo que se induce una regulación positiva en las células inmaduras que reciben el aporte de nutrientes desde los tejidos maduros. Mientras que en las hojas maduras se genera una regulación por bucle negativo, que es el origen de la senescencia. Esta regulación negativa está encabezada por las síntesis de etileno y ABA (Wareing y Phillips, 1981).

Las hormonas tienen numerosos efectos en las plantas. Según Pruitt (1999), las hormonas pueden afectar al metabolismo de las plantas en tres niveles diferentes en función de su concentración. A bajas concentraciones, las hormonas afectan a la actividad intracelular, las hormonas positivas la incrementan y las negativas la reducen.

A niveles de concentración intermedios, las hormonas pueden afectar a las dimensiones de la célula. Las hormonas positivas incrementan el tamaño medio de la célula y el crecimiento de las

partes periféricas de los tejidos (hojas y raíces externas), mientras que no afectan tanto a las zonas centrales de los tejidos. Se ha demostrado que el AGs detiene el crecimiento radicular (Mitsuhashi-Kato et al, 1978). Asimismo, se sabe que el AGs y el etileno incrementan el tamaño celular, pero sólo en determinado tipo de células (Burg and Burg, 1966; Engelke et al, 1973). En definitiva, las hormonas negativas provocan un aumento del tamaño celular de las zonas medias de los tejidos, a costa de reducir el tamaño celular medio de los tejidos periféricos, como pelos radiculares o bordes de las hojas (Pruitt, 1999).

Cuando las auxinas y las citoquininas se encuentran en concentraciones elevadas provocan división celular. Por otro lado, el etileno, el ABA y el AGs son necesarios para provocar la senescencia de la célula.

Al mismo tiempo, la presencia de pequeñas cantidades de auxinas previene a la célula de la senescencia provocada por aumentos del ácido abscísico. Mientras las hojas maduras reciben nutrientes, carbohidratos, CO₂ y O₂, se mantiene un nivel basal de auxinas que previene de la senescencia provocada por el ABA. En las células maduras de las raíces se produce una situación similar, aunque son las citoquininas las que previenen de la senescencia frente al ABA.

Las hormonas positivas tienen un efecto directo sobre la inhibición de las negativas y viceversa (Pruitt, 1999). Por ejemplo, la acción de una auxina en el meristemo apical de los brotes inhibe la síntesis del etileno y del ABA.

En las raíces, por el contrario, se ha demostrado que las auxinas inducen directamente la síntesis de etileno, por lo tanto,

serán las citoquininas las que posean un efecto directo sobre la inhibición del etileno.

En los meristemas apicales de los brotes, un aporte de nutrientes, agua y azúcares induce hormonas positivas, pero un exceso de agua o de nutrientes puede ser fitotóxico. Por tanto, cuando se producen cantidades excesivas de hormonas positivas se pierde el control negativo sobre las hormonas negativas, y se produce una inducción directa sobre las enzimas que sintetizan las hormonas negativas. Esta síntesis de hormonas negativas evita un exceso de síntesis de hormonas positivas.

Las hormonas positivas controlan los mecanismos diurnos de la vida de las plantas (Jahardhan et al, 1973), ya que se producen picos de máxima concentración tanto de auxinas como de citoquininas a lo largo del día (Hewett y Wareing, 1973). Las hormonas negativas, etileno (Goeschl et al, 1967), AGs (Brown et al, 1975) y ABA (Lecoq et al, 1983), regulan los mecanismos nocturnos, aunque al ABA no se sintetiza si no hay alguna deficiencia hídrica.

Las hormonas tienen un efecto muy marcado sobre el transporte de nutrientes. Las auxinas se transportan desde los meristemas apicales de los brotes a través del floema hacia las raíces, redirigiendo el transporte de azúcares, CO₂ y O₂ desde las hojas hacia las raíces. Además, las hormonas negativas se encargan de extraer los nutrientes desde las hojas maduras hacia los tejidos en crecimiento. Las citoquininas, a través del xilema, juegan un papel similar, arrastrando un flujo de nutrientes y agua desde las raíces hacia los tallos y los brotes. En las raíces existe un balance entre auxinas y citoquininas. Si se produce un incremento de las auxinas procedentes de los brotes, se produce un crecimiento de nuevas

raíces laterales y ésto provoca un cambio en el equilibrio radicular auxina/citoquinina que induce directamente la síntesis de etileno en los brotes. Esta situación crea un control negativo en los brotes aéreos. De esta manera se mantiene la dominancia apical de las raíces. Por el contrario, si se producen grandes cantidades de citoquininas en las raíces se induce la síntesis del etileno y se establece una dominancia apical de los brotes.

Por último, las auxinas se producen más en los brotes que en las raíces debido a que hay una mayor cantidad de azúcares, CO₂ y O₂ (Sembdner et al, 1980). Sin embargo, las citoquininas se producen más en las raíces que en los brotes, debido a que hay más abundancia de minerales y agua (Van Staden y Smith, 1978). Las giberelinas se producen en mayor cantidad en las raíces porque hay más deficiencia de azúcares, CO₂ y O₂ (Barrington, 1975) y, al mismo tiempo, el ABA se produce más en los brotes porque suele haber mayor carencia de agua y minerales.

A pesar de que otros compuestos cumplen algunas de las características que hemos citado no se consideran hormonas. Así, los iones inorgánicos como el Ca²⁺ y el K⁺ pueden causar respuestas fisiológicas en las plantas y ser traslocados, aunque no son sintetizados por éstas. Otros compuestos son sintetizados por la planta, se traslocan y, al mismo tiempo, causan efectos importantes sobre el metabolismo de la planta. Este es el caso de los azúcares (sacarosa, polialcoholes, etc.), pero éstos tampoco se consideran hormonas vegetales. Este ejemplo es extensivo a compuestos como aminoácidos, otros azúcares, ácidos orgánicos y otros metabolitos, que suelen estar presentes en las plantas y suelen inducir respuestas

en concentraciones que oscilan entre 1 mM y 50 mM (Salisbury y Ross, 1992).

1.1.2. Reguladores del desarrollo no hormonales

Existen otros compuestos que pueden afectar directamente al control de los procesos hormonales y que, sin embargo, tienen medios de actuación diferentes a las hormonas porque, por ejemplo, requieren concentraciones mucho más altas. Estamos hablando de compuestos como brasinosteroides, jasmonatos, salicilatos y poliaminas. Todos ellos poseen capacidad para actuar como potentes reguladores del crecimiento, aunque no se consideran hormonas (Chanda et al, 1998; Dominguez y Edwards 1998; Stahl et al, 1999; Maas, 1999; Rajasekaran y Blake 1999; Kintzios y Lympelopoulos, 2000).

Los brasinosteroides influyen en la elongación de los tallos, inhiben el crecimiento radicular y promueven la síntesis de etileno y la epinastia (Salisbury y Ross, 1992). Por otro lado, los salicilatos son intermedios de las respuestas a los ataques de patógenos, así como de la producción de proteínas de respuesta (PR). También incrementan la longevidad de las flores, inhiben la síntesis del etileno, la germinación de semillas y, al mismo tiempo, bloquean las respuestas a heridas. Los jasmonatos inhiben procesos de crecimiento y germinación, promueven la senescencia, la abscisión, la maduración de frutos, etc. y también inducen la síntesis de proteinasas durante procesos de ataques patogénicos.

Por ultimo, se encuentran las poliaminas, las cuales afectan principalmente a procesos de crecimiento y división celular. De ellas

que trataremos más detalladamente en apartados sucesivos (Arteca, 1996; Salisbury y Ross, 1992; Evans y Malmberg, 1989).

Actualmente la investigación de la aplicación de reguladores de crecimiento en el campo se centra en la búsqueda de nuevos compuestos naturales o en la obtención de compuestos naturales modificados químicamente. De este modo se evitan los problemas que conlleva el uso de hormonas vegetales. En contrapartida surge una nueva polémica debido a la baja actividad reguladora de crecimiento de estos nuevos compuestos, ya que es necesario usarlos en dosis muy elevadas, cosa que no es deseable por razones ecológicas (Karanov et al, 1995). En este aspecto recientemente se han estudiado las propiedades reguladoras de compuestos naturales como el ergosterol y el isoergosterol. Introduciendo pequeñas modificaciones en su estructura puede inducir la síntesis de betacianinas y, al mismo tiempo, emular una actividad similar a las citoquininas. De hecho, estos compuestos estimulan la síntesis de betacianinas en dicotiledóneas, aumentan la retención de clorofila (retrasando la senescencia de plántulas) e inducen el crecimiento en cotiledones aislados (Karanov et al, 1995).

1.1.3. Papel de los ácidos carboxílicos como reguladores del desarrollo

Entre otros compuestos de origen natural con propiedades reguladoras de crecimiento o bioestimulantes se encuentran los aminoácidos y los ácidos carboxílicos de cadena corta (Stutte, 1990; Cortellini y Maini, 1994; Muñoz 1994; Alexieva, 1994). De estos últimos

existen pocos estudios relativos a sus propiedades como reguladores de crecimiento. Sin embargo, hay evidencias suficientes como para afirmar que son compuestos con alto potencial regulador y bioestimulante.

Como hemos visto, algunas de las propiedades de los reguladores de crecimiento se basan en modificar funciones básicas del metabolismo, tales como los transportes de nutrientes y carbohidratos, la asimilación de nutrientes y, en definitiva, la fenología del crecimiento de las plantas.

Stutte (1990) demostró que es posible incrementar la tasa de absorción de agua en plantas de algodón mediante aplicaciones de ácidos polihidroxicarboxílicos. Al mismo tiempo, estos ácidos producen incrementos en la absorción de P, Ca, K y Mg, aumentando la acumulación de materia seca en los cultivos tratados, que, además, muestran una mayor tolerancia a condiciones de estrés. Clark (1992) y Guo et al (1993) mostraron que las aplicaciones del ácido trihidroxiglutarico aumentaban las tasas de polioles circulantes en hojas y tallos de algodón y esto, posiblemente, se debía al incremento de la tasa fotosintética observada.

Los ácidos carboxílicos también muestran cierta capacidad para modular la respuesta a patógenos. Muñoz (1994) realizó una experiencia en la que hizo aplicaciones sucesivas de ácidos carboxílicos en un cultivo de algodón, del cual se conocía que anualmente era atacado por plagas endémicas de mosca blanca (*Bermisia tabaci* (Genn.) tipo B); los resultados mostraron que las plantas que habían sido tratadas presentaban reducciones poblacionales de mosca significativas.

Stutte (1990) mostró el efecto del ácido trihidroxiglutarico (TOG) sobre el ciclo de las pentosas fosfato. Las aplicaciones de TOG provocan una estimulación del ciclo de las pentosas fosfato, lo que puede repercutir en un aumento de poder reductor (NADPH) y de la síntesis eritrosa 4-fosfato, ambos componentes esenciales en la síntesis del polímero lignina (Salisbury y Ross, 1992), isoprenoides y fitoalexinas de origen fenólico y terpenoide (Taiz y Zeiger, 1991).

Muñoz (1994) estudió el efecto de los ácidos dicarboxílicos sobre la toma de nutrientes en cultivos de algodón en campo. El ácido trihidroxiglutarico incrementa la tasa de asimilación de nutrientes cuando se aplica conjuntamente al suelo y a las hojas. También induce un crecimiento más rápido y una mayor diferenciación celular, promoviendo una mayor cantidad de flores y bellotas en plantas de algodón. Un año más tarde, Muñoz (1995) mostró que las aplicaciones combinadas del ácido trihidroxiglutarico junto con nitrato potásico vía foliar inducían un aumento en todos los contenidos minerales foliares en un cultivo de algodón, provocando un incremento de la cosecha.

A partir del año 1995 aparecieron nuevas publicaciones relacionadas con el uso de otros ácidos carboxílicos como el monoetiléster del ácido itacónico, el monoetiléster del ácido succínico y el monoetiléster del ácido adípico.

Mediante el uso de los monoetilésteres del ácido itacónico y el ácido adípico es posible incrementar la superficie foliar en plantas de cebada (Alexieva y Karanov, 1987a). Además, dichos compuestos afectan a la capacidad fotosintética de las hojas, así como a la apertura estomática en cultivos de caña de azúcar (Kudrev y Petrova, 1975), soja (Georgiev y Karanov, 1989) y maíz

(Georgiev et al, 1991). Estos ácidos incrementan la tasa fotosintética y actúan como antitranspirantes, aumentando la actividad 1,5-bifosfato ribulosa carboxilasa (Rubisco) en plantas de soja (Velichov et al, 1989). Todorov et al (1992) demostraron en maíz, que entre los monoésteres etílicos de los ácidos itacónico, succínico y adípico, este último poseía los mayores efectos en el retraso de la senescencia de hojas, inhibiendo la clorofilasa e incrementando la concentración foliar de clorofila, igualmente se inducía un aumento en la concentración foliar de proteína, se reducía la actividad peroxidasa y se aumentaba el uso eficiente del agua.

Los efectos que ejercen los ácidos dicarboxílicos sobre el metabolismo de plantas de maíz, soja y trigo parecen centrarse en la capacidad para retrasar la senescencia de estos cultivos, mejorando el crecimiento y aumentando la absorción de nutrientes. En este sentido, Todorov y Karanov (1995) demostraron que el ácido adípico aplicado en dosis de 1250 ppm reduce la ratio raíz/brotes. A pesar de que la mayoría de los esteres etílicos de ácidos dicarboxílicos incrementan la asimilación de N, P y K, el monoéster del ácido adípico no parece afectar a la asimilación de estos minerales en plantas de maíz tratadas (Todorov y Karanov, 1995).

Un aspecto más agronómico del uso del ácido adípico en cultivos de campo fue estudiado por Muñoz (1997). El uso de este ácido influye notablemente sobre los rendimientos de cosechas de melón, melocotón y tomate de industria y en la calidad de fruto de manzana y tomate, mejora los contenidos en azúcares, aumenta la vida post-cosecha y reduce la presencia de fisiopatías en los frutos.

Otro aspecto destacable de los ácidos carboxílicos alifáticos es la capacidad de actuar como compuestos antimicrobianos, sin

embargo, este efecto todavía no ha sido muy estudiado. Respecto a los ácidos carboxílicos aromáticos, es decir, ácidos fenólicos del tipo ferúlico, cafeico, clorogénico, hidroxicinámico, cumárico, etc., si existen datos sobre su capacidad fungitóxicas (Dixon et al, 1983). En ensayos *in vitro* se ha podido demostrar que una solución de ácidos fenólicos inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos (Prego et al 1997). Existen otros trabajos en los que se ha demostrado la efectividad de diferentes ácidos carboxílicos en la inhibición del crecimiento de nemátodos (Djian et al, 1994). La toxicidad de los ácidos carboxílicos frente a nemátodos es superior en ácidos alifáticos respecto a la de los ácidos aromáticos, al mismo tiempo el pH afecta decisivamente a la efectividad como nematocidas de los ácidos carboxílicos, siendo superior cuanto menor es el grado de ionización de los ácidos. Posiblemente debido a este efecto, los ésteres etílicos y metílicos, en mayor medida, se muestran muy efectivos como nematocidas, independientemente del pH, ya que su nula capacidad para ionizarse les facilita la entrada a través de las membranas de los nemátodos (Djian et al, 1994). La presencia de insaturaciones con una conformación *trans* resulta tener una mayor capacidad nematocida que cuando se trata de conformaciones *cis* o de ácidos saturados, posiblemente debido a la esteroespecificidad de las esterasas muy abundantes en las membranas de los nemátodos (Djian et al, 1994). Los ácidos dicarboxílicos se muestran más activos como nematocidas que los monocarboxílicos, sin que afecte mucho el número de carbonos que conforman la cadena alifática del ácido carboxílico. Todo parece indicar que la capacidad de penetración de los ácidos a través de las membranas de los gusanos es fundamental para manifestar una actividad tóxica.

La capacidad tóxica se reduce cuando se utilizan derivados hidroxilados o muy polares (McLaren et al, 1987; Wright, 1987).

Algunos ácidos carboxílicos no ionizables presentan propiedades tóxicas frente a bacterias.

Aunque se ha demostrado la especificidad de los ácidos carboxílicos por diferentes especies microbianas, existen derivados como el bis(carbometoximetil)adipato, que presenta un carácter antimicrobiano generalizado frente a mohos, levaduras y bacterias, tanto gram-positivo como gram-negativo (Bailey et al, 1988).

Sin entrar en el amplio metabolismo que los ácidos carboxílicos juegan en las plantas, podemos citar una de las propiedades de estos ácidos como respuesta de defensa frente a estreses hídricos. Timpa et al (1986) demostraron que la deficiencia hídrica provoca una acumulación de carbohidratos acompañada por una hidrólisis en las reservas de almidón de la planta, en un intento de aumentar la presión osmótica y aumentar la retención del agua reduciendo la transpiración estomática (Eatos y Ergle, 1948; Eatos, 1955). Al mismo tiempo, los estreses hídricos provocan un aumento en la concentración de ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos procedentes del ciclo de Krebs, ácidos málico, oxálico y cítrico, posiblemente como consecuencia de un aumento de la respiración mitocondrial (Eatos et al, 1949).

1.1.4. Papel de las poliaminas como reguladores del desarrollo

Otro campo de investigación que está mas extendido es el estudio de las aminas y poliaminas como reguladores de crecimiento. La mayoría de estos estudios se basan en las funciones que las poliaminas tienen en el metabolismo vegetal. Las poliaminas vegetales endógenas que más se conocen son: la putresceína, la espermidina, la espermina y la cadaverina. Las poliaminas pueden unirse a los ácidos nucleicos debido a su naturaleza catiónica y de esta forma modificar su expresión (Flink y Pettijohn, 1975). También pueden actuar como mensajeros secundarios en procesos de señalización hormonal (Davies, 1987; Galston, 1983).

La actividad de las poliaminas en las plantas puede llevarse a cabo en forma catiónica individual o formando conjugados con compuestos fenólicos, como la hidroxicinamoilputresceína, la cafeoilespermidina, la feruloilputresceína, etc. (Evans y Malmberg, 1989). Su participación en el metabolismo de las plantas está regulada por la actividad de enzimas degradativas de poliaminas, que se conocen como poliaminas oxidasas (PAO). Es importante destacar que tanto la espermidina, como la espermina, por mediación de la PAO, se transforman en diaminopropano, que es el compuesto precursor de la síntesis de la alanina (Evans y Malmberg, 1989). Generalizando, las poliaminas intervienen activamente en procesos de división celular, embriogénesis, iniciación floral, desarrollo de los frutos, procesos de senescencia (Evans y Malmberg, 1989; Smith 1985) y, en colaboración con compuestos hormonales, como parte de la cadena de transmisión de señal (Bagni, 1966). La putresceína y la espermidina son precursores de la síntesis del etileno

por mediación de la S-adenosin metionina descarboxilasa que, por descarboxilación, sintetiza S-adenosin metionina (SAM), precursor del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y del etileno.

Actualmente se sabe que las poliaminas se sintetizan en las plantas como respuesta al estrés. Algunos autores afirman que la síntesis de putresceína tiene por objeto proteger a la planta del estrés (Hiatt y Malmberg, 1988). Los principales factores de estrés que inducen la síntesis de poliaminas son: las carencias nutricionales de K^+ , Mg^{2+} y SO_4^{2-} (Richards y Coleman, 1952; Smith, 1985; LeRedulier y Goas, 1975), los metales pesados (Weinstein et al, 1986), la reducción de turgencia en hojas y las bajas o altas temperaturas (Slocum et al, 1984).

Otra fuente importante de estrés que puede inducir la síntesis endógena de poliaminas son los daños producidos por el ozono (Bors et al, 1989). Los principales problemas que genera el ozono proceden del aumento de radicales oxidantes en las plantas. Algunos estudios muestran que las aplicaciones exógenas de poliaminas pueden suprimir los daños producidos por el ozono en plantas de tomate. Bors et al (1989) demostraron que la aplicación de poliaminas en la raíz de plantas de tomate reducía la necrosis producida por el ozono en las hojas.

Los principales compuestos poliamínicos que se inducen por estreses oxidativos son conjugados entre ácidos fenólicos y poliaminas, como es el caso de la cafeoilputresceína. La capacidad protectora de las poliaminas aplicadas exógenamente frente al ozono se debe a la inducción de la síntesis de estos conjugados poliamina-fenol, aunque no queda clara la forma en la que se producen las reacciones en el interior celular. Por un lado, las

poliaminas, en forma libre o conjugada, se unen fuertemente a los ácidos nucleicos y parece ser que ejercen un papel protector a nivel transcripcional. De forma similar, las poliaminas se unen a lípidos de membrana proporcionando la protección de los mismos.

Las poliaminas libres apenas tienen capacidad para reaccionar con los radicales libres generados por estreses, especialmente el ozono, por tanto, no son capaces de detoxificarlos. Por el contrario los conjugados fenol-poliamina sí poseen una elevada capacidad para reaccionar con los radicales libres. Los compuestos fenólicos en las plantas tienen limitados sus movimientos, ya que representan un tóxico para la propia célula. Sin embargo, los conjugados con poliaminas son estables en la célula y no producen ninguna toxicidad para la planta. Debido a la elevada reactividad de los radicales que se generan por diferentes estreses, es necesario que aquellos detoxificantes capaces de eliminarlos estén físicamente próximos en la célula. La mayoría de los radicales se producen en la capa acuosa que rodea a las células del mesófilo y en las paredes celulares asociadas al plasmalema. En esta zona se ha encontrado que las poliaminas están asociadas a la pared celular y a las membranas en estado libre, como conjugados con ácido hidroxicinámico, o incluso unidas a la fracción péctica (judía). Todo parece apuntar a que los conjugados poliamina-fenol protegen a las membranas celulares de la lipoperoxidación, de modo que aseguran la estabilidad de la membrana (Bors et al, 1989).

Las poliaminas no son fácilmente transportables a lo largo de la planta. Algunos estudios demuestran que el efecto producido en las hojas por las poliaminas aplicadas a la raíz, se debía más a la

inducción de la síntesis de poliaminas endógenas que al propio transporte de las poliaminas exógenas aplicadas a la raíz.

Las poliaminas son compuestos que generalmente están protonados a pH fisiológico, esto, acompañado de su capacidad para unirse a membranas y paredes celulares, hace pensar que su transporte a lo largo de la planta es más bien limitado (Young y Kauss, 1983). Sin embargo, estudios con marcaje radiactivo demostraron que existe un transporte de putresceína y espermidina entre pétalos, raíces y tallos (Young y Galston, 1983). Otros estudios demostraron que existe un flujo de poliaminas en exudados xilemáticos y en savia floemática. La acumulación de putresceína en hojas bajo condiciones de estrés salino se debe a un transporte xilemático de poliaminas radiculares (Friedman et al, 1986). La capacidad de transporte de las poliaminas depende, entre otros factores, del grado de aminación del compuesto (Cheng y Kao, 1983), así pues la diaminopopano y la espermidina tienen más movilidad que la espermina.

Las poliaminas participan activamente en los procesos de senescencia. La mayoría de estos procesos afectan a la estabilidad del aparato fotosintético y a las propiedades de los cloroplastos (Dodge, 1970; Thomas, 1975). Algunos estudios demuestran que las citoquininas pueden retrasar la pérdida de proteínas, pigmentos fotosintéticos y preservar la estructura de los cloroplastos y de la cadena de transporte electrónico (Galston et al, 1978). Un efecto similar se ha observado con el uso de poliaminas exógenas, ya que éstas pueden retrasar la senescencia de protoplastos aislados de hojas (Galston et al, 1978). Del mismo modo, se ha observado que algunos cationes divalentes inorgánicos como el calcio y el

magnesio retrasan la degradación de estructuras protéicas y estabilizan las membranas de cloroplastos y bacterias (Harold, 1964; Tabor, 1962; Cohen y Zalik, 1978). Hoy se sabe que las poliaminas, debido a su naturaleza catiónica, pueden simular, en parte, las propiedades de estos cationes inorgánicos en sus funciones de retraso de la senescencia en sistemas in vitro (Cohen y Zalik, 1978), aunque esto entra en contradicción con su estado de protonación a pHs fisiológicos.

La pérdida de la actividad fotosintética en procesos de senescencia inducidos por oscuridad permanente pasa por una degradación de los anclajes protéicos que sujetan a la clorofila a las membranas de los tilacoides. Cohen et al (1979) demostraron que los tratamientos sobre plantas con soluciones acuosas de poliaminas afectan a la degradación de la clorofila, a la ultraestructura de los cloroplastos y a la actividad fotoquímica de discos de hojas de cebada, debido a que las poliaminas mantienen las proteínas y la clorofila, impidiendo la pérdida de los anclajes protéicos de la clorofila y alargando así la estabilidad de los complejos fotosintéticos.

La espermidina, la espermina y la diaminopropano retrasan los procesos de senescencia en oscuridad en hojas escindidas, pero en presencia de luz todas promueven la degradación de la clorofila. Esta degradación se revierte con un aporte suficiente de potasio a los cloroplastos y también por la aplicación de inhibidores de la síntesis endógena de poliaminas (Cheng et al, 1984). Estudios posteriores demostraron que para degradar de la clorofila en presencia de luz se requería la conversión de la espermidina y de la espermina en diaminopropano (Cheng et al, 1984). Si se utiliza una dosis muy superior a las que suelen presentar las poliaminas

endógenas (>50 mM) se produce una excesiva rigidez de la membrana celular y se inhibe el influjo de K⁺ y el eflujo de H⁺ desde los cloroplastos (Agazio et al, 1988) Posiblemente por este motivo se provoca la degradación de la clorofila en presencia de luz. Agazio et al (1988) estudiaron que existe una dependencia entre los efectos de retraso de la senescencia mediante el uso de poliaminas exógenas y la concentración de poliaminas utilizadas.

Recientemente Zehleva y Karanov (1994), demostraron la relación directa entre las aplicaciones exógenas con poliaminas a una concentración de 1 mM, y el incremento endógeno de los niveles de poliaminas, especialmente de la fracción soluble extraída con ácido tricloroacético (TCA). En estos trabajos se esclarece el papel protector de las poliaminas espermidina, espermina y putresceina frente a aplicaciones exógenas con antrazina. El mecanismo de protección frente a la antrazina pasa por un incremento del crecimiento, un aumento de los contenidos de clorofila y proteínas solubles, un incremento en la síntesis de novo de proteínas, un aumento del intercambio gaseoso y un incremento en la actividad fotoquímica del fotosistema II.

Las aplicaciones de poliaminas exógenas tienen un efecto directo en el retraso de la senescencia debido principalmente a dos mecanismos. Primero, incrementan la concentración del conjunto de poliaminas endógenas y, segundo, inhiben la conversión del ACC en etileno y se retrasa la síntesis de etileno (Apelbaum et al, 1981; Apelbaum et al, 1985). Estas aplicaciones también provocan la inhibición de RNAsas y proteasas de un modo similar a como lo hacen las citoquininas aplicadas exógenamente. Las dosis de poliaminas empleadas para conseguir este efecto son 100 veces

superiores a las que se usan con las citoquininas (10 mM para poliaminas, frente a 0.1 mM para citoquininas).

También se sabe que la putresceína estimula el crecimiento radicular generando un mayor número de raíces adventicias en achicorias (Bais et al, 1999). El efecto que estas aminos ejercen en las raíces facilita el transporte de oxígeno y metabolitos a través de las membranas mitocondriales y membranas simbióticas en nódulos de *Galea orientalis* (Vassileva y Ignatov, 1999).

Otro aspecto importante de las poliaminas es el papel que juegan en el metabolismo de hongos fitopatógenos. Evans y Malmberg (1989) describieron una serie de compuestos que son inhibidores de la síntesis de poliaminas, tales como el α -difluorometilornitina (DFMO) y α -difluorometilarginina (DFMA). Rajam et al (1985) y West y Walter (1988) demostraron que los inhibidores de la síntesis de poliaminas como el DFMO pueden controlar el desarrollo de hongos biotrópicos. Las poliaminas son imprescindibles para el metabolismo de los hongos y la imposibilidad de sintetizarlas produce la muerte del mismo. Una alternativa utilizada para inhibir la síntesis de poliaminas fúngicas es la aplicación de análogos de poliaminas (Porter y Sufrin, 1986). Foster y Walters (1993) demostraron que la cetoputresceína, un análogo de la putresceína, poseía propiedades fungicidas. Más adelante, Havis et al (1994) comprobaron que otro análogo de la putresceína, el (E)-1,4-diaminobut-2-eno (E-BED) es capaz de controlar cinco patógenos típicos de cosechas, *Erysine graminis* DC f.s.p. *hordei* Marchal, *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) Schroet, *Botrytis fabae* Sardina, *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) Salm. y la *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary. Fundamentalmente los análogos de poliaminas aplicados sobre cultivos de hongos

alteran la biosíntesis de las poliaminas de hongos lo que pone de manifiesto su carácter funguicida. La actividad funguicida se manifiesta mediante la acumulación excesiva de putresceína (isómero E-BED), por inhibición de la síntesis de espermidina (isómero Z-BED) o bien por inactivación de la enzima S-adenosilmetionin Descarboxilasa (AdoMetDC). Esta alteración tiene un carácter funguicida, lo que implica que algunas poliaminas pueden utilizarse para el control alternativo de enfermedades típicas de los cultivos como mildius y podredumbres de frutos (Havis et al, 1994a).

Las aminos cíclicas también poseen capacidad para inhibir el crecimiento de hongos que causan podredumbres y mildius (Havis et al, 1997). El mecanismo por el que logran reducir el crecimiento de los hongos no se conoce del todo, pero se sabe que las poliaminas cíclicas afectan al metabolismo de las aminos endógenas del hongo. Estas aminos no son capaces de inhibir las enzimas que están implicadas en la síntesis de las poliaminas fúngicas, pero, no obstante, reducen los niveles de putresceína y espermina, y apenas afectan al metabolismo de la espermidina. Donde sí parecen actuar es en el proceso de reciclaje de las poliaminas, impidiendo su catabolismo (Bitonti, 1985).

En lo referente al trabajo que se desarrollará en los apartados siguientes, los procesos metabólicos de las poliaminas que más nos interesan son aquellos que afectan a las repuestas vegetales cuando se hacen aplicaciones externas de poliaminas, especialmente en relación a los procesos de senescencia, procesos oxidativos y estimulación del crecimiento, así como las relaciones entre las poliaminas y el metabolismo de hongos.

1.2. Mecanismos de defensa de plantas que se desencadenan durante ataques patogénicos

1.2.1. Comentarios generales

Las plantas superiores están expuestas al ataque de un gran número de microorganismos. Sin embargo, la mayoría de ellos son incapaces de atacar con éxito a las plantas debido a los mecanismos de defensa que éstas poseen.

Actualmente existen muchos estudios acerca de los mecanismos que actúan en la interacción planta-patógeno, pero aún quedan muchos pasos metabólicos por descubrir, sobre todo, en lo referente al metabolismo intracelular y a la interacción a nivel de tejido o superficie celular.

Se han realizado innumerables trabajos sobre la inducción de sistemas de defensa en células vegetales (Howell et al 2000; Bavaresco et al, 2000), pero no se conoce todo el mecanismo debido a las numerosas variables que intervienen en esta interacción, variables que dependen del tipo de patógeno y de la variedad de la planta entre otros muchos factores. Las plantas sometidas a situaciones desfavorables desencadenan una serie de mecanismos que pueden ser incluidos como reacciones ante el estrés (Mahboobi et al, 2000; Smith et al 2000; Blok et al, 2000). En el presente trabajo se prestará especial atención a las acciones que se desencadenan cuando se produce un ataque por hongos. Las respuestas frente a hongos son variables y específicas de variedades,

familias o razas. Sin embargo, también existen respuestas de defensa generales que se activan de modo muy similar sea cual sea el agente estresante.

En casi todos los mecanismos de defensa participa de alguna manera la pared celular (McNeil et al, 1984). Ésta constituye la primera barrera física contra el ataque de microorganismos, ya que sus poros son demasiado pequeños para poder permitir incluso el paso de virus. Por tanto, los patógenos se ven obligados a degradar la pared celular para poder entrar en la célula vegetal. Esto implica la participación de distintas enzimas específicas y de una gran variedad de componentes presentes en la propia pared.

Las paredes celulares presentan modificaciones estructurales en respuesta a las infecciones. Estas modificaciones, que aumentan su resistencia a los microorganismos, afectan tanto a los polisacáridos como a los componentes no glucídicos de la pared (Hahn et al, 1989). Entre ellas cabe destacar la lignificación, la acumulación de proteína rica en hidroxiprolina y los depósitos de calosa. Estos procesos se desencadenan mediante señales originadas en las primeras fases de la interacción microorganismo-huésped, dando lugar al aumento de la síntesis de los distintos componentes. Al menos en el caso de la lignificación y de las proteínas ricas en hidroxiprolina, la activación tiene lugar a nivel de expresión génica.

La pared celular también participa en la inducción de mecanismos por los que se ponen en marcha las defensas activas (Grisebach y Börner, 1982). Uno de los mecanismos por los que las plantas resisten a la invasión de microorganismos es la acumulación de fitoalexinas en el lugar de la infección. Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, que se

sintetizan y acumulan en las plantas después de la exposición a microorganismos. Ni las fitoalexinas ni las enzimas que las sintetizan aparecen de modo significativo en plantas sanas, sintetizándose *de novo* cuando las plantas se someten a estrés (patógenos u otras condiciones ambientales adversas), aunque si pueden estar presentes sus precursores más directos. La producción de fitoalexinas se inicia por la acción de factores conocidos como elicitores, que pueden ser tanto exógenos, producidos por los patógenos, como endógenos, producidos por las plantas. Entre los distintos tipos de elicitores más conocidos, cabe destacar a los oligosacáridos que proceden de las paredes celulares de hongos patógenos o de las células huésped. Estos elicitores reciben el nombre de oligosacarinas. La figura 1 muestra un esquema de la mediación de la pared celular en la respuesta a elicitores.

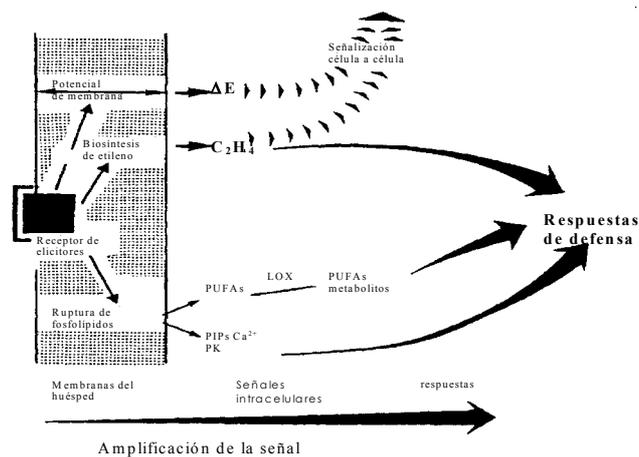


Figura 1. Efectos moleculares en el ámbito de metabolismo secundario, desencadenados por elicitores de diversa procedencia, en el transcurso de la interacción planta-patógeno. ΔE : variaciones en el potencial de membrana, PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados, PIPs: fosfoinositólidos, PK: proteína quinasa, LOX: lipoxigenasa.

Los mecanismos activados en procesos de infección fúngica además de afectar a la pared celular, producen cambios citoplasmático, mediante una cadena de transducción de señal que se amplifica y tiene por función inducir repuestas de defensa en la célula atacada y en las de alrededor. Los cambios dentro de la célula consisten en síntesis de enzimas proteolíticos, de fitoalexinas y la respuesta hipersensible.

Como última generalización se puede decir que la reacción de la planta frente al patógeno es compatible cuando ésta es susceptible y el patógeno virulento. Si por el contrario la planta es resistente y el patógeno avirulento se dice que la reacción es incompatible (Alfano y Collmer, 1996).

Para una mejor comprensión de los procesos que afectan a la interacción planta-patógeno, describiremos los principales efectos que se desencadenan en las plantas y en los hongos cuando se produce un ataque patogénico por hongos.

1.2.2. Mecanismos fúngicos en interacciones planta-hongo

El proceso infectivo de los hongos sigue una serie de etapas que se denominan patogénesis, durante la cual los patógenos solapan sus ciclos vitales con los de la planta (Roberts y Boothroyd, 1984). En un sentido amplio, la patogénesis consta de una fase no-asociativa, que incluye desde la producción del inóculo fúngico sobre la fuente de inóculo hasta el contacto de aquél con la zona de penetración de la planta, y de una fase asociativa, que

comprende una serie de actividades del hongo sobre los tejidos vegetales, que dan lugar al daño fisiológico de éstos. (Ver ciclos infectivos en el anexo I).

Knogge (1996) describe un modelo de interacción planta-hongo según el cual la penetración activa del hongo se produciría a través de la cutícula y la pared celular epidérmica. La cutinasa juega un papel fundamental para la infección puesto que si esta actividad es inhibida no se produce infección, aunque esto varía dependiendo de la especie del hongo. El siguiente paso de la infección es la secreción de toxinas para alterar la fisiología hormonal de la planta en beneficio del patógeno.

Un aspecto destacable de la capacidad patogénica de los hongos es que son los únicos patógenos para los que se han descrito toxinas selectivas de huésped, conocidas como HSTs (Walton, 1996), toxinas que provocan reacciones de compatibilidad en las células vegetales. En general, las HSTs provocan la salida de los nutrientes del interior de la célula hacia el apoplasto, de modo que puedan ser aprovechados por el hongo. Estas toxinas presentan movilidad en el interior de la planta y tiene diversos modos de actuación, lo que implica un control genético de la susceptibilidad en el huésped (Walton, 1996).

Otros procesos patogénicos llevados a cabo por los hongos son las alteraciones del metabolismo hormonal en cuanto a regulación y crecimiento. Los hongos producen reguladores de crecimiento, a veces por las mismas rutas biosintéticas que las plantas.

El movimiento de los hongos en un tejido infectado es muy limitado, por lo que su capacidad de alimentarse está más

restringida que en los insectos. Por ello la única posibilidad que tiene para mejorar la calidad de los alimentos es redirigir el micelio hacia zonas más ricas. La ventaja de los hongos frente a insectos es que éstos pueden adaptar sus necesidades alimenticias a la disponibilidad del alimento. Por ejemplo, *Polyporus verticolor* puede variar su ratio C/N desde 1600:1 hasta 4:1 en función de la disponibilidad de N (Levi y Cowling, 1969).

Algunas fitoalexinas pueden ser desactivadas y probablemente también catabolizadas por hongos generando productos de menor toxicidad (Fig 2). La resistencia de los diferentes patógenos a estos biocidas permite hacer la clasificación entre cepas avirulentas y virulentas, siendo estas últimas capaces de soportar grandes concentraciones de fitoalexinas. Un ejemplo de la detoxificación de fitoalexinas es la conversión de la faseolina a hidrofaseolina. Esta fitoalexina es oxidada por el hongo *Fusarium solani*, que es un agente patogénico del guisante (Grisebach y Evel, 1978).

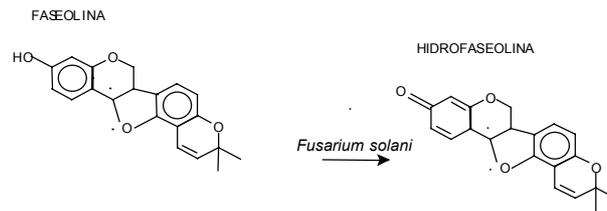


Figura 2. Desactivación de fitoalexinas.

Otro mecanismo fúngico puede ser la inhibición de elicitores, por factores competitivos o por inactivación del elicitor previa a la unión al sitio de acción en las células de la planta. Esto se conoce

como inducción de susceptibilidad o supresión de respuesta hipersensible.

Aquellos patógenos que no son capaces de detoxificar las fitoalexinas vegetales sufren alteraciones cuando se exponen a su actividad. Un ejemplo es el hongo *Botrytis cinerea* que es sensible al resveratrol, mostrando alteraciones en el crecimiento micelar y en la germinación de conidios (Hoos y Blaich, 1990). Este hongo también es sensible al pterustilbeno que produce la destrucción de los ribosomas y de la membrana mitocondrial, del RE y del núcleo (Pezet y Pont, 1990).

1.2.3. Mecanismos naturales desencadenados en la planta por la infección de patógenos

Dada la similitud de respuestas que se producen en las plantas cuando hay un ataque patogénico, una herida por insectos, una herida mecánica, una toxicidad por metales pesados, anoxias, luz UV, etc., hay autores que clasifican todas estas respuestas como respuestas frente al estrés. Estas respuestas poseen características metabólicas similares en las plantas, aunque con matices diferenciales (Ayres, 1992).

En general, cabe distinguir dos tipos de estreses: abióticos y bióticos. Los primeros son provocados por factores ambientales físicos y/o químicos, mientras que los bióticos son producidos por la acción de otros seres vivos (agentes patogénicos, otros vegetales, animales, etc.).

Si bien cada tipo de estrés desencadena unos mecanismos de respuesta diferente, hay una respuesta que es común a ambos tipos de estreses es la síntesis de compuestos fenólicos, por estimulación de la enzima fenilalanina amonio liasa, que responde a la luz UV y a elicitores bióticos (Heath, 1991).

Los estreses abióticos desencadenan en las plantas procesos de lignificación, deposición de proteínas ricas en prolina, deposición de calosa, etc (Liang et al, 1989).

Dentro de los estreses bióticos, las respuestas son muy variadas dependiendo del patógeno, por lo que nos centraremos en los mecanismos de respuesta de las plantas frente a hongos. Estos mecanismos de respuesta pueden ser activos o pasivos. Los activos inciden directamente sobre el metabolismo de la planta en contra del hongo. Los pasivos son inhibidores del crecimiento del hongo.

Las principales respuestas de defensa de la planta implican la acción de un sistema metabólico multicomponente que incluye mecanismos constitutivos, presentes en la planta sana antes de la interacción con el patógeno, y mecanismos inducidos, inducidos como consecuencia de la infección (Isaac, 1992).

Los mecanismos constitutivos suelen ser de tipo estructural (topología de la superficie vegetal) como la estructura de la cutícula, la cera epicuticular y la pared celular. Puede haber otros mecanismos constitutivos de naturaleza química, como compuestos sintetizados previamente que son almacenados en compartimentos celulares y se liberan durante las interacciones con patógenos. Algunos ejemplos son los compuestos fenólicos, el catecol, el ácido protocatecuico, las saponinas, etc. Estos compuestos constitutivos suelen estar implicados en las interacciones incompatibles con los

hongos, ya que impiden que se llegue a producir una interacción patogénica en toda su magnitud.

Los mecanismos inducidos están relacionados con la muerte celular hipersensible, lo que implica relaciones gen a gen (patógeno-planta). La reacción se inicia con el reconocimiento de un elicitor (el patógeno) y continúa con la estimulación de un gen de reconocimiento que desencadena una respuesta en cascada. Las características generales de la muerte hipersensible incluyen un rápido incremento oxidativo, un flujo iónico caracterizado por intercambio K^+/H^+ , una descompartimentalización celular (liberación de sustancias), reforzamiento de pared celular, producción de fitoalexinas e inducción de proteínas de defensa como glucanasas y quitinasas (proteínas en general con altos contenidos en cisteína y con carácter antifúngico).

Las defensas activas se han clasificado en tres grupos de repuestas. Un primer grupo se localiza en las células que directamente han sido atacadas por el patógeno. Este tipo de respuestas abarca el reconocimiento directo de moléculas señalizadoras de patógenos que suelen ser fundamentales para su patogeneidad. El resultado de estas respuestas suele ser la muerte celular programada también conocida por algunos autores como respuesta hipersensible (HR). El segundo grupo de respuestas afecta a las células que rodean la zona de la infección, y está provocada por una señal inducida por moléculas difusibles, denominadas elicitores (Hutchison et al, 1995; Rich et al, 1977; Dawson y Hiff, 1992). El último grupo de respuestas se conoce como repuesta sistémica adquirida (SAR). Ésta se produce a largas distancias en la planta y

puede llegar a tener carácter residual (Delaney et al, 1994; Rhodes et al, 1996; Sanchez-Casas y Klessig, 1994).

La respuesta hipersensible es una de las respuestas más comunes al ataque de hongos, bacterias y virus. Es una respuesta rápida y localizada, producida por microorganismos avirulentos. Esta respuesta está asociada con reacciones locales y sistémicas (SAR) que están mediadas por la deposición de callosa, la lignificación, la síntesis de proteínas ricas en hidroxiprolina y prolina y la síntesis de quitinasas, glucanasas y fitoalexinas. Todos estos procesos, cuando se producen de modo sistémico, están mediados por el ácido salicílico o por otro mensajero de señales de defensa (Malamy et al, 1990).

La muerte celular programada es relativamente rápida ya que normalmente dura menos de 6 h. Las primeras manifestaciones se producen en las membranas celulares. En menos de una hora tras la infección de un patógeno, comienza a producirse la peroxidación lipídica, un eflujo de K^+ y un influjo de Ca^{2+} . Esto produce la despolarización de la membrana y el desencadenamiento de los procesos oxidativos. Al mismo tiempo, se producen cambios morfológicos en la célula, como la vacuolización del citoplasma, la degradación del RNA y la activación de endonucleasas, que producen la fragmentación del DNA cromosómico.

La respuesta sistémica adquirida (SAR) se produce a largo plazo en las plantas y se extiende a la totalidad de los tejidos de las mismas. Esta respuesta puede tener incluso efectos residuales de modo que la planta sea capaz de responder más rápidamente a ataques similares que se hayan producido anteriormente (Stitcher et al, 1997). La repuesta SAR puede ser inducida por compuestos inorgánicos (Gottstein y Kuc, 1989; Reuveni et al, 1994; Walters y

Murray, 1992), por compuestos sintéticos como el propenazol (Sekizawa y Mase, 1980) y también por compuestos orgánicos como ácidos grasos, ácido jasmónico y ácido salicílico, etc.

Como se comprueba las respuestas de las plantas al ataque de patógenos son muy variadas, sin embargo, se pueden generalizar puesto que los principales mecanismos implicados en la resistencia sistémica adquirida son la creación de barreras estructurales como la lignificación (Mörschbacher et al, 1990), la síntesis de proteínas de defensa (PR) (Stitcher et al, 1997) y la acumulación de compuestos fenólicos (Candela et al, 1995; Redman et al, 1999; Bowers y Locke, 2000).

La transmisión de la señal de respuesta a un ataque en el tejido vegetal pasa por la respuesta a un elicitador, lo que requiere una cadena de transmisión de señal hasta la expresión de un gen. Algunos ejemplos son: la sacarosa, que actúa de mensajero secundario en la estimulación de la CHS-A de *Petunia*; el glutatión, que induce fitoalexinas en guisante a concentraciones muy bajas (0,1 a 0,01 mM) y el Ca y el cAMP implicados en la elicitación intracelular de la síntesis de fitoalexinas (Zook et al, 1987).

Una característica diferencial de las infecciones fúngicas es que son de naturaleza sistémica porque afectan a procesos sistémicos como el movimiento del agua o el transporte del floema.

La generación de señales sistémicas suelen implicar caídas en el potencial de membrana. Por ejemplo, los oligogalacturónidos provocan un eflujo de iones K^+ que hace que el pH intracelular disminuya y que el calcio extracelular se reduzca. Estas alteraciones pueden transmitirse entre células y además tiene consecuencias en la expresión de genes de defensa (Bowles, 1992).

Cuando se produce un ataque de un hongo a una planta (por acción de las poligalacturonasas o de enzimas hidrolíticos del hongo), los oligosacáridos desprendidos de la rotura de la pared celular pueden inducir repuestas de defensa en la planta de modo localizado y sistémico. A pesar de que el elevado peso molecular de las oligosacarinas les impide atravesar membranas celulares, son capaces de transmitir la señal de defensa mediante el reconocimiento específico por receptores de membrana (Sharp et al, 1984). Cuando el oligosacárido se une a un receptor de membrana se produce un cambio conformacional que directamente, o mediante un mecanismo de quinasas/fosfatasa, provoca la apertura de canales de iones Ca^{2+} , lo que produce la entrada de iones Ca^{2+} y la despolarización de la membrana. Esta señal activa a muchas enzimas de pared celular. Otro modo de señalización de un ataque patogénico es la síntesis del etileno, esta hormona puede viajar a través de paredes y membranas celulares, transportando de manera sistémica la señal de un ataque o herida.

Los ataques patogénicos en función del desarrollo de una infección a lo largo del tiempo o a lo largo de los tejidos del vegetal producen cambios que pueden afectar a diversas funciones del metabolismo de la planta, incluyendo la fotosíntesis y el trasiego energético del vegetal (Fig 3).

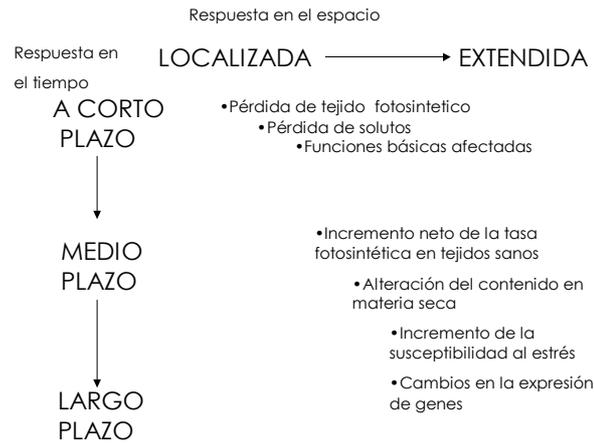


Figura 3. Respuestas espacio-temporales de las plantas a los ataques patogénicos .

Generalmente la síntesis de terpenos y polifenoles, como consecuencia de un ataque, produce un gasto extra en el consumo de energía de la planta, pero esto no provoca un decaimiento en la vitalidad de la planta, puesto que se produce a expensas de un exceso de fotosintatos (Edwards, 1989).

Un ataque patogénico produce en la planta la pérdida de compuestos de carbono y energía metabólica, por tanto, la planta debe compensar esta situación a través de los tejidos sanos de la planta herida (Scholes, 1992).

Los ataques patogénicos provocan cambios importantes en la fijación de materia seca y en la interceptación de radiación. Una posible clasificación de los patógenos podría basarse en la capacidad para afectar a la interceptación de radiación (IR) o en la capacidad para afectar al uso eficiente de la radiación (RUE), que es la relación entre la biomasa y la interceptación de la luz

(biomasa/IR). Esto se produce en aquellos patógenos que liberan toxinas y que provocan la pérdida de asimilados o la reducción de la turgencia y de la conductancia de la hoja. Una respuesta habitual de las plantas es la compensación de la pérdida de biomasa en las partes aéreas mediante el aumento de la masa seca de las raíces y el incremento en la toma de nutrientes (Paul, 1990). Por lo tanto, la respuesta a ataques patogénicos incluye cambios morfológicos y fisiológicos en la planta (Ayres, 1991; Danell et al, 1985).

1.2.4. Importancia de la ruta del ácido siquímico y de los compuestos fenólicos en interacciones planta-patógeno

La participación de los metabolitos secundarios en mecanismos de defensa se justifica por su localización en los tejidos más importantes o vulnerables de las plantas. Estos metabolitos se sintetizan en momentos críticos del crecimiento y se almacenan y producen en compartimentos especiales. Un factor decisivo para evaluar su importancia en este tipo de interacciones planta-patógeno es que la síntesis de estos metabolitos se incrementa significativamente en respuesta a un ataque.

Según Bowles (1992) los criterios que se utilizan para considerar a un metabolito secundario como una fitoalexina (principal expresión de los mecanismos inducibles de respuesta en plantas) son los siguientes:

- se deben acumular en respuesta a una infección,
 - deben inhibir el ataque de algún patógeno,
-

- el compuesto debe acumularse en concentraciones en las que sean inhibidores del crecimiento del patógeno y en áreas cercanas al ataque,
- las variaciones en la acumulación de la fitoalexina deben provocar variaciones en la resistencia de la planta, y
- la variación de la sensibilidad de un patógeno a una fitoalexina debe corresponderse con la variación de su virulencia.

Las fitoalexinas pueden sintetizarse por varias rutas en función del producto final. Su origen puede ser terpénico, poliacetilénico, isoflavonoide o dihidrofenantreno, pudiendo combinarse las rutas de síntesis del ácido siquímico y la vía del acetato (Grisebach et al, 1978; Goodwin et al, 1988). La síntesis de fitoalexinas, no sólo se activa en respuesta a interacciones con patógenos, sino que también puede activarse por factores de estrés abiótico. En estos casos las fitoalexinas sintetizadas no son específicas de la interacción.

En diferentes ensayos biológicos se ha comprobado la toxicidad de las fitoalexinas, tanto en hongos (Prego et al, 1997) como en levaduras patogénicas. Las fitoalexinas en general interfieren en la de germinación de esporas, en el crecimiento radial micelar, en el crecimiento germinal o en la acumulación de tejido micelar en cultivos (Bailey et al, 1982).

Se ha demostrado que las fitoalexinas de origen terpenoide, poliacetilénico e isoflavonoide son las que mayor actividad fungitóxica poseen. Las fitoalexinas poseen propiedades tanto fungiestáticas, como fungicidas y antibacterianas (Hahn et al, 1989).

La síntesis de fitoalexinas está directamente ligada a la respuesta hipersensible (HR) que conlleva la muerte celular. Cuando las plantas responden a una infección, y en consecuencia se produce la muerte de células, se pueden distinguir dos formas de llevar a cabo esta muerte celular. La primera es una muerte rápida de células hipersensibles localizadas en el sitio de la infección durante una interacción incompatible entre una planta resistente y un patógeno avirulento. La segunda clase de muerte es otra reacción más lenta que se da entre plantas sensibles y patógenos virulentos. La primera de las reacciones es la que se conoce como respuesta hipersensible HR y la segunda como respuesta normosensible NR.

Aunque depende del tipo de planta, en general, la síntesis de fitoalexinas se aprecia en un margen de tiempo entre 6 y 24 h, produciéndose una disminución paulatina a tiempos mayores. Aunque estos datos van en función del estímulo que provoque la síntesis de fitoalexinas o de la enzima PAL, la máxima acumulación de ácido clorogénico y PAL se da a las 24 horas, y la reducción de la actividad y de la concentración del ácido se produce a las 60 horas (Zucker, 1965).

Resulta de interés conocer según las familias vegetales las principales fitoalexinas que se sintetizan, así como su origen metabólico. Así pues familias de interés biológico como las Leguminosas poseen fitoalexinas de origen isoflavonoide. Éstas principalmente son la pisantina, medicarpina, faseolina, gliceolina, etc. (Halbrock y Scheel, 1989). Las Solanáceas presentan fitoalexinas fenilpropanoides y sesquiterpenoides como el fituberol, risitina, capsidiol, fituberina, la quercetina, etc. La crucíferasas contienen

indoles sulfurados con actividad fitoalexina como la brasinina, brasillexina, arabilexina, camalexin, etc. Por último, las Malváceas poseen fitoalexinas de origen naftólico y anftaldehído, algunas de ellas son el gospol, hemigospol, lacinileno, etc.

Algunas de las fitoalexinas de origen flavonoide más conocidas son las siguientes:

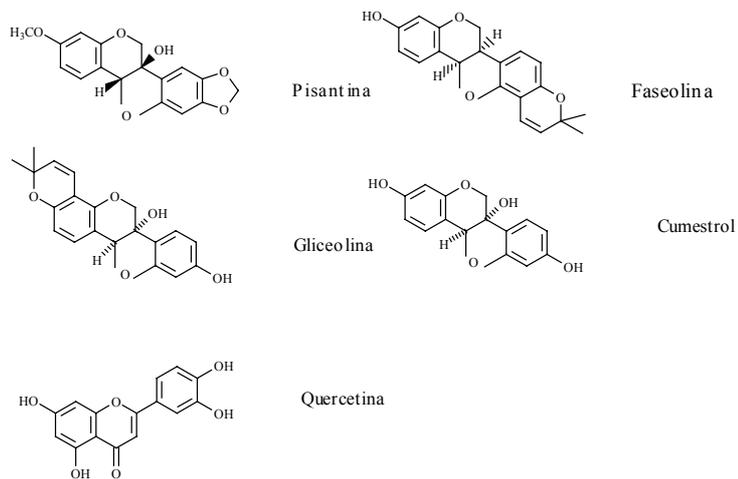


Figura 4. Fitoalexinas de origen fenólico.

Las fitoalexinas más comunes son de origen fenilpropanoide y tienen una base estructural común (Fig 5), ya que todas las derivan del ácido siquímico (chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles e isoflavonas). En ocasiones las fitoalexinas aparecen con restos de azúcares, y se sabe que en estos casos se muestran más tóxicas para los patógenos (Hedin et al, 1988).

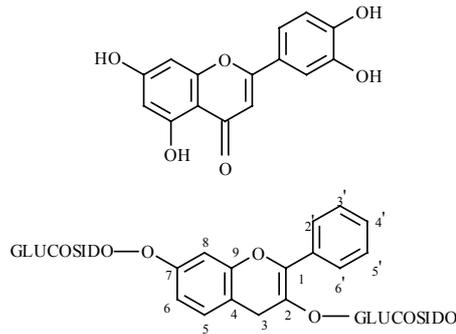


Figura 5. Estructuras más comunes de fitoalexinas.

La principal fitoalexina del tomate es la quercetina que puede aparecer glucosilada en las posiciones 2 ó 7 (Fig 6), al igual que sucede con el gospol (principal fitoalexina del algodón) (Aloni, 1987).

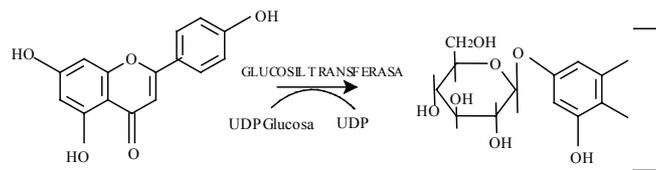


Figura 6. Reacción de glucosilación de una fitoalexina.

Se ha demostrado que la efectividad de este tipo de flavonoides depende de la posición de los grupos hidroxilados y no del número de hidroxilos (Hedin et al, 1988). Por otro lado, se sabe que las fitoalexinas glucosiladas son más tóxicas que las que no lo están. Si este azúcar es ramnosa, resulta todavía más tóxico para los hongos (Hedin et al, 1988).

1.2.5 Principal ruta de síntesis de flavonoides

La ruta metabólica de síntesis de estos compuestos se conoce como ruta del ácido siquímico, ya que es el metabolito común del que derivan la mayoría de compuestos fenólicos en las plantas.

La ruta biosintética que origina las fitoalexinas fenilpropanoides es la ruta del ácido siquímico (Fig 7).

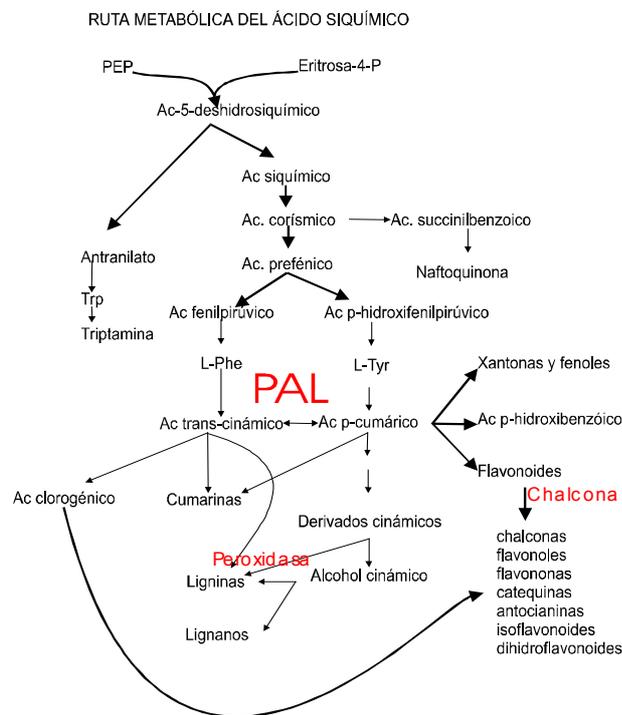


Figura 7. Esquema simplificado de la ruta del ácido siquímico. CHI: chalcona isomerasa; CHS: chalcona cintaza; PEP: fosfoenolpiruvato

Como se observa en la figura 7 los precursores del ácido siquímico son el fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa-4-fosfato (eritrosa-4-P) (Goodwin y Mercer, 1988). Estas dos moléculas por una serie de condensaciones y pasos metabólicos dan lugar al ácido siquímico. Éste sufre una serie de reacciones (transaminaciones, oxidaciones, etc.), de modo que se forma primero el corismato y después el p-cumarato que origina (en función de una hidroxilación en la posición *para* del anillo) la L-Phe o la L-Tyr. Estos dos aminoácidos son los precursores del ácido p-cumárico. En la reacción de desaminación de los aminoácidos interviene una enzima clave en el metabolismo de fitoalexinas, la fenilalanina amonio liasa (PAL). Diversos estudios prueban su implicación en procesos de formación de fitoalexinas, así como en mecanismos de defensa (Campbell y Brian, 1992).

El ácido p-cumárico es un punto de bifurcación de la ruta, por un lado, dará lugar al ácido transcinámico. Este ácido es el precursor de muchos compuestos fenólicos como el alcohol sinapílico, el coniferílico, el cafeico y el ferúlico. Todos ellos pueden dar lugar a lignanos y ligninas, por condensaciones oxidativas (mediadas por las enzimas peroxidases), generando polímeros de elevado peso molecular. Por otro lado, el ácido p-cumárico por condensación del HSCoA, genera cumarilCoA, molécula que sufre prenilaciones por vía ruta del acetato dando lugar a cumarinas, flavonoides, xantonas, etc.

A partir de los flavonoides, se generan en primer lugar chalconas por mediación de la enzima chalcona cintaza. En segundo lugar por ser éstos compuestos α,β -insaturados, se producen adiciones de Michael que dan lugar a las flavanonas y éstas, por

mediación de la enzima chalcona isomerasa, generan isoflavonas, precursoras habituales de fitoalexinas.

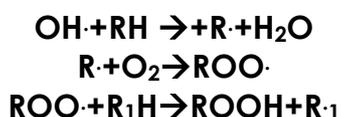
Tanto la chalcona isomerasa como la sintasa son enzimas muy estudiadas en relación con los procesos de síntesis de fitoalexinas. En sistemas elicitados artificialmente, se ha demostrado la correlación existente entre la síntesis *de novo* de estas enzimas y el aumento de fitoalexinas como respuesta a los mismos.

Otro de los posibles productos de esta ruta es el ácido clorogénico. En diversos estudios se ha puesto de manifiesto su importancia en interacciones planta-patógeno (Perreneud, 1977; Lindsay et al, 1992). Según Yao et al (1995) el ácido clorogénico puede actuar como reserva de compuestos fenólicos (fitoalexinas) en interacciones entre la planta de la patata y el hongo *Phytophthora infestans*. En sus estudios demostraron que los niveles de ácido clorogénico disminuían en detrimento de los compuestos fenólicos solubles y de pared celular al producirse una infección. Por otro lado, también observaron que los niveles de ácido clorogénico aumentan cuando se produce un daño mecánico (heridas, insectos...), de modo que parte de ese ácido clorogénico puede ser después utilizado rápidamente para la formación de otras fitoalexinas.

1.2.6 Papel de los compuestos fenólicos en procesos oxidativos

Se sabe que los flavonoides y los ácidos fenólicos juegan un papel muy importante en las interacciones planta-patógeno debido, entre otros motivos, a sus propiedades antioxidantes. Sin embargo,

una faceta igualmente importante de estos compuestos es su capacidad para eliminar radicales libres en la célula vegetal, protegiendo a otros orgánulos y compuestos intermedios de ser oxidados e inactivados (Ioku et al, 1995). Los estudios *in vitro* realizados por Ioku et al (1995) mostraron la capacidad antioxidante de la quercetina y sus monoglucósidos cuando en un medio de reacción se combinaban bicapas artificiales de fosfolípidos y un iniciador de reacciones radicalarias (AMNVN). Uno de los principales problemas de la existencia de radicales libres en las células eucariotas es que los fosfolípidos son especies químicas que se oxidan fácilmente, y esto provoca la desestabilización de las bicapas de las membranas celulares.



donde R y R₁ son lípidos de membrana.

En los estudios realizados por Ioku et al (1995) se demostró que la presencia de quercetina en un medio oxidante evitaba la formación de peróxidos de fosfatidilcolina. En ese mismo trabajo se demuestra que los glucósidos de los flavonoides poseen una capacidad menor para impedir la oxidación de fosfolípidos de membrana.

A lo largo de los años surgieron diferentes trabajos en los que se ha demostrado la capacidad antioxidante de diferentes flavonoides (Estrada et al, 2000). Lee et al (1995) establecieron, en orden decreciente, la capacidad antioxidante de la luteolina, capsaicina y quercetina en frutos de pimiento.

Cabe destacar que uno de los mecanismos que poseen los insectos para eliminar especies potencialmente prooxidantes es la síntesis de enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa (SOD). Ésto les permite anular la toxicidad de la quercetina sintetizada por las plantas para defenderse del ataque de insectos (Pritsos et al, 1991)

Muchos estudios realizados *in vitro* han demostrado que los flavonoides son potentes detoxificadores de grupos radicalarios como los superóxidos (O_2^-), los peróxidos (H_2O_2), los radicales hidroxilos ($\cdot OH$) y el oxígeno (Bors et al, 1989; Yamasaki et al, 1997). En las plantas la principal fuente de radicales oxidantes es la fotosíntesis. Cuando la exportación de carbohidratos desde el cloroplasto no es suficiente, se produce un *feedback* que inhibe la fotosíntesis por acumulación del producto final (Geiger, 1976). La acumulación de carbohidratos puede deberse a varios factores como la limitación directa de la disponibilidad de Pi (Herold, 1980; Foyer, 1987), o por la desaparición a largo plazo de las cantidades de proteínas necesarias para la fotosíntesis (Sheen, 1990). Lo que queda claro es que la acumulación de glucosa, almidón y fructosa provoca una disminución de la fotosíntesis y un incremento de la respiración mitocondrial, lo que implica la incorporación de especies oxidantes como el O_2 , este efecto suele ir acompañado por una reducción significativa de la actividad Rubisco (Wong, 1979; Besford et al, 1990) y otros enzimas del ciclo de Calvin (Besford, 1990).

Por ello en los cloroplastos de las plantas se encuentra el principal mecanismo de detoxificación de especies oxidantes que es el ciclo ascorbato-glutatión (Foyer, 1993)

Otra vía de generación de radicales oxidantes es la respuesta hipersensible. La aparición de este tipo de respuestas genera la muerte celular mediante la disfunción de la membrana lipídica (Slusarenko et al, 1991). Esto se produce cuando se oxidan los lípidos de membrana tras la generación de óxidos, superóxidos o peróxidos, lo que provoca la peroxidación lipídica y la activación de enzimas hidrolíticas de membrana como las lipoxigenasas o las lipoilacilhidrolasas (Strange, 1992).

Dentro de los procesos de detoxificación de especies radicalarias, sea cual sea su procedencia, se sabe que los flavonoides son capaces de detoxificar los superóxidos y el oxígeno, aunque *in vivo* estas reacciones se producen en menor medida debido a que los radicales superóxido y el oxígeno singlete (1O_2) no difunden bien a través de las membranas y los flavonoides están en su mayoría localizados en vacuolas y en paredes celulares. Por tanto en las células vegetales el efecto detoxificador de los flavonoides para estas dos especies está limitado al lugar en el que se producen (Yamasaki et al, 1997). Por otro lado, el H_2O_2 puede atravesar las membranas. Estos peróxidos en las plantas se pueden producir en situaciones de estrés y también durante el metabolismo normal de la célula. En los tejidos en los que se produce esta situación es habitual la acumulación de flavonoides.

Yamasaki et al (1997) demostraron que la actividad detoxificante de los flavonoides se incrementa notablemente cuando éstos actúan conjuntamente con las peroxidasas, ya que los flavonoides pueden actuar como donadores de electrones para las peroxidasas (Miller y Schreier, 1985). Este potencial detoxificador

podría hacer que los flavonoides actuaran como protectores frente al estrés oxidativo.

Los flavonoides, una vez oxidados, pueden regenerarse en presencia de ascorbato, de lo contrario se polimerizan (Fig 8).

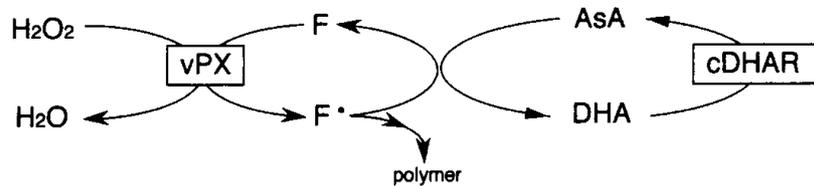


Figura 8. Los flavonoides (F) por mediación de las peroxidases vacuolares (vPX) pueden aceptar electrones procedentes de la reducción del agua oxigenada. Si en el medio hay ascorbato los flavonoides se regeneran cediendo los electrones al ascorbato (AsA). Si por el contrario en el medio no hay AsA, los flavonoides pueden polimerizarse, por reacciones no enzimáticas originando la lignina. DHA: ácido dehidroascórbico; cDHAR: ácido dehidroascórbico reductasa citosólica; (F).

Yamasaki et al (1997) describieron los mecanismos de actuación de estos flavonoides, en función de la localización celular y de la presencia del sistema ascorbato glutatión.

Los flavonoides también suponen una defensa más contra los daños producidos en las plantas por los rayos UV. En esta ocasión, los flavonoides actúan dispersando electrones a través de su estructura aromática, de modo que actúan como filtros ópticos (Gould et al, 1995) y, al mismo tiempo, detoxifican los radicales generados por los rayos UV (Yamasaki et al, 1997) (Fig 9 y 10).

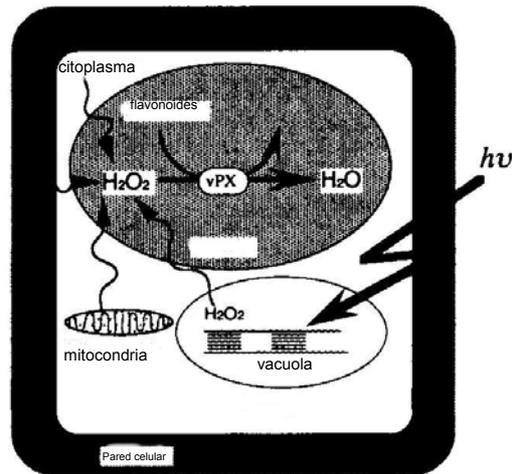


Figura 9. Compartimentalización celular de los procesos oxidativos en plantas. vPx peroxidasa vacuolar

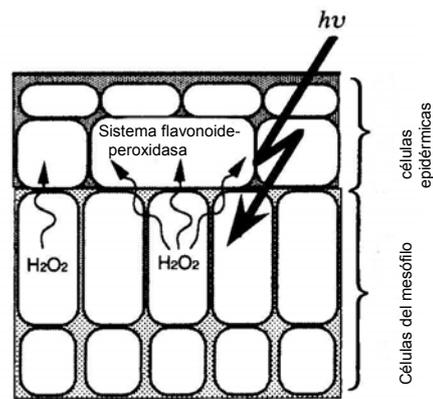


Figura 10. Procesos oxidativos inducidos por luz UV.

Por tanto, los flavonoides se consideran potentes compuestos antioxidantes, aunque esta no es una característica específica de los flavonoides, sino que es extensiva a los compuestos fenólicos vegetales (Takahama, 1988; Castelluccio et al, 1995).

A pesar de la capacidad detoxificadora de los flavonoides, algunos autores han demostrado que la aparición de un estrés oxidativo, con la consiguiente aparición de especies oxidantes, es necesario, pero no suficiente, para inducir la acumulación de isoflavonoides en el cultivo de soja (Guo et al, 1998), puesto que no se produce una correlación exacta entre ambos efectos cuando se da un estrés inducido por *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* (Psg).

Los flavonoides y los compuestos fenólicos simple, además de evitar la peroxidación de lípidos de membrana se ha demostrado que reducen la oxidación de proteínas. La capacidad detoxificadora *in vitro* de estos compuestos en orden decreciente es: ácido ferúlico, epicatetequina, catequina, rutina, malvidina, ácido cafeico, quercetina y propil gallato (Heinonen et al, 1998).

Lacan y Baccou (1998) demostraron que en el caso de la SOD es más importante que se induzcan nuevas isoenzimas que el hecho de que se produzca un incremento neto en la actividad de la misma, aunque, efectivamente, la aparición de estreses oxidativos genera el aumento de enzimas detoxificadores de radicales (Piquery, 2000).

1.3. Control de enfermedades fúngicas mediante el uso de compuestos fungistáticos

La utilización de productos químicos es el sistema más extendido para el control de podredumbres durante el almacenamiento en cámaras de frutos. Este hábito conlleva la aparición de nuevas cepas de patógenos que resisten a los fungicidas habituales, con lo que es cada vez más difícil combatir los

hongos mediante estas técnicas (Viñas et al, 1994). Hoy día se empieza a rechazar el uso de fungicidas como única solución para luchar contra enfermedades en post-cosecha (Jordan, 1973; Sommer, 1985), debido a los diferentes inconvenientes que presentan para la salud de las personas y a la aparición de resistencias en los patógenos (Spotts Cervantes, 1984). Se han desarrollado unos límites máximos de residuos (LMR) que son bastante restrictivos (BOE 4.XL.1989). Una de las alternativas más recientes es el control biológico. Esta terminología se comenzó a desarrollar en EE.UU. durante la década de los 80 (Janisewicz, 1987; Janisiewicz y Roitman, 1988). El término biocontrol o control biológico de enfermedades en post-cosecha abarcan conceptos como el uso de microorganismos antagónicos, uso de fungistáticos o fungicidas derivados de metabolitos de las plantas y manipulación de la resistencia de los productos recolectados. Los mecanismos de acción del biocontrol pueden ser debidos a competencias por el espacio o los nutrientes, por la secreción de antibióticos (Janisiewicz et al, 1988), por la inducción de procesos de resistencia en el huésped (Wilson et al, 1989) o por interacción directa con el patógeno (Wilson et al, 1989).

Una técnica utilizada durante mucho tiempo para alargar la vida postcosecha de diferentes frutos ha sido realizar tratamientos con diferentes compuestos de calcio, ya que se ha demostrado que los tratamientos con sales de calcio, como el CaCl_2 , pueden retrasar la senescencia de los frutos en cámaras, reducir fisiopatías como el corazón amargo (*bitter pit*) y reducir el reblandecimiento de los frutos (Conway, 1982). Sharples (1980) demostró que el calcio, a través del metabolismo de la pared celular, puede conferir resistencia frente a diversos ataques por hongos, al mismo tiempo que puede evitar desórdenes fisiológicos en la célula y retrasar procesos generales de

senescencia. Uno de los principales objetivos de los tratamientos con calcio va encaminado a dificultar o reducir la actividad de enzimas pécticos que destruyen la hemicelulosa y las pectinas de los frutos (Faust, 1974).

Recientemente se ha comprobado que determinadas sustancias químicas, como por ejemplo polisacáridos de elevado peso molecular, pueden tener un papel antifúngico cuando se aplican en post-cosecha y, a su vez, pueden retrasar el decaimiento de frutos infectados en post-cosecha.

Productos como el quitosán pueden jugar un doble papel en las interacciones planta patógeno, ya que interfieren directamente sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos y activan diferentes procesos que inducen repuestas de defensa en plantas, como por ejemplo la acumulación de quitinasas (Mauch et al, 1984). Como el grado de efectividad del quitosán se ve modificado con la concentración (las dosis inferiores al 0.6% no se muestran efectivas), se deduce que este compuesto tiene un efecto fungistático más que fungicida. El Gaouth et al (1992) demuestran que este polisacárido (entre el 1 y 1.5%) es capaz de inhibir la germinación de esporas, la elongación del tubo germinativo y el crecimiento radial de *Botrytis cinerea* y de *Rizopus stolonifer*. Sin embargo, la estimulación de mecanismos de defensa está íntimamente relacionada con la interacción del compuesto con los tejidos internos del vegetal, así pues la capacidad de algunos productos para estimular repuestas de defensa, como es el caso del quitosán, está en función de su interacción con la membrana plasmática. El quitosán interacciona directamente con el DNA y el mRNA de algunos hongos, y esta

interacción es la base de su efecto antifúngico (Hadwiger y Loschke, 1981).

En trabajos posteriores El Gaouth et al (1995) descubrieron que determinados deoxianálogos de glucosa, manosa, L-sorbosa y 2-deoxi-D-ribosa, poseían ciertas propiedades antifúngicas, siendo el análogo de la glucosa el que mejor propiedades muestra. Se obtuvieron buenos resultados para los hongos *Botrytis cinerea*, *Penicillium spansum* y *Monilia fructicola* con dosis comprendidas entre 0.01 y 1% en tratamientos en post-cosecha en frutos de manzana y melocotón.

Actualmente existen técnicas que proponen el uso de microorganismos antagonistas como bacterias y hongos filamentosos para el control de hongos de podredumbres en post-cosecha (Janisiewicz 1991b; Wilson y Wisniewski, 1989, Janisiewicz et al, 2000). Hoy se sabe que existe una relación directa entre la concentración del microorganismo antagónico y la cantidad de patógeno a controlar (Janisiewicz, 1987; Janisiewicz y Roitman, 1988; Janisiewicz, 1991a). La combinación de técnicas de biocontrol (uso de antagonistas) y la aplicación de compuestos derivados de la glucosa que no son fungicidas están dando buenos resultados en el control de diferentes patógenos como *Penicillium spansum* (Janisiewicz, 1994). El uso de compuestos como la 2-deoxiglucosa (2-DOG), que no son agresivos para los organismos antagonistas, junto con tratamientos de diferentes microorganismos que por sí mismos controlan a los hongos patógenos, como *Pseudomonas syringae*, permite reducir notablemente la cantidad de microorganismo antagonista a utilizar y también mejora mucho su efectividad (Janisiewicz, 1994).

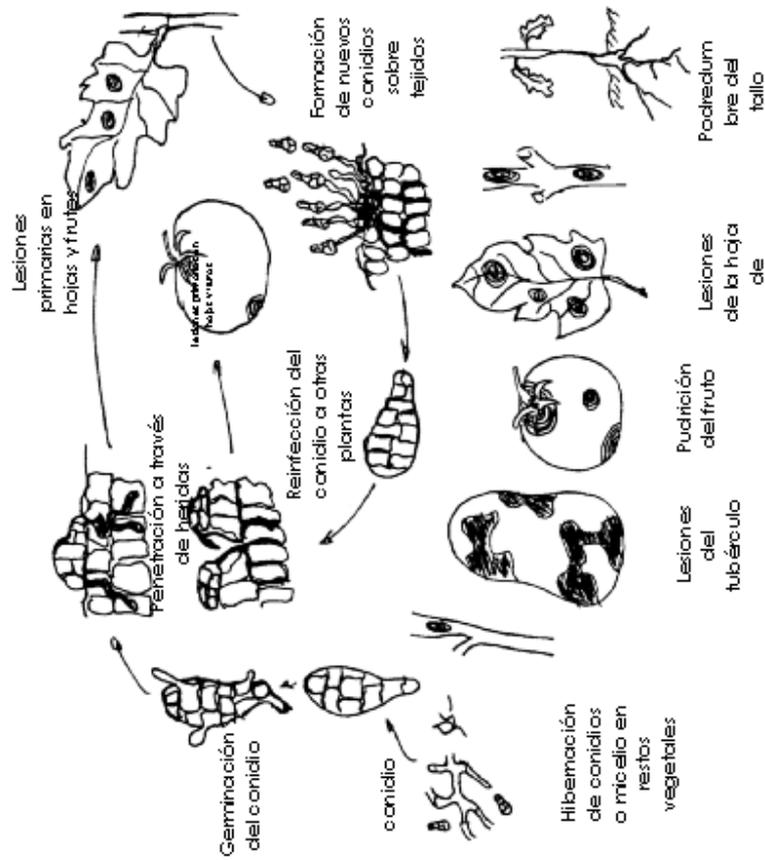
Salzman et al (1998) desarrollaron nuevos compuestos basados en azúcares para el control de hongos patógenos. En estos trabajos se demuestra que la acumulación de elevadas concentraciones de azúcares es una forma natural de defensa contra patógenos en uvas maduras. Salzman et al (1998) demostraron que la acumulación de azúcares viene acompañada por la síntesis de diferentes proteínas PR en el fruto de uva como chitinasas y análogos de thaumatina. La acumulación de los azúcares y de las proteínas PR son efectivas frente a *Botrytis cinerea*. La efectividad de las proteínas PR y los azúcares es complementaria, aunque ambos tipos de compuestos son efectivos igualmente en cultivos *in vitro* de este hongo (Salzman et al, 1998). En contrapartida existe el problema del aumento de sensibilidad a hongos por un efecto del tipo sumidero-inducido (VanderPlank, 1984). Esto significa que la acumulación leve o insuficiente de azúcares en frutos maduros, tales como el tomate o el maíz, puede tener un efecto contrario al descrito en uva, es decir, que aumente la sensibilidad a las infecciones y, por tanto, se incremente el crecimiento de hongos patógenos mediante estas concentraciones de azúcares (Horsfall, 1975; Holbert et al, 1935).

En cualquier caso se deduce que la interacción entre azúcares modificados o naturales y hongos es un equilibrio que manipulado adecuadamente puede suponer una herramienta para el control de infecciones en post-cosecha o en plantas cultivadas.

Anexo I.

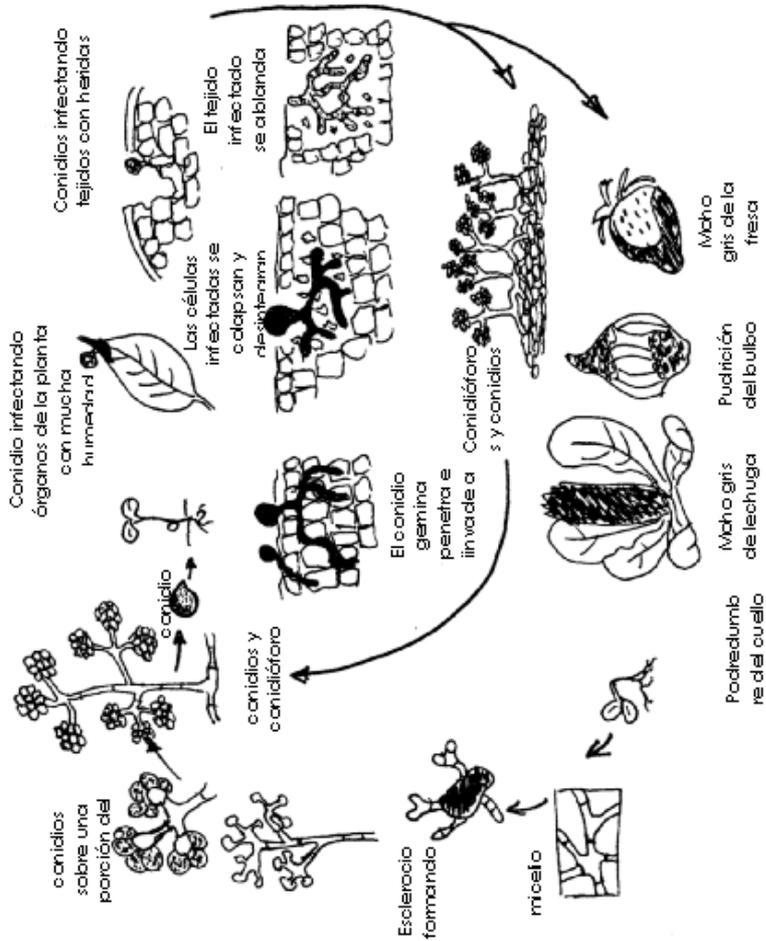
***Alternaria solani* (hongo superior, imperfecto).**

Subdivisión: Deuteromycotina. Clase: Hyphomycetes. Orden: Hyphales. Genero: *Alternaria*.



Botrytis cinerea (hongo superior, imperfecto).

Subdivisión: Deuteromycotina. Clase: Hyphomycetes. Orden: Hyphales. Genero: Botrytis.



2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. OBJETIVOS

En la actualidad hay gran interés porque la agricultura moderna sea capaz de obtener productos de calidad, saludables para productores y consumidores, salvaguardando a la vez el medio ambiente utilizando las mejores prácticas posibles.

En los últimos años se ha comenzado a trabajar en la aplicación de técnicas de cultivo próximas a la lucha integrada, que sean respetuosas con el medio ambiente y reduzcan el uso de pesticidas. Entre las estrategias que se están elaborando, cabe destacar la aplicación de tratamientos con compuestos naturales biodegradables, que mejoren el desarrollo de la planta e induzcan su resistencia natural a distintos tipos de estreses. El uso de fitorreguladores es una práctica habitual en agricultura. La aplicación de estos productos, junto con fertilizantes e inhibidores del crecimiento, modula el estado fisiológico de las plantas promoviendo el crecimiento, la floración, el cuajado de frutos, la resistencia a condiciones adversas y patógenos, lo que puede conducir a un aumento de la cosecha. Sin embargo, el uso de estos productos está limitado por la aparición de desórdenes fisiológicos

Una alternativa al uso de los fitorreguladores es el uso de moléculas que contengan parte de la estructura de las fitohormonas naturales, como son ácidos carboxílicos, azúcares, aminas o poliaminas, de tal manera que produzcan los efectos beneficiosos sobre la planta y sobre el control de hongos patógenos, sin ocasionar los problemas antes mencionados.

Con esta idea se diseñaron distintos tratamientos:

- FGA: mezcla en disolución acuosa de los compuestos furfurilamina, 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa y monoéster etílico del ácido adípico. El éster se eligió porque este compuesto es la base de los productos comercializados por la empresa Codiagro, con el objetivo de potenciar el desarrollo de las plantas. La glucosa modificada se incluyó con objeto de introducir grupos acetilo, precursores de diferentes rutas metabólicas, y la amina se incorporó porque se había comprobado su efecto antisenescente, y para que al mismo tiempo constituyera una reserva de grupos amino que promoviera la síntesis de proteínas.

Con objeto de mejorar la absorción de la mezcla FGA, y que se pudiera facilitar o incluso potenciar el efectos de sus componentes, se planteó sintetizar un compuesto que englobase los principios activos de la glucosa modificada y del éster. Para ello se sintetizó el adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa, que se denominó TOGE. A este compuesto se le añadió la furfurilamina, componente de la mezcla FGA y se le denominó TOGE-1. Así mismo a TOGE se le añadió otra amina, la 1,3-diaminopropano, para la que se habían descrito efectos beneficiosos sobre el desarrollo de las plantas, y a la mezcla se le denominó TOGE-2.

Los objetivos concretos que se han estudiado en este trabajo han sido los siguientes:

- 1) Estudio del efecto de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2, de naturaleza no hormonal como bioestimulantes o reguladores del desarrollo.
-

- 2) Estudio del efecto de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre la inducción de mecanismos naturales de defensa en planta.
- 3) Estudio del posible efecto fungicida de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2.

2.2. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo que se ha seguido en esta investigación puede concretarse en los siguientes puntos:

- 1) *Estudio del efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de los cultivos*
 - 2) *Estudio de la capacidad de los compuestos utilizados para retrasar la senescencia de plantas de pimiento y tomate, estudiando la actividad de las enzimas clorofilasa, peroxidasa y proteasas.*
 - 3) *Estudio de la posible estimulación del metabolismo de ambos cultivos mediante el análisis de clorofila, proteína y los diferentes parámetros de intercambio gaseoso.*
 - 4) *Estudio del efecto sobre las defensas mecánicas (azúcares de pared celular) y activas (fitoalexinas y compuestos fenólicos) en ambos cultivos.*
 - 5) *Estudio de la respuesta de las plantas tratadas frente a hongos patógenos.*
 - 6) *Estudio del efecto que ejercen los compuestos utilizados sobre el crecimiento in vitro de Alternaria solani, Phytophthora capsici, Phytophthora citrophthora y Botrytis cinerea.*
 - 7) *Estudio comparativo de la efectividad de los diferentes tratamientos utilizados.*
-

3. METODOLOGÍA GENERAL

3.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y pimiento (*Capsicum annuum* L.). Las semillas se germinaron en cámaras de cultivo con una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 80%. Cuando las plántulas alcanzaron una altura de 20 cm se transplantaron a macetas de 5 L con soporte de perlita y se colocaron en invernadero. Las temperaturas fueron de 16-18 °C durante la noche y de 25-27 °C durante el día, con un fotoperíodo de 16 h. La humedad relativa se mantuvo entorno al 80%. Las plantas se irrigaron con solución de Hoagland modificada (Tabla 1) (Hoagland y Arnon, 1950).

Las plántulas de cítricos utilizadas procedían de semillas de citrange Carrizo (híbrido de *C. sinensis* (L) x *P. trifoliata* (L) Raf.) germinadas en cámara en bandejas con arena. A los tres meses de edad se transplantaron a macetas de 5 L con soporte de perlita y se colocaron en invernadero. La temperatura fue de 16-18 °C durante la noche y 24-28 °C durante el día. La humedad relativa fue del 80% y el fotoperíodo de 16 h.

3.2 Fertilización

Los cultivos de tomate y pimiento se irrigaron con la solución hidropónica de Hoagland modificada como se describe en la tabla 1.

Las soluciones de riego se obtuvieron mediante disolución de las siguientes sales inorgánicas: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 , NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , MgSO_4 . Los micronutrientes se aportaron en forma quelatada, a excepción del B que se aportó como H_3BO_3 y el Mo que se aportó como MoO_3 .

El pH de la solución hidropónica se mantuvo en torno a 6.5.

Tabla 1. Solución hidropónica empleada para el riego de tomate y pimiento.

Semana	N(NO_3)	N(NH_4)	P	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	B	Mo	conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
1	11	8	230	285	114	25	0.7	0.2	0.04	0.13	0.006	1400
2 a 4	159	11	38	229	115	41	0.7	0.2	0.04	0.13	0.006	1800
5 a 8	170	6	50	306	114	50	0.7	0.2	0.04	0.13	0.006	2000
9 a 10	181	4	63	389	98	60	0.7	0.2	0.04	0.13	0.006	2200
11 a 12	121	4	50	509	84	50	0.7	0.2	0.04	0.13	0.006	2500
13 a 14	97	4	50	600	84	50	0.7	0.2	0.04	0.13	0.006	2800
15-final	58	2	36	435	69	40	0.7	0.2	0.04	0.13	0.006	2200

Unidades expresadas en ppm sobre la solución final de riego.

El riego de los cítricos se realizó con la solución de Hoagland modificada para cítricos (Legaz, 1993) con un pH de 5.8-6.2 (Tabla 2).

Tabla 2. Solución nutritiva de Hoagland (1950) modificada para cítricos por Legaz (1993).

Macronutrientes	KNO ₃	0.40 g/l
	Ca(NO ₃) ₂	0.82 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.40 g/l
	H ₃ PO ₄	0.07 g/l
Micronutrientes	H ₃ PO ₃	2.86 mg/l
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.20 mg/l
	MoO ₃	0.09 mg/l
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.11 mg/l
	MnSO ₄	9.15 mg/l
	Fe-EDDHA 6%	67.0 mg/l

La frecuencia de riego para las plantas de pimiento y tomate fue diaria con el reparto por planta y día que se especifica en la Tabla 3.

Tabla 3. Reparto del riego por planta y día.

Semana	1	2 a 4	5 a 8	9 a 10	11 a 12	13 a 14	15-final
Litros/planta/día	0.6	0.6	0.8	1	1	0.8	0.4

El riego de los cítricos se efectuó tres veces por semana con 0.5 l por planta/riego.

3.3 Tratamientos

3.3.1 Compuestos utilizados para los experimentos

Los compuestos empleados en los experimentos han sido los siguientes:

- *1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranos*, (T).
- *Ácido 6-etil-O-hexanoico* (monoéster etílico del ácido adípico), (E).
- *Furfurilamina*, (F).
- *1,3-diaminopropano*, (D).
- *Adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranos* (TOGE).
- *FGA*, es la mezcla en disolución acuosa de los compuestos F, T y E.
- *TOGE-1*, *adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranos* (ver síntesis apartado 3.5.9) adicionado en solución acuosa con el compuesto F.
- *TOGE-2*, que es el *adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranos* adicionada en solución acuosa con el compuesto *1,3-diaminopropano*.

Los tratamientos se realizaron por pulverización sobre las hojas de las diferentes disoluciones de los compuestos a ensayar.

3.4 Experimentos

3.4.1 Efecto de la aplicación de reguladores del desarrollo sobre el crecimiento de plantas de pimiento y tomate

Plantas de tomate se trataron 5 veces cada 15 días, empezando a los 15 días después del trasplante. Los tratamientos se hicieron con FGA que contenía 5 ppm de T, 2.5 ppm de E y 0.5 ppm de F. Para los tratamientos se utilizaron tres concentraciones diferentes. La dosis 1 corresponde a la disolución inicial de los principios activos de la mezcla FGA, la dosis 2 es 2x y la dosis 3 es 3x. En plantas de tomate se determinó la altura a los 50 y 70 días después del trasplante, el diámetro de la base y del ápice, así como el número de entrenudos. Al final del experimento, aproximadamente a los 100 días después del trasplante, se midieron los pesos frescos y secos de la raíz y del follaje, así como el número de frutos.

Plantas de pimiento se trataron 5 veces cada 15 días, empezando a los 15 días después del trasplante. Los tratamientos se hicieron con FGA que contenía una disolución de 2.5 ppm de T, 1.25 ppm de E y 0.25 ppm de F. Para los tratamientos se utilizaron cuatro concentraciones diferentes. La dosis 1 corresponde a la disolución inicial de los principios activos de la mezcla FGA, la dosis 2 es 2x, la dosis 3 es 3x y la dosis 4 es 4x. A lo largo del crecimiento vegetativo se midió la altura de las plantas, el índice foliar, las estructuras fructíferas, incluyendo flores y frutos cuajados, y el número de entrenudos.

3.4.2 Efecto de la aplicación de reguladores del desarrollo sobre la interacción planta-hongo en diferentes sistemas

Plántulas de tomate se dividieron en cuatro grupos que fueron tratadas como sigue: el primer grupo se trató con FGA (5 ppm T; 2.5 ppm E; 0.5 ppm F), el segundo con TOGE-1 (2.5 ppm TOGE; 0.5 ppm F), el tercero con TOGE-2 (2.5 ppm TOGE; 0.5 ppm D) y el cuarto con agua destilada (control). Las aplicaciones se hicieron 3 veces cada 15 días, empezando a los 15 días después del trasplante. A los 15 días de la tercera aplicación se inocularon las plántulas y las hojas según se describe en los apartados siguientes.

Plántulas de pimiento se dividieron en cuatro grupos que fueron tratados como sigue: el primer grupo se trató con FGA (2.5 ppm T; 1.25 ppm E; 0.25 ppm F), el segundo con TOGE-1 (1.25 ppm TOGE; 0.25 ppm F), el tercero con TOGE-2 (2.5 ppm TOGE; 0.25 ppm D) y el cuarto con agua destilada (control). Las aplicaciones se hicieron 3 veces cada 15 días, empezando a los 15 días después del trasplante. A los 15 días de la tercera aplicación se inocularon las plántulas y las hojas según se describe en los apartados siguientes.

Plántulas de cítricos se dividieron en cuatro grupos que fueron tratados como sigue: el primer grupo se trató con FGA (5 ppm T; 2.5 ppm E; 0.5 ppm F), el segundo con TOGE-1 (2.5 ppm TOGE; 0.5 ppm F), el tercero con TOGE-2 (2.5 ppm TOGE; 0.5 ppm D) y el cuarto con agua destilada (control). Las aplicaciones se hicieron 3 veces cada 15 días, empezando a los 15 días después del trasplante. A los 15 días de la tercera aplicación se inocularon las plántulas según se describe en los apartados siguientes.

Las plántulas de tomate, pimiento y cítricos se inocularon con un disco de 0.5 cm de micelio activo de un cultivo de *Phytophthora citrophthora* (R.E. & E.H. Smith) Leonian (tomate y cítricos) y *Phytophthora capsici* Leonian (pimiento). Para la inoculación de las plantas de tomate y pimiento se practicó una herida en el ápice del tallo de la plántula (Candela et al, 1995) y para los cítricos se hizo una herida en la base del tallo (Philips, 1994). En todos los casos se depositó en la herida el disco del hongo y se sujetó con film elástico y papel de aluminio para preservarlo de la luz. Una vez terminada la inoculación, se hizo un tratamiento con los respectivos compuestos de las mezclas (FGA TOGE-1 y TOGE-2). El progreso de la infección se siguió durante 15 días.

Hojas aisladas de pimiento y tomate procedentes de plantas tratadas con FGA, TOGE-1, TOGE-2 y plantas control, con una edad aproximada de 15 días, se esterilizaron con hipoclorito sódico (2%), se hirieron e inmediatamente después se trataron con los correspondientes compuestos de las mezclas (FGA, TOGE-1, TOGE-2 y agua estéril para hojas procedentes de plantas control). A continuación, se infectaron con 10 µl de una solución de esporas (3×10^5 esporas/ml) de *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Sorauer. El progreso de la infección se siguió durante 15 días.

Para los experimentos con plántulas y con hojas se hicieron diferentes grupos: a) tratadas con agua estéril y no infectadas, b) no tratadas e infectadas, c) tratadas y no infectadas y d) tratadas e infectadas. En aquellas plantas y hojas que no fueron infectadas no se observó la aparición de ninguna lesión fúngica por lo que no se han incluido en tablas y gráficas.

En un ensayo posterior se comprobó que los tratamientos realizados antes de la inoculación sobre hojas no tratadas no tenían ningún efecto directo sobre el desarrollo de la infección.

3.4.3. Caracterización bioquímica de los efectos producidos por la aplicación de reguladores del desarrollo

Plantas de tomate y pimiento se trataron 5 veces cada 15 días con FGA, TOGE-1 y TOGE-2, empezando a los 15 días después del trasplante. Las dosis utilizadas fueron: para el FGA, la dosis 1 descrita en el apartado 2.4.1 y para TOGE-1 y TOGE-2, las dosis descritas en el apartado 2.4.2.

Durante el desarrollo vegetativo se determinó el intercambio gaseoso en plantas de pimiento y tomate, 56, 86 y 100 días después del trasplante. A los 100 días después del trasplante se aislaron hojas maduras y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los diferentes análisis.

En hojas de pimiento y tomate tratadas con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 se midió la actividad de las enzimas: fenilalanina amonio liasa, chalcona isomerasa, proteasas ácidas, peroxidasa total y clorofilasa. También se cuantificó la concentración de compuestos fenólicos, de clorofila, el contenido en proteína y la concentración de los carbohidratos de pared celular (sólo en plantas tratadas con FGA). Se estudió el perfil de bandas de proteína de pimiento en un gel desnaturalizante de SDS-poliacrilamida.

3.4.4 Efecto de la aplicación del monoéster etílico del ácido adípico y furfurilamina en plantas

Plantas de tomate se trataron 5 veces cada 15 días, empezando a los 15 días después del trasplante. Para los tratamientos se utilizaron tres concentraciones diferentes. La dosis 1 fue de 0.250 ppm de furfurilamina (F), la dosis 2 fue de 0.5 ppm y la dosis 3 fue de 0.75 ppm. A lo largo del desarrollo vegetativo se determinó el intercambio gaseoso, la floración y el crecimiento. A los 100 días después del trasplante se aislaron hojas maduras y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los diferentes análisis. En estas hojas se determinó la actividad de la enzima PAL y la concentración de los compuestos fenólicos.

Plantas de tomate y pimiento se trataron 5 veces cada 15 días con el compuesto E, empezando a los 15 días después del trasplante. Las plantas de tomate se trataron con una dosis de 2.5 ppm y las de pimiento con 1.25 ppm .

A lo largo del desarrollo vegetativo de las plantas de tomate se determinó la altura, el diámetro de la base y del ápice y el número de entrenudos. En las plantas de pimiento se determinó el crecimiento, la calidad de los frutos, el porcentaje de destrío y los grados de azúcar del fruto.

3.4.5 Efecto de la aplicación de reguladores del desarrollo de plantas sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos

Discos de micelio activo de 0.5 cm de diámetro de los hongos *Alternaria solani*, *Phytophthora citrophthora* y *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. se cultivaron en un medio agar dextrosa de patata (PDA) que contenía 0 (control), 0.01 , 0.1 y 0.5% (p/v) del compuesto T.

Discos de micelio activo de 0.5 cm de diámetro de los hongos *Alternaria solani*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora capsici* y *Botrytis cinerea* se cultivaron en un medio agar dextrosa de patata (PDA) que contenía 0 (control), 0.01, 0.1 y 0.5% (p/v) de los componentes de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2. El crecimiento del micelio se siguió durante 7-15 días a 23 °C en oscuridad.

Antes de la realización de estos ensayos se comprobó la estabilidad de todos los compuestos en condiciones de autoclavado (121 °C a 1 kg/cm²). Para ello se utilizaron técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN).

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Estudio de la fotosíntesis

La fotosíntesis de las plantas se midió con "licor" modelo LCA-4 con detector de infrarrojos. Las medidas se realizaron de forma automática en intervalos de 1 minuto durante un tiempo de 5 minutos. Para las medidas se seleccionaron hojas de 10 días de edad aproximadamente. Los parámetros determinados fueron: la tasa

fotosintética ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), el CO_2 diferencial ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), la tasa de transpiración ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), el uso eficiente del agua ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Turner, 1986; Todorov, 1992) y el P.A.R. (photon flux density) ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

3.5.2 Determinación de la actividad peroxidasa total

La actividad total peroxidasa (TPOx) (E.C. 1.1.1.1.7) se determinó según el método de Boyarkin (1951). Aproximadamente 2.5 g de material fresco se homogeneizaron con 25 ml de tampón borato (100 mM, pH 8.5), 0.5 g de polivinilpirrolidona, 0.025 ml de ditioneitol (0.5 M) y 0.035 ml de 2-mercaptoetanol 14 M. El extracto crudo enzimático se obtuvo por centrifugación a 8000 g durante 30 minutos. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4 °C. El medio de ensayo enzimático contiene 0.5 ml de tampón acetato 0.2 M (pH 4.7), 0.7 ml de benzidinadichlorhidrato 5 mM, 0.3 ml de H_2O_2 40 mM y 0.1 ml de extracto crudo enzimático. La reacción se inicia inmediatamente cuando se añade el H_2O_2 a temperatura ambiente. El blanco de la reacción se preparó con todos los componentes excepto el peróxido de hidrógeno. La actividad enzimática se expresa como unidades catalíticas/mg proteína total, donde una unidad catalítica es la cantidad de extracto enzimático capaz de producir un incremento de absorbancia de 0.01 en 1 minuto a 600 nm.

3.5.3 Extracción y cuantificación de la proteína total. Determinación de la actividad proteasa

Se homogeneizaron aproximadamente 2.5 g de material fresco con 25 ml de tampón borato (100 mM, pH 8.5), 0.5 g de polivinilpirrolidona, 0.025 ml de ditioneitol (0.5 M) y 0.035 ml de 2-mercaptoetanol. El extracto crudo enzimático se obtiene por centrifugación a 8000 g durante 30 minutos. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4 °C. Tras la dilución adecuada, la proteína se cuantificó por el método de Bradford (1976). A 100 µl de extracto crudo enzimático se le añadieron 5 ml de reactivo de Bradford y se leyó la absorbancia a 595 nm. El contenido total de proteína se expresa como mg proteína/g peso fresco.

Para determinar la actividad proteasa se incubaron 0.4 ml de extracto crudo con 0.4 ml de tampón Na_2HPO_4 0.5 M y ácido cítrico 0.054 M (pH 4) durante 20 minutos a 30 °C. Tras la incubación se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976). La actividad se expresa como µg proteína degradada/g proteína total · minuto.

3.5.4 Determinación del contenido de clorofila total y actividad clorofilasa

Para la determinación del contenido de clorofila total en hoja se utilizó el método descrito por Toivonen y Sweeney (1998). Se homogeneizó 1 g de material fresco con 20 ml de acetona al 80% (a 4 °C). La muestra se filtró en muselina y el sobrenadante se llevó hasta un volumen de 100 ml con acetona al 80% (a 4 °C). La proteína se

eliminó por precipitación con polietilenglicol y centrifugación a 10000 g durante 10 minutos. La concentración de clorofila se determinó midiendo la absorbancia a 663 y 645 nm.

Para determinar la actividad de la enzima clorofilasa (E.C.3.1.1.14) se homogeneizaron 2.5 g de material fresco de hojas con 37.5 ml de acetona fría al 80%, 0.075 ml de ditiotreitól 0.5 M y 0.0525 ml de 2-mercaptoetanol. El extracto se filtró en placa filtrante y se lavó con acetona fría al 80% hasta eliminar la clorofila. El extracto seco se utilizó para el ensayo de la actividad clorofilasa. A 50 mg de este extracto se le añaden 0.75 ml de tampón fosfato 100 mM a pH 7.2 y como sustrato de la reacción, 0.5 ml de una solución en acetona 80% de clorofila (10 mg/ml) (Sigma C-54753). El ensayo enzimático se lleva a cabo en oscuridad a 30 °C durante 10 minutos. Tras una centrifugación a 4500 g durante 5 minutos se midió la absorbancia del sobrenadante a 663 y 645 nm. La actividad se expresa por diferencia entre el contenido de clorofila sin incubar y después de la incubación. Los resultados se expresan en μg clorofila degradada/g extracto seco \cdot minuto.

3.5.5 Cuantificación de los compuestos fenólicos

Para la determinación de los compuestos fenólicos de pared celular en hoja se siguió el método descrito por Yao et al (1995) y para la cuantificación de la fracción soluble de compuestos fenólicos se empleó el método de Weiss et al (1997).

Para extraer fenoles de hoja se homogeneizó 1 g de material fresco con 5 ml de MeOH/H₂O (80:20). Tras una centrifugación a 8000

g durante 7 minutos el sobrenadante (fracción fenólica soluble) se llevó a sequedad y se redisolvió en MeOH/H₂O (30:70) para la cuantificación de los fenoles por HPLC. El residuo de la centrifugación (aproximadamente 0.1 g) se lavó con MeOH/H₂O (50:50) y se hidrolizó con 2 ml NaOH 1 N (fracción fenólica de pared celular). Tras una centrifugación a 12000 g durante 15 minutos el sobrenadante se acidificó y se extrajo con acetato de etilo. La fracción orgánica se evaporó hasta sequedad y se redisolvió en MeOH/H₂O (30:70) para cuantificar los fenoles por HPLC.

El equipo cromatográfico empleado consistió en un autoinyector 233 y software controlador 720, v 2.01 Gilson (Villiers-le-Bel, Francia), una bomba de baja presión modelo 402 de Gilson y dos bombas de alta presión, modelos 305 y 306 de Gilson. El detector utilizado fue un detector de barrido, modelo 1100 de Hewlett Packard (Waldbronn, Alemania), con un procesado de la señal en estación de trabajo de sistemas de cromatografía líquida de HP con software G2170AA, conjuntamente con un procesado de la señal de 3D con software versión G2180AA de HP.

La fase móvil empleada fue TFA 0.05% en agua y metanol. El gradiente para la fase móvil utilizado fue el siguiente: a t=0 (min) 80:20, a t=5 min 65:35, a t=7 min 20:80, a t= 7.5 min 10:90, a t=8.5 min 10:90, a t=9 min 80:20. La columna analítica fue de 12.5 x 4 mm d.i. modelo Hypersil C₁₈ de 5 μm de Hewlett Packard.

La programación para el equipo detector fue de 328 nm a los 0 min, 350 nm a los 7.90 min y de 375 a los 8.17 min. Las señales de los ácidos fenólicos simples y del ácido clorogénico se integran a 350 nm, mientras que las señales de los flavonoides se integran a 375 nm,

ya que muestran máximos de absorbancia a esas longitudes de onda.

Para la integración de los picos se emplearon patrones comerciales de ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, quercetina aglicona y quercitina. Los tiempos de elución de estos compuestos fueron los siguientes (por orden de más a menos polar): 4.88 min para el ácido clorogénico, 5.65 min para el ácido cafeico, 7.60 min para el ácido ferúlico, 8.10 min para la quercitina y 8.31 min para la quercetina aglicona. Los resultados se expresan como μg compuesto fenólico/g peso fresco para el caso de los fenoles solubles y μg compuesto fenólico/g extracto seco para el caso de los fenoles de pared celular. Los compuestos fenólicos se expresan como ácido clorogénico, fenoles libres totales (que agrupan la suma del ácido cafeico y el ácido ferúlico) y flavonoides (cuantificados como equivalentes de quercitina) tal como se describe en el trabajo de Yao et al (1995).

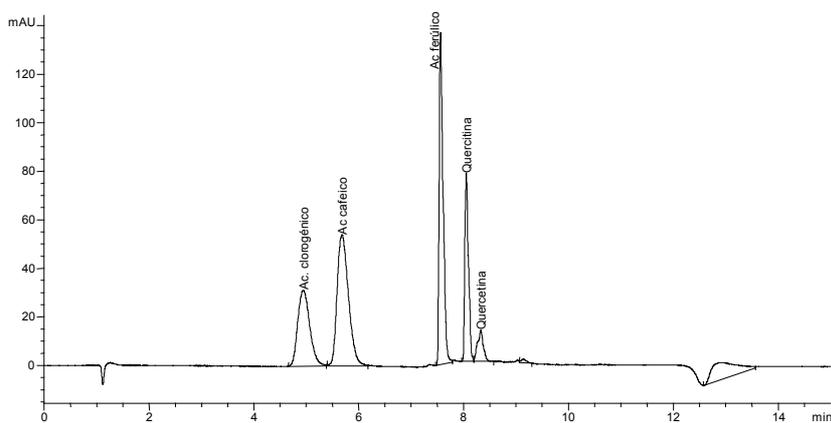


Figura 1. Cromatograma de los patrones utilizados para cuantificar los fenoles de pared celular.

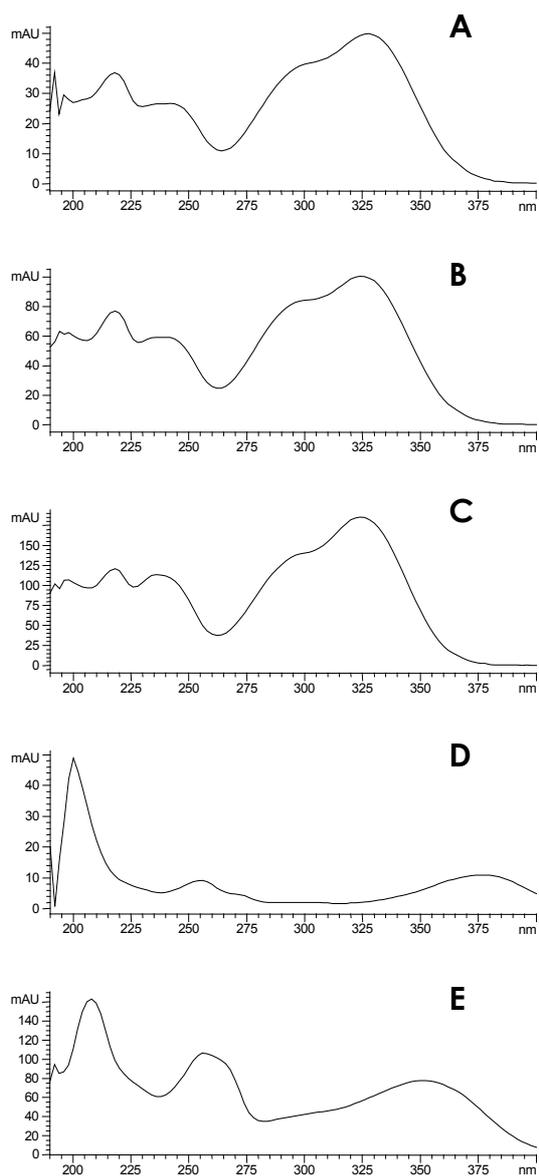


Figura 2. Espectros UV de los compuestos fenólicos analizados.
A → ácido clorogénico
B → ácido cafeico
C → ácido ferúlico
D → quercitina
E → quercetina

3.5.6 Extracción y cuantificación de los azúcares de la pared celular vegetal

La pared celular se extrajo de las hojas de plantas de tomate y pimiento y, posteriormente, el extracto de pared se fraccionó en azúcares celulósicos y en azúcares no celulósicos. En la fracción no celulósica se determinaron los azúcares no celulósicos totales, los ácidos urónicos y los azúcares neutros.

Se homogeneizaron 2 g de material fresco con 25 ml de MeOH (100%) durante 15 minutos. El residuo sólido se lavó secuencialmente con MeOH; acetona:H₂O (8:20) y MeOH:CHCl₃ (1:1). El homogenato se filtró y secó a temperatura ambiente.

La pared celular obtenida (4 mg) se hidrolizó con 2 ml de ácido trifluoroacético (2 N) durante 1 hora. El precipitado obtenido tras una centrifugación a 3500 g durante 10 minutos, se considera la fracción de azúcares celulósicos, y el sobrenadante, la fracción no celulósica. Los azúcares celulósicos se cuantificaron mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois et al, 1956). La fracción celulósica se hidrolizó con 0.2 ml de H₂SO₄ (72%) durante 1 hora. A continuación se le añadieron 5.8 ml de H₂O y se rehidrata a 121 °C durante 1 hora. A 1 ml del sobrenadante se le añadieron 5 ml de PhOH 5% y 5 ml de H₂SO₄ concentrado. A los 30 minutos se determinó la absorbancia a 490 nm, usando glucosa como estándar.

La concentración de azúcares no celulósicos totales se determinó por el método fenol-sulfúrico en una alícuota de 0.4 ml del sobrenadante de azúcares no celulósicos. Otra alícuota se empleó para determinar los ácidos urónicos por el método de Blumenkratz y Absoe-Hansen (1973). A 0.4 ml de sobrenadante se le añadieron en

frío 2.4 ml de tetraborato sódico 12.5 mM en H₂SO₄ concentrado. La muestra se mantuvo en ebullición 5 minutos y se posteriormente enfrió en hielo, tras lo cual se añadieron 40 µl de m-hidroxibifenol al 0.15% en NaOH 0.5%. La concentración de ácidos urónicos se determinó a 520 nm usando como estándar el ácido galacturónico.

La concentración de azúcares se expresa en mg azúcar/g extracto seco de pared celular.

Los azúcares neutros se determinaron por cromatografía de gases. Alícuotas de 0.5 ml se llevaron a sequedad bajo corriente de aire a 50 °C. A continuación se añadieron 0.5 ml de borohidruro sódico (20 mg/ml) disuelto en amoníaco 1 N y se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras añadir unas gotas de ácido acético glacial hasta la desaparición de la efervescencia, se añadieron 1 ml de anhídrido acético y se incubó la reacción 3 horas a 121 °C. Después se extrajeron los azúcares neutros con 1 ml de diclorometano, se llevaron a sequedad y se redisolviaron en 0.3 ml de hexano, tras lo cual se analizaron por cromatografía de gases (CGL). La concentración de azúcares se expresa en mg azúcar/g extracto seco de pared celular.

El equipo cromatográfico empleado fue el siguiente: un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II, equipado con detector selectivo de masas MSD 5971, con ionización por impacto electrónico (70eV) y filtro de masas tipo cuadrupolo. Condiciones de trabajo: columna cromatográfica HP Ultra 2 (cross linked 5% phenyl-methyl-silicone, 25 m × 0.20 mm i.d., 0.33 µm espesor de fase), temperatura del inyector: 250 °C, temperatura de la línea de transferencia al MSD: 280°C, programa de temperaturas: 90 °C (1 min), rampa 30 °C min⁻¹ hasta 180°C, rampa 4 °C min⁻¹ hasta 270 °C (5 min), el gas portador

fue He en condiciones de flujo constante a 0.5 ml min^{-1} , inyección en modo sin división de $2 \mu\text{l}$ con un tiempo de purga cerrada de 0.75 min utilizando inyector automático HP 7673a. La cuantificación se realizó mediante una calibración de nivel simple por estándar externo. Como patrones externos se utilizaron los azúcares comerciales: manosa, glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, a los que se sometió a un proceso de derivatización igual al de las muestras.

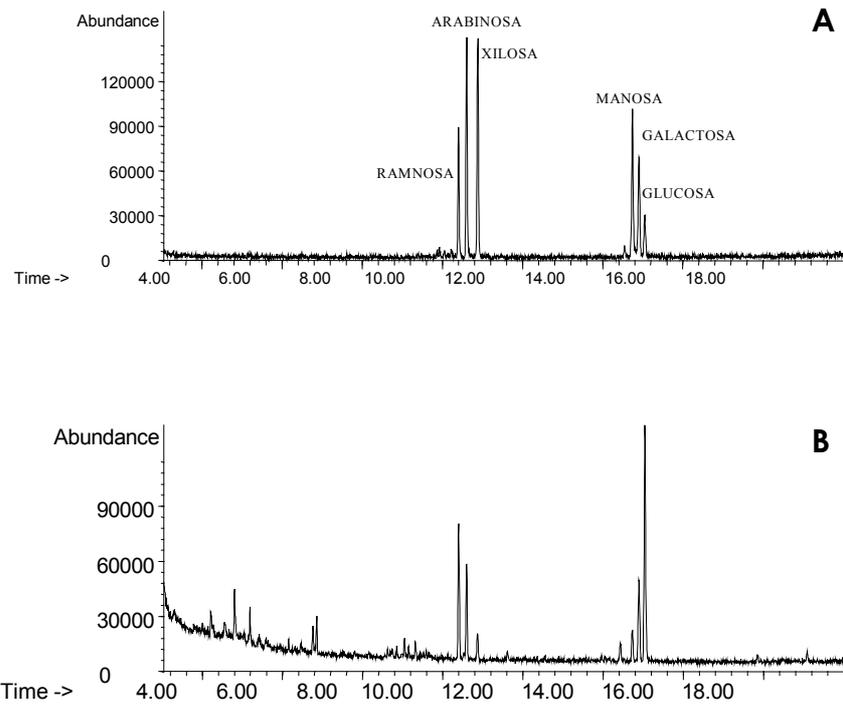


Figura 3. A Cromatograma de los acetatos de alditos utilizados como patrones para la cuantificación de los azúcares de pared. B Cromatograma de azúcares de pared vegetal extraídos y derivatizados según describe el método.

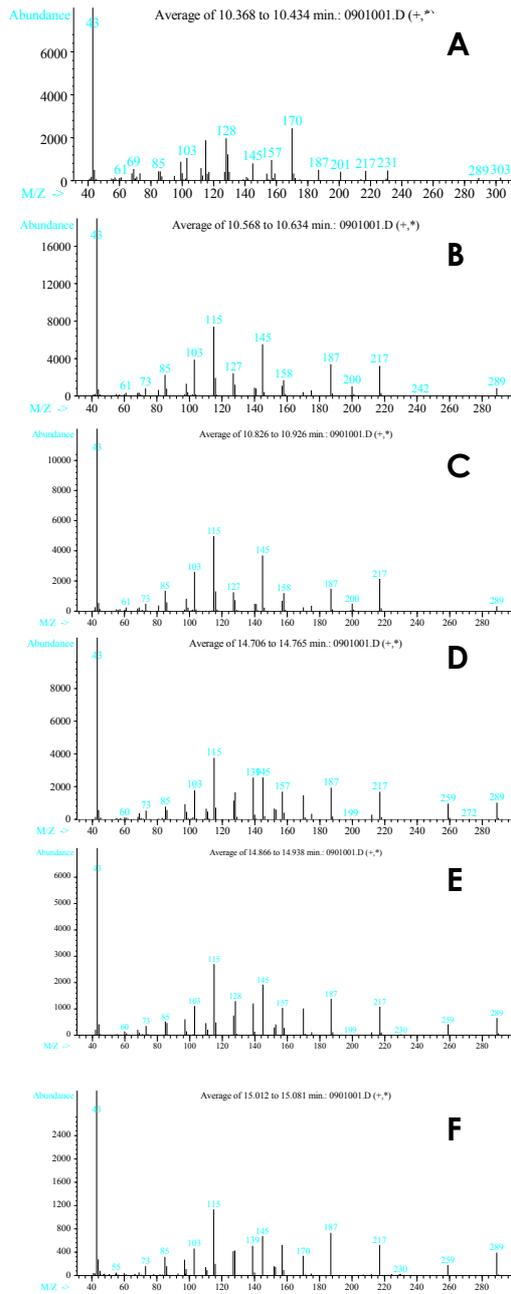


Figura 4. Espectros de los azúcares de pared celular analizados.
 A → Ramnitol acetato
 B → Arabinol acetato
 C → Xilitol acetato
 D → Manitol acetato
 E → Galactitol acetato
 F → Glucitol acetato

3.5.7 Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un gel desnaturalizante de acrilamida y bisacrilamida. El equipo utilizado fue un kit miniprotean de Bio-Rad.

El gel de electroforesis se preparó con una solución al 30% en acrilamida y al 0.8% en bisacrilamida denominada solución A. A 4.16 ml de esta solución se le añadieron 2.5 ml de otra solución que contenía tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, al 0.4% en SDS. Ambas soluciones se aforaron hasta 10 ml con agua bidestilada. A la solución final se le añadieron 50 μ l de persulfato amónico al 10% (p/v) preparado en el momento y 5 μ l de TEMED para catalizar la gelificación. Una vez gelificado el gel de electroforesis se preparó el gel de soporte con 2.3 ml de agua bidestilada, 0.67 ml de solución A, 1 ml de una solución que contenía tampón tris-HCl 0.5 M y SDS al 0.4% , 30 μ l de persulfato amónico al 10% y 5 μ l de TEMED. Se añadió el gel de soporte en la cubeta (sobre el gel de electroforesis ya gelificado), se introdujo el peine y se dejó gelificar unos 90 min.

A 100 μ l de extracto de proteína debidamente diluida se le añadieron 43 μ l de una solución que contenía tris-HCl 0.25M a pH 8, 2-mercaptoetanol 2 M, SDS al 6.6%, glicerol al 31.1% y azul de bromofenol al 0.1%. Los pocillos se cargaron con 25 μ l de la solución anterior, de modo que cada pocillo contenía como mínimo 12 μ g de proteína.

Los geles se montaron en la cubeta de electroforesis que se llenó con un tampón de 0.3% de tris a pH 8.3, 1.44% de Gly y 0.1% de SDS. Una vez montados los geles se cargaron los pocillos con 25 μ l de

muestra y 5 μ l de un patrón de bandas. Se emplearon dos patrones, uno para bandas de bajo peso molecular y otro para bandas de alto peso molecular. El patrón de bandas de bajo peso molecular contenía: citocromo C (12.3 KDa), mioglobulina (16.94 KDa), anhidrasa carbónica (30 KDa), ovoalbúmina (42.7 KDa) y ovotransferasa (78 KDa). El patrón de bandas de alto peso molecular contenía: alcohol deshidrogenasa (39.8 KDa), BSA (66 KDa), β -galactosidasa (116 KDa) y miosina (205 KDa).

La electroforesis se corrió unos 90 minutos con una corriente de 2 mA por pocillo. Posteriormente, tiñeron los geles con un tampón de 0.1 % de azul de Coomasie serie-R250, 45% (v/v) de metanol y un 10% (v/v) de ácido acético glacial. Y luego se destiñeron con MeOH:HAc:H₂O (25:5:70).

3.5.8 Actividad chalcona isomerasa

La extracción de la enzima CHI (E.C.5.5.1.6) y el ensayo se llevaron a cabo según el método descrito por Dixon et al (1982). El sustrato de la reacción se preparó según el método de Geissman y Clinton (1946).

Se homogeneizaron 2 g de material fresco con 5 ml de tampón fosfato 50 mM, 50 μ l de 2-mercaptoetanol 14 M. El extracto crudo se obtuvo por centrifugación a 12000 g durante 30 min a 4 °C. La reacción enzimática se llevó a cabo colocando en un vial 0.45 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 7.5, 0.4 ml de KCN 0.112 M y 0.1 ml de extracto crudo. La reacción comienza cuando se añaden 0.05 ml de 2',4,4'-trihidroxichalcona. La actividad se determinó midiendo la

cinética de desaparición del sustrato a 400 nm durante 1 h. La actividad se expresa como unidades arbitrarias. Una unidad arbitraria es la cantidad de extracto enzimático capaz de producir un incremento de absorbancia (a 400 nm) de 0.01 en un minuto.

La 2',4,4'-trihidroxichalcona se obtiene por condensación alcalina de una cetona y un aldehído en medio etanol alcalino. La síntesis se llevó a cabo en ambiente inerte (N₂) con cantidades equimolares de 2,4-dibenzoiloxiacetofenona y 2-benzoiloxibenzaldehído, añadiendo la cantidad mínima de etanol necesaria para la solución de ambos compuestos. Seguidamente se añadió KOH (2 g por 2 g de cetona). La reacción se mantuvo en baño de arena a 50 °C. Una vez transcurridas 20 h se acidificó con HCl 6 N y se recristalizó en hielo. Los cristales se purificaron por recristalización y, posteriormente, se identificaron, por técnicas de RMN, como 2',4,4'-trihidroxichalcona. Este compuesto se empleó como sustrato de la CHI.

3.5.9 Síntesis del adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa

La reacción de síntesis del adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa consiste en la esterificación de la glucosa 1,2,3,4-tetra-O-acetilo con el monoéster etílico del ácido adípico, utilizando diciclohexilcarbodiimida (DCC) y DMAP sobre un disolvente orgánico. La solución se mantuvo en agitación durante 24 h y la mezcla de reacción se filtra. El filtrado se lavó con éter etílico. Los diferentes lavados se combinaron y se evaporaron, el aceite resultante se purificó por columna de cromatografía, usando como

eluyente una mezcla de hexano:acetato de etilo. El producto se obtiene con un rendimiento aproximado del 93.25%.

Las tablas 4 y 5 muestran el espectro de resonancia magnética nuclear del compuesto TOGE

Tabla 4.- Espectro de ^{13}C RMN de TOGE (6).

δ (ppm)	C
173.0	-O <u>C</u> OCH ₂ -
172.6	<u>C</u> OOCH ₂ CH ₃
169.8	CH ₃ <u>C</u> OO-
169.1	CH ₃ <u>C</u> OO-
168.9	CH ₃ <u>C</u> OO-
168.6	CH ₃ <u>C</u> OO-
91.3	C-1
72.4	C-2, C-3
69.9	C-4
67.5	C-5
61.1	C-6
59.9	COO <u>C</u> H ₂ CH ₃
33.6-33.2	C-2', C-5'
24.0-23.8	C-3', C-4'
20.7	<u>C</u> H ₃ COO-
20.6	<u>C</u> H ₃ COO-
20.5	<u>C</u> H ₃ COO-
20.4	<u>C</u> H ₃ COO-
13.9	COOCH ₂ <u>C</u> H ₃

Tabla 5.- Espectro de ^1H RMN de TOGE (6).

δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	H	Integración
5.5	d		H - 1	1H
5.2	m		H - 3	1H
5.1	m		H - 2	1H
4.2	dd	12.7, 4.6	H - 6	1H
4.1	m		H - 6', CH_2CH_3	3H
3.8	m		H - 5	1H
2.3	m		H - 2'	4H
2.0	2s		$\text{CH}_3\text{COO-}$	12H
1.6	m		H - 3', H - 4'	2H
1.2	t	7.1	CH_2CH_3	3H

3.5.10 Extracción y cuantificación de la actividad de la enzima Fenilalanina amonio liasa, PAL

Para la extracción de la enzima PAL (E.C.4.3.1.5) en plantas de pimiento y tomate tratadas con furfurilamina se utilizó el método de Zucker (1965) y el ensayo enzimático se llevó a cabo según Lamb et al (1979). Para la extracción y cuantificación de la enzima en plantas de tomate tratadas con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 se utilizó el método y Redman (1999).

Se homogeneizaron 1.2 g de material fresco de hojas con 25 ml de acetona fría, añadiendo 35 μl de 2-mercaptoetanol y 50 μl de DTT 0.5 M. Después se filtró a vacío y se lavó con acetona fría (Zucker 1965). Al residuo seco (50 mg) se le añadieron 5 ml de tampón borato 100 mM, manteniéndose en agitación a 4 °C durante 15 minutos. Seguidamente se filtró con muselina y se centrifugó a 1000 g durante

10 minutos a 4 °C. A 0.4 ml del sobrenadante se le añadieron 1.6 ml de tampón borato 50 mM y 1.5 ml de L-fenilalanina. La actividad de la enzima se ha expresado siguiendo la cinética de aparición del producto de la reacción durante 50 minutos a 290 nm. La actividad de la enzima se expresa como unidades catalíticas, donde una unidad catalítica es la cantidad de extracto enzimático capaz de producir un incremento de absorbancia de 0.01 en 1 minuto a 290 nm (Lamb et al, 1979).

Por otro lado, 2.5 g de material fresco se homogeneizaron con 12.5 ml de tampón fosfato 0.01 M a pH 6, 0.025 ml de ditioneitol y 0.0175 ml de 2-mercaptoetanol. A continuación, se centrifugó la mezcla a 8000 g durante 30 minutos. El medio de reacción enzimático contenía 1 ml de tampón Tris-HCl 0.5 M a pH 8, 0.2 ml de extracto crudo enzimático y 6 μ M de L-Phe. La reacción se incubó durante 24 h a 37 °C, tras lo cual se añadieron 0.05 ml de HCl 5 N para detener la reacción y se midió la absorbancia a 290 nm. La concentración del ácido cinámico formado en la reacción se obtuvo interpolando el valor de la absorbancia obtenido en la recta de calibrado (Redman et al, 1999). La actividad de la enzima se expresa como μ M de ácido cinámico/g peso fresco \cdot h.

3.6 Estadística

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa informático Statgraphics Plus versión 2.1. Las medias se han expresado con sus desviaciones estándar. Estas medias se compararon con un test de LSD con un nivel de confianza del 95%.

Las medias, cuyas desviaciones estándar no se superponen, indican que los valores son significativamente diferentes con $P < 0.05$. Todos los experimentos se repitieron como mínimo tres veces.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de la aplicación de distintos principios activos como reguladores del desarrollo en plantas

4.1.1 Tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA

4.1.1.1. Plantas de tomate

a) Sobre el desarrollo

La figura y tabla 1 muestran los resultados de los diferentes tratamientos con FGA en plantas de tomate. A lo largo del desarrollo vegetativo se ha encontrado que a los 50 días después del transplante desde el inicio de la experiencia, el tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA (dosis 1) no ha incrementado significativamente la altura del tallo respecto los controles. Resultados similares se han observado para el resto de tratamientos con FGA (dosis 2 y 3) (Fig 1 A). El mismo efecto ha sido encontrado cuando se ha determinado el diámetro del tallo. El diámetro de la base del tallo se ha incrementado un 12.5% con el tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA (dosis 1) (Fig 1 B). Así mismo se ha observado que este tratamiento ha incrementado un 40% el número de entrenudos cuando se compara con los controles (Fig 1 C).

La tabla 1 muestra los valores del peso fresco y peso seco de las plantas tratadas con FGA y plantas control. Se puede observar que todos los tratamientos han incrementado el peso fresco y seco de las raíces y de la parte aérea, siendo el tratamiento con FGA

(dosis 1) el más eficaz. Este tratamiento ha incrementado el peso fresco y seco de la parte aérea de las plantas un 43 y 13%, respectivamente, así mismo el número de frutos se ha incrementado un 32% con el tratamiento con FGA (dosis 1), sin embargo, no se han observado diferencias significativas para el tratamiento con FGA (dosis 3) respecto de los controles (LSD, $P \leq 0.05$).

Tabla 1. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre el peso fresco y seco de plantas de tomate. Incidencia de los tratamientos sobre el número de frutos (datos obtenidos a los 100 días después del transplante). Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	peso fresco (g)		peso seco (g)		n° de frutos
	raíz	hoja	raíz	hoja	
control	152.9±10.2a	712.5±40.3a	23.5±4.3 ^a	143.5±5.6a	32.0±1.3a
dosis 1	135.8±6.8a	1019.4±56.3b	28.2±2.1b	159.3±1.2b	42.3±2.5b
dosis 2	185.5±25.7b	994.9±26.7c	39.1±3.7c	150.7±2.3c	36.0±2.2c
dosis 3	165±8.9ab	900.3±70.3c	34.2±1.1bc	148.5±4.6ac	34.5±5.1ac

b) Respuesta frente a patógenos (planta entera y hojas aisladas)

Para comprobar la respuesta de las plantas de tomate al tratamiento con FGA frente al ataque de patógenos se utilizó la dosis 1 para estimar el crecimiento de las plantas por ser, en conjunto, la que ha incrementado los diferentes parámetros utilizados. A los 60 días después del transplante plantas tratadas con FGA y plantas control se infectaron con *Phytophthora citrophthora*. Se ha observado que la longitud de la lesión se ha desarrollado más rápidamente en las plantas control que en las plantas tratadas (Fig 2

A). Después de un período de 12 días la respuesta de las plantas tratadas y control ha sido significativamente diferente (LSD, $P \leq 0.05$). Durante este período el tamaño de la lesión ha sido menor en las plantas tratadas. En la figura 2A se puede observar que el tratamiento con FGA retrasa la aparición de la infección desde los 6 días después de la infección, siendo efectivo hasta los 18 días. La infección se ha reducido al final de la experiencia respecto de los controles un 30%.

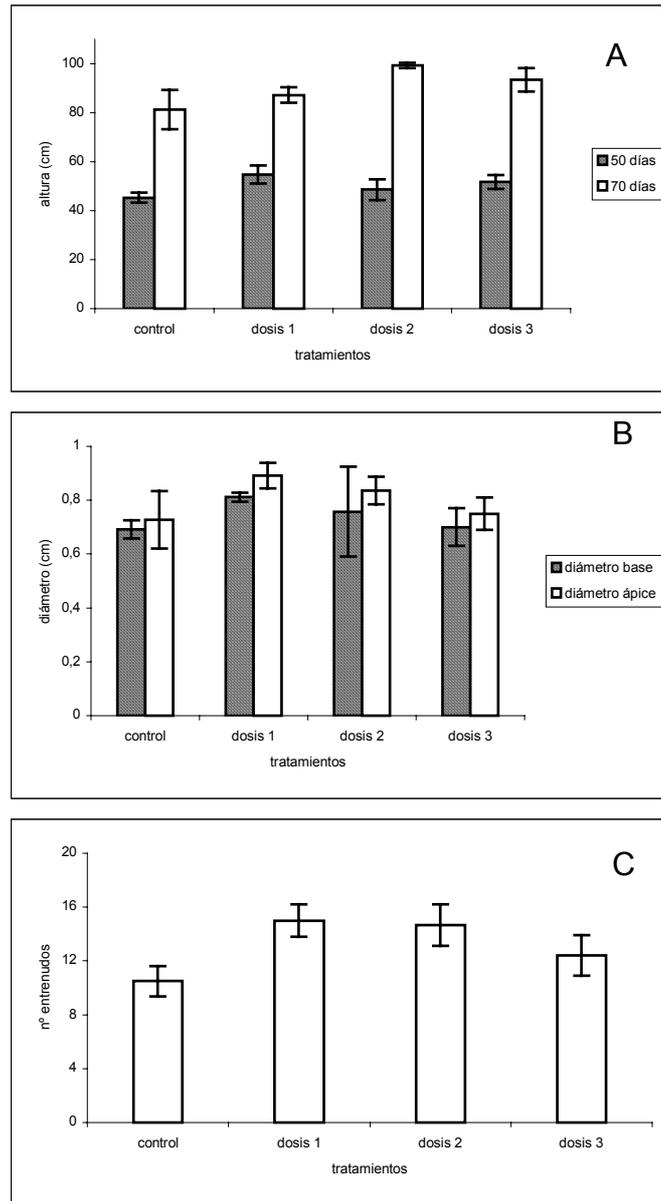


Figura 1. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre el desarrollo de plantas de tomate. (A) altura, (B) diámetro del tallo principal (80 días después del transplante), (C) número de entrenudos (50 días después del transplante). Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

Las plantas tratadas con FGA y control que no fueron inoculadas no han mostrado ninguna infección en la zona de la herida.

Las hojas aisladas procedentes de plantas tratadas con FGA y plantas control que se inocularon con *Alternaria solani* han mostrado, a los 12 días después de la inoculación, una reducción de la infección de un 83% respecto de las controles (Fig 2 B).

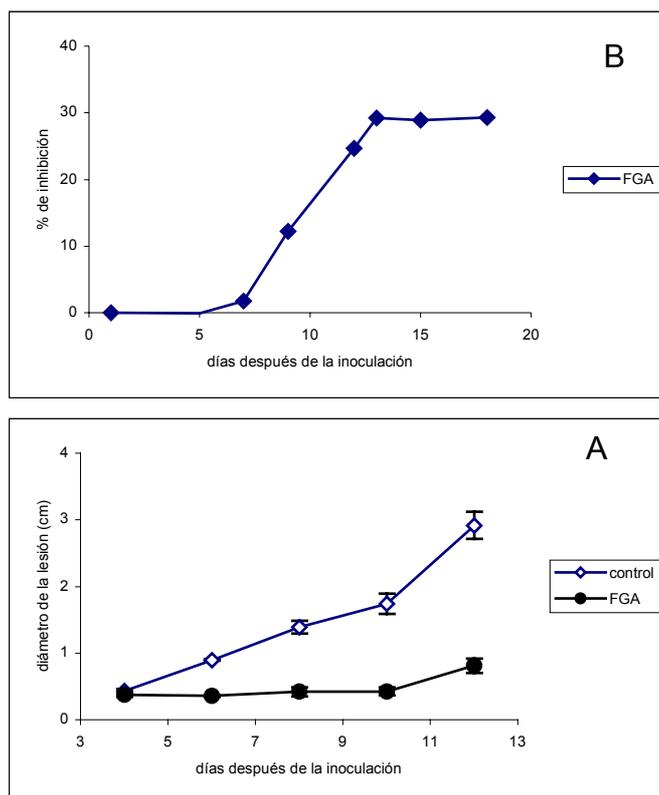


Figura 2. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos inoculados en plantas de tomate: (A) % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Phytophthora citrophthora* a lo largo del tallo respecto de los controles. (B) Diámetro de la lesión (cm) en hojas aisladas de 15 días de edad infectadas con *Alternaria solani*. Desviaciones no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

4.1.1.2 Plantas de pimiento

a) Sobre el desarrollo

En plantas de pimiento al igual que se ha realizado en plantas de tomate se utilizaron 4 tratamientos diferentes con FGA. Ningún tratamiento ha incrementado a los 40 días después del transplante la altura del tallo de las plantas, ni el índice foliar (Fig 3 A y B), sin embargo si que se ha observado un incremento de las estructuras fructíferas (frutos y flores) cuando se ha aplicado el tratamiento con FGA (dosis 1), (Fig 3 C). Se ha observado que este tratamiento también ha incrementado el número de entrenudos aproximadamente un 70% respecto las plantas control. Resultados similares se han encontrado para el tratamiento con FGA (dosis 2) (Fig 4).

b) Respuesta frente a patógenos (planta entera y hojas aisladas)

En plantas de pimiento se ha aplicado el mismo tratamiento que en plantas de tomate para ver la respuesta del tratamiento con los principios activos de la mezcla FGA frente al ataque de patógenos.

Cuando plantas de pimiento han sido inoculadas con *Phytophthora capsici* la aparición de la lesión se ha desarrollado más rápidamente en plantas control que en plantas tratadas (figura 5 A). Se puede observar que durante el proceso de infección el tratamiento reduce el crecimiento del hongo respecto de los

controles. Este efecto ha sido menos pronunciado a partir de los 6 días después de la infección (Fig 5 A). Sin embargo la inhibición del crecimiento del hongo ha resultado menos efectiva que en el cultivo de tomate.

En hojas aisladas procedentes de plantas tratadas con FGA que se infectaron con *Alternaria solani* se ha observado que durante los primeros 12 días de la infección, el tratamiento con FGA ha reducido el diámetro de la infección un 90% respecto de los controles, sin embargo a partir de este día la inhibición ha resultado ser menos acusada (Fig 5 B).

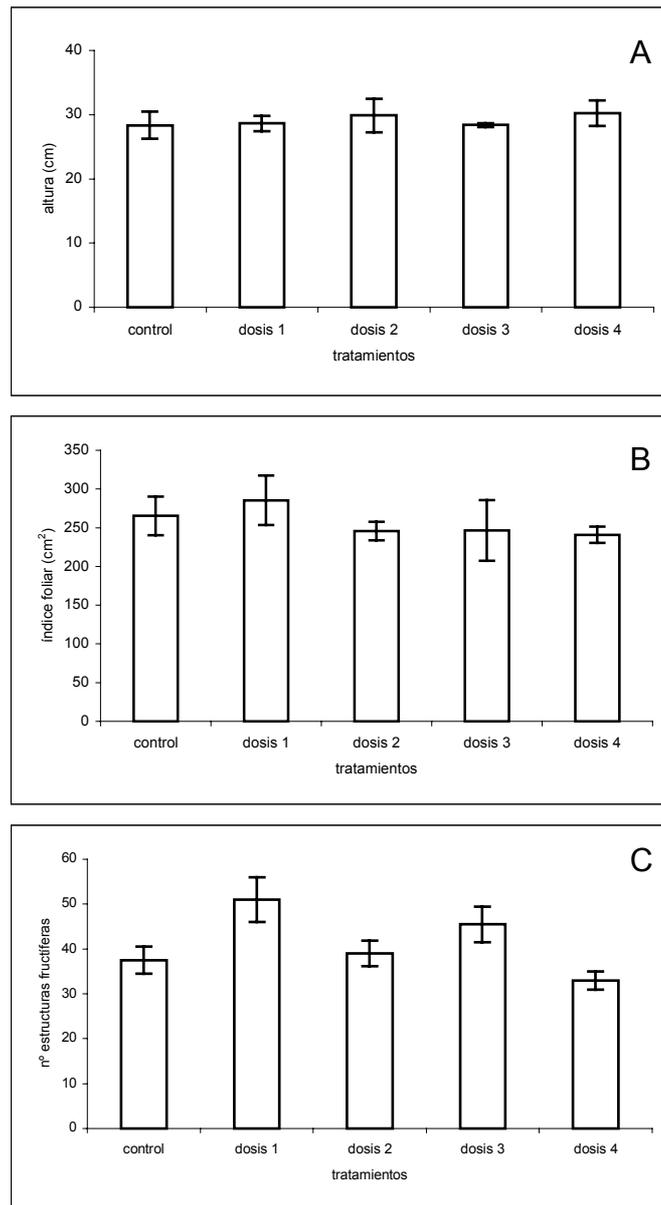


Figura 3. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre el desarrollo de plantas de pimienta (datos obtenidos a los 40 días después del transplante). (A) altura, (B) índice foliar, (C) n° de estructuras fructíferas. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

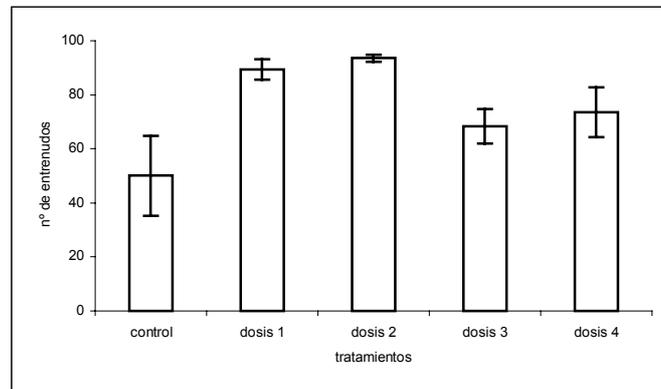


Figura 4. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre el número de entrenudos de plantas de pimiento (datos obtenidos a los 100 días después del transplante). Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

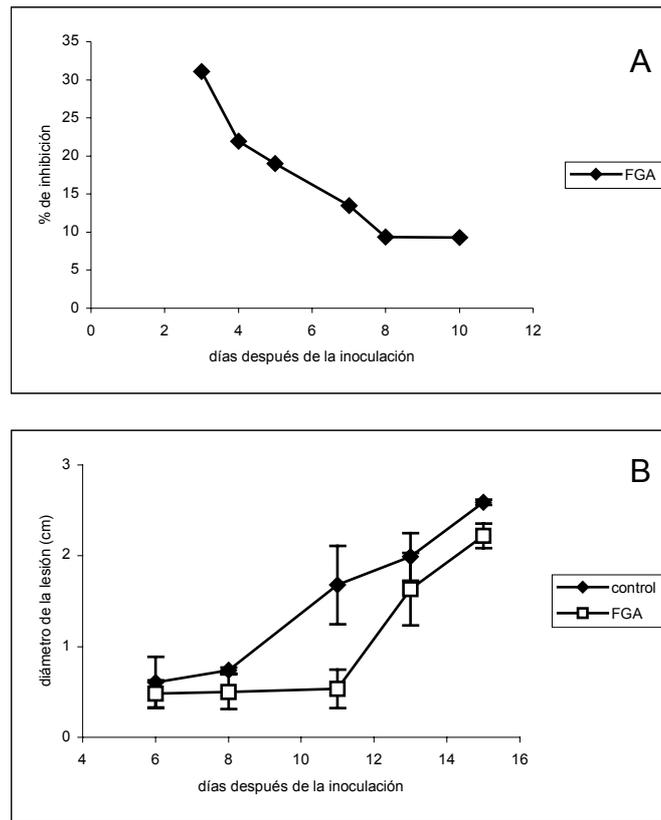


Figura 5. Efecto del tratamiento con los compuestos de la FGA sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos inoculados en plantas de pimiento. (A) % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Phytophthora capsici* a lo largo del tallo respecto de los controles. (B) Diámetro de la lesión (cm) en hojas aisladas de 15 días de edad infectadas con *Alternaria solani*. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

4.1.1.3 Plantas de cítricos

a) Respuesta frente a patógenos (planta entera)

En este experimento, las plántulas de citrange Carrizo fueron tratadas con los principios activos de la mezcla FGA (dosis 1), tratamiento similar al que se ha utilizado para plantas de pimiento. Los resultados han mostrado que en las plantas infectadas con *Phytophthora citrophthora*, al igual que ha ocurrido en cultivos herbáceos (tomate y pimiento), se ha retrasado la aparición de la infección, siendo ésta más acusada en plantas de cítricos.

En la figura 6 se puede observar que durante los 15 primeros días después de la inoculación, el tratamiento con FGA ha reducido la infección hasta un 65% respecto de los controles, manteniéndose esta inhibición a lo largo de la experiencia.

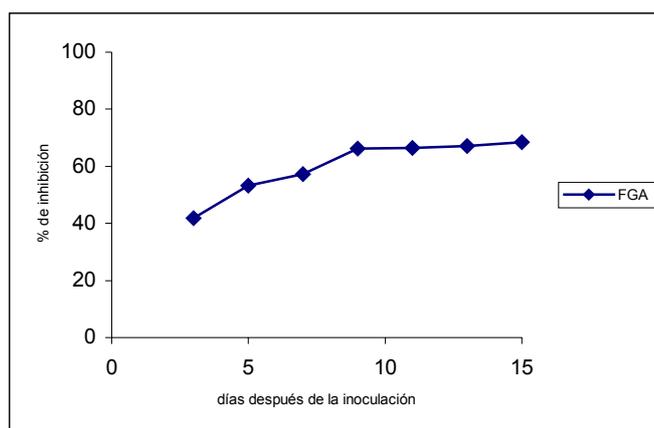


Figura 6. Efecto del tratamiento con los principios activos de la mezcla FGA sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos inoculados en plantas de cítricos. % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Phytophthora citrophthora* a lo largo del tallo respecto de los controles.

4.1.2 Tratamiento con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2

4.1.2.1. Plantas de tomate

a) Sobre el desarrollo

Los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 no han afectado significativamente a la longitud de los entrenudos respecto de los controles (Tabla 2). A partir de los 50 días después del trasplante, el tratamiento con TOGE-2 ha aumentado la altura de las plantas y ambos tratamientos (TOGE-1 y TOGE-2) han incrementado el número de entrenudos. A los 65 días después del trasplante, se ha encontrado un incremento de un 12.5% del número de entrenudos para el tratamiento con TOGE-1 y de un 26.8% para el tratamiento con TOGE-2 (Tabla 2).

Los resultados han mostrado que los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 no han modificado el número de flores respecto de los controles no encontrándose diferencias significativas respecto de los controles (Tabla 3). Sin embargo, se ha producido un incremento significativo del peso fresco del follaje y del peso seco de la raíz en plantas tratadas con ambos compuestos respecto de las plantas control (LSD, $P \leq 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 2. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre la longitud media de los entrenudos, la altura de las plantas y el número de entrenudos. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

días después del transplante	longitud media de los entrenudos		
	control	TOGE-1	TOGE-2
20	6.9±1.0a	6.6±1.5a	7.7±0.8a
35	9.4±0.8a	9.4±2.0a	8.2±1.0a
50	9.7±1.5a	9.1±1.9a	7.9±0.4b
65	10.0±1.3a	8.9±1.4b	9.2±1.0ab
80	8.7±1.1a	8.7±1.1a	9.6±0.5a
días después del transplante	altura media de las plantas		
	control	TOGE-1	TOGE-2
20	41.6±6.1a	45.9±10.2a	49.6±13.4a
35	84.9±19.8a	78.1±16.7b	91.3±18.7a
50	131.5±12.3a	140.1±17.3a	158.8±14.9b
65	159.2±3.4a	156.8±19.5a	187.5±20.6b
80	173.6±8.5a	182.9±19.3a	216.9±13.7b
días después del transplante	número de entrenudos		
	control	TOGE-1	TOGE-2
20	6.0±0.0a	7.0±0.0b	6.7±0.6a
35	9.0±1.7a	8.3±0.6a	11.0±1.0b
50	13.7±2.1a	15.7±1.5b	18.0±2.6c
65	16.0±2.0a	18.0±2.0b	20.3±0.6c
80	20.0±2.0a	21.0±1.0a	22.7±0.6b

Tabla 3. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre el número de flores. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

días después del transplante	nº de flores		
	control	TOGE-1	TOGE-2
35	29.2±4.4a	26.2±5.3a	26.6±5.0a
50	42.8±3.4a	43.0±2.1a	40.8±4.2a
65	46.0±6.7a	45.8±9.2a	54.8±7.6b
80	41.0±7.3a	52.2±4.1b	45.8±6.2a

Tabla 4. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre el peso fresco y seco de plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	peso fresco (g)		
	hoja	tallo	raíz
control	600.0±66.2a	1026.0±128.9a	241.3±37.3a
TOGE-1	1075.0±209.7b	1073.0±44.9a	189.6±10.1a
TOGE-2	978.9±19.0b	662.8±112.9b	267.8±52.3b
tratamiento	peso seco (g)		
	hoja	tallo	raíz
control	148.3±41.7a	138.3±26.3a	24.57±3.9a
TOGE-1	127.5±5.4a	125.4±22.9a	73.3±25.1b
TOGE-2	150.8±18.1b	115.5±28.5a	56.2±9.9b

b) Respuesta frente a patógenos (planta entera y hojas aisladas)

Para ver la respuesta de los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 en plantas de tomate frente al ataque de patógenos se ha seguido el mismo procedimiento que se ha utilizado para el tratamiento FGA.

En la figura 7 A se puede observar que ambos tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2, han retrasado el crecimiento del hongo respecto de los controles, durante el tiempo que ha durado la experiencia. Al principio de la infección se ha reducido el crecimiento del hongo entre un 17 y 20%, llegándose a alcanzar un 40% al final de la experiencia (Fig 7 A).

En hojas aisladas de plantas tratadas con TOGE-1 y TOGE-2 e infectadas con *Alternaria solani* se ha encontrado que el tratamiento con TOGE-2 ha reducido la infección un 58% y el tratamiento con TOGE-1 un 30% al final de la experiencia. Se han encontrado diferencias significativas para ambos tratamientos respecto de los controles (Fig 7 B).

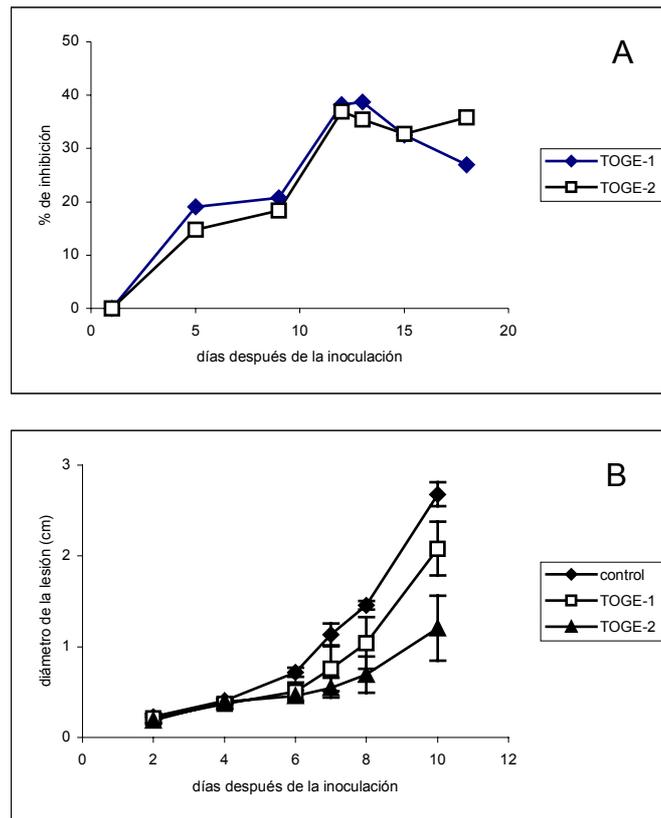


Figura 7. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos inoculados en plantas de tomate. (A) % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Phytophthora citrophthora* a lo largo del tallo respecto de los controles. (B) Diámetro de la lesión (cm) en hojas aisladas de 15 días de edad infectadas con *Alternaria solani*. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

4.1.2.2. Plantas de pimiento

a) Sobre el desarrollo

Se han observado resultados similares a los encontrados en plantas de tomate cuando se ha estudiado el efecto de los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 sobre el número de entrenudos, no observándose diferencias significativas entre ambos tratamientos (LSD, $P \leq 0.05$). Sin embargo, los dos tratamientos han mostrado valores significativamente diferentes respecto de los controles a lo largo de la experiencia (Tabla 5). Al final de misma, el tratamiento con TOGE-1 ha aumentado el número de entrenudos en un 20% aproximadamente y el tratamiento con TOGE-2 un 50%, siendo significativamente diferentes ambos tratamientos. Sin embargo, ambos tratamientos no han incrementado significativamente la altura de las plantas a lo largo del ciclo vegetativo (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de los tratamientos los los compuestos de las mezclas TOGE-1y TOGE-2 sobre la altura y el número de entrenudos en plantas de pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

días después del trasplante	altura media de las plantas		
	control	TOGE-1	TOGE-2
60	66.6±8.7a	65.3±3.1a	67.7±5.3a
80	80.2±9.7a	83.4±9.1a	80.9±10.0a
90	81.0±4.2a	104.7±7.5b	88.3±8.4a
días después del trasplante	número de entrenudos		
	control	TOGE-1	TOGE-2
35	16.0±1.4a	24.6±3.4b	23.3±4.3b
50	31.5±7.8a	49.2±3.8b	42.0±11.4b
90	69.0±1.4a	82.5±9.2b	103.7±10.5b

b) Respuesta frente a patógenos (planta entera y hojas aisladas)

Cuando las plantas de pimiento eran inoculadas con *Phytophthora capsici* los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 retrasaron la aparición de la lesión respecto de las plantas control (Fig 8 A). El porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo a lo largo del tallo fue más marcado durante los cinco primeros días después de la inoculación, llegándose a alcanzar un 30% de inhibición con el tratamiento con TOGE-2 respecto de los controles. Se han observado reducciones significativas del crecimiento del hongo en las plantas tratadas con TOGE-1 y TOGE-2 respecto de los controles, sin embargo, esta reducción ha sido menos acusada que en plantas de tomate (Fig 8 A).

Cuando hojas aisladas procedentes de plantas tratadas con TOGE-1 y TOGE-2 se infectan con *Alternaria solani* se observa que ambos tratamientos reducen el diámetro de la lesión. Se han encontrado diferencias significativas respecto de los controles a lo largo de la experiencia para ambos tratamientos. Sin embargo, no se han observado diferencias significativas entre ambos tratamientos durante la experiencia (Fig 8 B) (LSD, $P \leq 0.05$).

4.1.2.3 Plantas de cítricos

a) Respuesta frente a patógenos (planta entera)

Los resultados del ensayo realizado en plántulas de cítricos que fueron inoculados con *Phytophthora citrophthora* mostraron una respuesta similar a la encontrada en plantas herbáceas. El tratamiento con TOGE-2 ha sido el más eficaz, encontrándose valores similares para la longitud de la lesión a lo largo del tallo desde el inicio de la experiencia y mostrando diferencias significativas respecto de las plantas control (LSD, $P \leq 0.05$). A los 15 días después de la inoculación, el tratamiento con TOGE-2 ha retrasado el crecimiento del hongo un 75% respecto de los controles. El tratamiento con los compuestos de la mezcla TOGE-1 también ha retrasado la infección del hongo a lo largo de toda la experiencia, siendo su efecto menos acusado que el tratamiento TOGE-2, al final de la experiencia ha reducido el crecimiento del hongo un 40% (Fig 9).

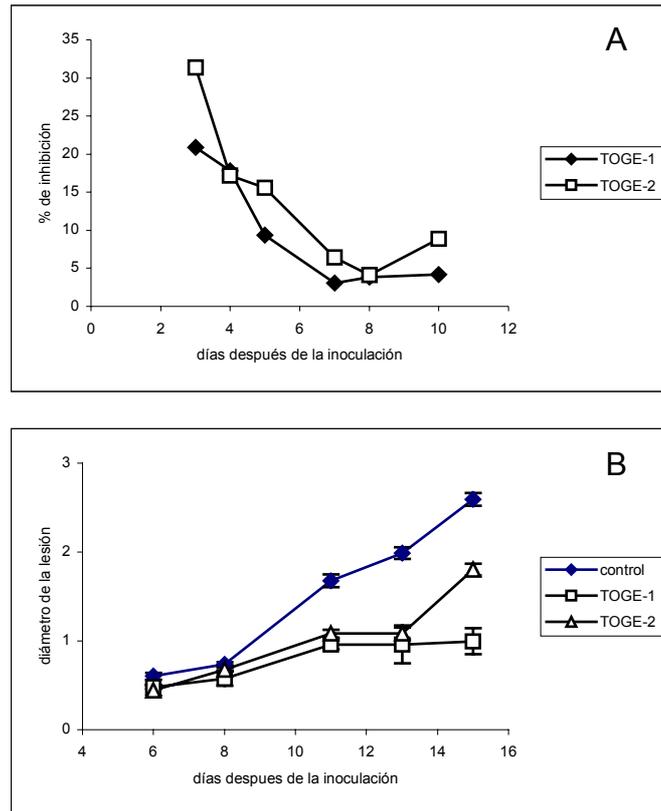


Figura 8. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos inoculados en plantas de pimienta. (A) % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Phytophthora capsici* a lo largo del tallo respecto de los controles. (B) Diámetro de la lesión (cm) en hojas aisladas de 15 días de edad infectadas con *Alternaria solani*. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

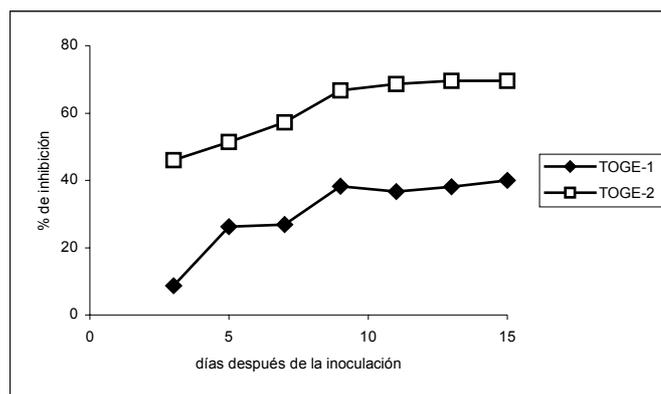


Figura 9. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos inoculados en plantas de cítricos. % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Phytophthora citrophthora* a lo largo del tallo respecto de los controles.

4.2 Caracterización bioquímica de los efectos producidos por la aplicación de distintos principios activos como reguladores del desarrollo en plantas

4.2.1 Tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA

4.2.1.1 Plantas de tomate

a) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso

Se ha estudiado el efecto del tratamiento con FGA sobre la tasa fotosintética, la tasa de transpiración y el uso eficiente del agua. Los diferentes tratamientos con FGA han mostrado un comportamiento similar en todos los parámetros bioquímicos estudiados. Durante los primeros 86 días después del trasplante se

ha observado en las plantas tratadas un aumento de la tasa fotosintética y una disminución de la transpiración, lo que ha conducido a un aumento del uso eficiente del agua respecto las plantas control. Sin embargo, a los 100 días después del transplante se han invertido los resultados, alcanzándose valores similares del uso eficiente del agua en las plantas tratadas y en las plantas control (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre la tasa fotosintética, la transpiración y el uso eficiente del agua (uea) en plantas de tomate. Desviaciones no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	tasa fotosintética ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	tasa transpiración ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	uea ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)
dos tratamientos (56 días)			
control	6.7±0.9	2.7±0.1	2.5±0.5
dosis 1	7.1±2.0	1.1±0.4	6.2±1.0
dosis 2	6.5±0.9	0.9±0.3	7.5±0.9
dosis 3	7.0±1.0	1.2±0.5	5.8±0.8
cuatro tratamientos (86 días)			
control	3.3±0.1	4.0±0.5	0.8±0.1
dosis 1	4.5±0.6	1.7±0.4	2.6±1.0
dosis 2	3.9±0.7	1.7±0.4	2.3±0.8
dosis 3	3.4±0.2	2.3±0.1	1.4±0.1
cinco tratamientos (100 días)			
control	4.2±0.5	3.0±0.8	1.4±0.5
dosis 1	4.5±0.1	5.2±0.9	0.8±0.3
dosis 2	6.5±0.9	5.5±0.3	1.2±0.4
dosis 3	7.2±1.0	4.7±1.0	1.5±0.2

b) Estudio de los mecanismos implicados en la defensa de las plantas**b.i.) Estudio de la ruta fenilpropanoide**

Las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona isomerasa (CHI) son enzimas características de la ruta fenilpropanoide. La tabla 8, muestra que la aplicación con los compuestos de la mezcla FGA incrementa la actividad PAL en más de un 100% respecto de los controles cuando se ha aplicado la dosis 1, existiendo diferencias significativas respecto de los controles. Asimismo la actividad CHI se ha incrementado un 75% respecto de los controles (Tabla 7).

La aplicación exógena del tratamiento con FGA (dosis 1) ha inducido un incremento de los compuestos antipatogénicos solubles tales como: fenoles libres, ácido clorogénico y flavonoides mostrando diferencias significativas respecto de los controles. También se ha observado un incremento en el contenido de fenoles libres y flavonoides de la fracción fenólica de pared celular (Tabla 8).

Tabla 7. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona isomerasa (CHI) en plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

	PAL	CHI
	[ácido cinámico] ($\mu\text{M/g}$ peso fresco \cdot h) $\times 10^{-2}$	unidades arbitrarias
control	17.0 \pm 2.0a	5.98 \pm 1.06 a
FGA	34.0 \pm 5.0b	10.54 \pm 1.82b

Tabla 8. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre la composición fenólica de plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

fenoles de pared celular ($\mu\text{g/g}$ extracto seco)			
tratamiento	fenoles libres	ácido clorogénico	flavonoides
control	178 \pm 14a	-	1.3 \pm 0.1a
FGA	430 \pm 20b	-	3.1 \pm 0.1b
fenoles solubles ($\mu\text{g/g}$ extracto seco)			
tratamiento	fenoles libres	ácido clorogénico	flavonoides
control	0 \pm 0a	9.4 \pm 0.7a	119 \pm 8a
FGA	112.4 \pm 7b	45.7 \pm 4.0b	212 \pm 7b

b.i.i.) Cuantificación de carbohidratos de pared celular

Se ha estudiado también el efecto del tratamiento con FGA sobre los azúcares celulósicos, no celulósicos y ácidos urónicos. Los resultados mostrados en la tabla 9 indican que todos los tratamientos han incrementado el contenido en ácidos urónicos y azúcares no celulósicos, sin embargo, no se ha observado, en general, un incremento significativo del contenido de azúcares celulósicos (LSD, $P \leq 0.05$).

Tabla 9. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre los azúcares de pared celular de plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	azúcares celulósicos (mg /g extracto seco)	ácidos urónicos (mg /g extracto seco)	azúcares no celulósicos (mg /g extracto seco)
control	26.0±1.8a	60.0±7.3a	51.8±5.2a
dosis 1	24.3±3.1a	114.6±8.5b	110.1±9.7b
dosis 2	22.5±0.3a	123.9±5.4b	124.5±13.8b
dosis 3	33.6±3.7b	91.9±1.6c	79.8±9.1c

La determinación de los azúcares neutros de pared celular por cromatografía de gases ha mostrado para todos los tratamientos con FGA un incremento, siendo éste más acusado en los azúcares arabinosa y glucosa (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de los tratamientos con los compuestos de la mezcla FGA sobre la concentración de azúcares neutros de pared celular en hojas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

	azúcares neutros (µg de azúcar / g extracto seco)			
	control	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
ramnosa	33.8±4.1a	104.0±12.7b	92.0±9.0b	61.2±5.5c
arabinosa	10.1±2.9a	39.5±4.0b	20.3±2.6ab	18.0±3.7ab
xilosa	4.3±2.5a	13.9±2.5b	6.3±1.4ab	7.0±2.1ab
manosa	4.8±2.9a	12.3±1.9b	11.4±3.6ab	8.3±1.5ab
galactosa	25.7±3.3a	85.5±21.1b	122.4±14.5b	45.4±5.4ab
glucosa	144.1±30.2a	456.9±72.1b	265.1±33.7c	295.5±12.7c

c) Estudio de las enzimas implicadas en procesos de senescencia y del contenido de proteína y clorofila

Al final de la experiencia, las plantas tratadas con el tratamiento con FGA, han mostrado un contenido de clorofila superior a los controles. Se ha encontrado que en plantas tratadas el contenido de clorofila ha aumentado un 22% respecto a los controles (Tabla 11). En cuanto al contenido de proteínas se ha observado en plantas tratadas que se ha incrementado un 36% al final de la experiencia. Se han encontrado diferencias significativas en plantas tratadas respecto los controles (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre la concentración de clorofila y proteína en plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	[clorofila] (mg/g peso fresco)	[proteína] (mg/g peso fresco)
control	0.18±0.02a	3.14±0.32a
FGA	0.22±0.02b	4.29±0.46b

El tratamiento con FGA también ha reducido la actividad de las peroxidasas ácidas (Tabla 12). Las actividades enzimáticas clorofilasa, proteasas y peroxidasa, que participan activamente en el proceso de senescencia, se han reducido a lo largo de la experiencia cuando se han tratado las plantas con el tratamiento con FGA. La reducción de las actividades de estas enzimas es de un

60% aproximadamente. La foto 1 ilustra un ejemplo de la pérdida de clorofila en las plantas control frente a las tratadas con FGA.

Tabla 12. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre la actividad de las enzimas clorofilasa, proteasas y peroxidasa en plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	clorofilasa (μg clorofila degradada/ g peso seco \cdot min)	proteasas (μg proteína degradada/mg proteína total \cdot min)	peroxidasa (unidades catalíticas/ mg proteína total)
control	1.52 \pm 0.09a	16.2 \pm 3.5a	447 \pm 33a
FGA	0.50 \pm 0.15b	5.7 \pm 0.2b	171 \pm 35.2b

4.2.1.2 Plantas de pimiento

a) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso

No existen claras diferencias entre los parámetros de intercambio gaseoso cuando se aplican las diferentes dosis de los compuestos de la mezcla FGA en las plantas de pimiento. Cabría destacar que la dosis 1 de los compuestos de la mezcla FGA ha incrementado ligeramente la tasa fotosintética y ha reducido la tasa de transpiración lo que implica un aumento del uso eficiente del agua de 1.2 veces a los 50 días y de 2 veces a los 86 días después del trasplante respecto de las plantas control. A los 100 días, la tasa fotosintética no muestra diferencias entre las diferentes dosis y los

controles, la transpiración aumenta ligeramente y los valores para el uso eficiente del agua no muestran diferencias significativas respecto de los controles (LSD, $P \leq 0.05$). Las plantas de pimiento tratadas con la dosis 1 del compuesto FGA mostraron un comportamiento muy similar a las plantas de tomate (Tabla 13).



Foto 1. Efecto del tratamiento FGA sobre el retraso de la degradación de la clorofila en plantas de tomate.

Tabla 13. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre el intercambio de CO₂, la tasa fotosintética, la transpiración y el uso eficiente del agua (uea) de plantas de pimiento. Desviaciones no superpuestas indican diferencias significativas con P≤0.05 (test LSD).

tratamiento	tasa fotosintética ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	tasa transpiración ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	uea ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)
dos tratamientos (56 días)			
control	19.6±1.8	5.4±0.6	3.6±0.5
dosis 1	26.2±0.1	5.1±0.1	5.1±0.1
dosis 2	17.2±0.8	4.5±0.1	3.8±1.0
dosis 3	20.1±0.6	5.1±0.1	3.9±0.3
dosis 4	20.0±1.7	4.5±0.3	4.4±0.1
cuatro tratamientos (86 días)			
control	16.7±2.6	10.3±0.5	1.6±0.3
dosis 1	27.1±4.5	9.1±0.4	3.0±0.2
dosis 2	17.5±1.8	7.7±2.0	2.3±0.3
dosis 3	12.8±1.5	5.3±0.9	2.4±0.3
dosis 4	14.1±0.7	6.0±0.6	2.3±0.2
cinco tratamientos (100 días)			
control	11.9±1.6	5.7±1.3	2.1±0.1
dosis 1	11.3±0.2	6.1±0.1	1.8±0.2
dosis 2	11.1±0.8	3.7±0.5	3.0±0.1
dosis 3	13.3±0.2	11.8±0.2	1.1±0.6
dosis 4	14.0±3.7	8.8±1.1	1.6±0.2

b) Estudio de los mecanismos implicados en la defensa de las plantas

b.i.) Estudio de la ruta fenilpropanoide

Los diferentes tratamientos con FGA indujeron un incremento de la actividad enzimática PAL, alcanzándose valores 2 veces superiores con el tratamiento con FGA (dosis 1), mostrando

diferencias significativas respecto de los controles (LSD, $P \leq 0.05$) (Tabla 14).

La respuesta del tratamiento con FGA respecto al contenido de los compuestos antipatogénicos solubles (fenoles libres, ácido clorogénico y flavonoides) ha sido efectiva para el contenido de flavonoides y ácido clorogénico, sin embargo, tan solo se han observado trazas de fenoles libres en plantas tratadas respecto de los controles. Respecto al contenido de fenoles de pared celular cabe destacar que ha no ha habido diferencias significativas entre las plantas control y los tratamientos (Tabla 15).

Tabla 14. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en plantas de pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	unidades catalíticas
control	13.92±0.84a
FGA	28.80±1.68b

Tabla 15. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre la composición fenólica de plantas de pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

fenoles de pared celular (μg fenol/g extracto seco)			
tratamiento	fenoles libres	ácido clorogénico	flavonoides
control	10 \pm 3a	-	248 \pm 34a
FGA	10 \pm 2a	-	221 \pm 38a
fenoles solubles (μg fenol/g peso fresco)			
tratamiento	fenoles libres	ácido clorogénico	flavonoides
control	48 \pm 6a	80 \pm 6a	338 \pm 32a
FGA	-	180 \pm 28b	818 \pm 61b

b.i.i.) Cuantificación de carbohidratos de pared celular

La acumulación de carbohidratos de pared celular en las plantas tratadas ha variado dependiendo del tratamiento con FGA. La dosis 1 del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA ha inducido un incremento en todos los azúcares de pared celular, tanto celulósicos como no celulósicos totales, así como en los ácidos urónicos (Tabla 16). Así mismo se ha producido un incremento significativo de todos los azúcares neutros no celulósicos cuando las plantas han sido tratadas con FGA (dosis 1) (LSD, $p \leq 0,5\%$). El resto de tratamientos no ha inducido cambios significativos respecto de las plantas control (Tabla 17).

Tabla 16. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre los azúcares de pared celular en plantas de pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	azúcares celulósicos (mg/g extracto seco)	ácidos urónicos (mg/g extracto seco)	azúcares no celulósicos totales (mg/g extracto seco)
control	54±2a	165±2a	390±10a
dosis 1	77±5b	180±2c	400±10a
dosis 2	47±13a	154±13ab	290±10b
dosis 3	52±7a	127±3b	260±7b
dosis 4	76±19b	144±19b	300±6b

Tabla 17. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre los azúcares neutros de pared celular en plantas de pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

	azúcares neutros (µg de azúcar/g extracto seco)				
	control	dosis 1	dosis 2	dosis 3	dosis 4
ramnosa	364.9±8.8a	418.3±28.2b	268.0±21.3c	219.4±13.6c	246.1±88.3ac
arabinosa	409.5±12.6a	544.2±61.1b	349.5±36.5ac	263.5±18.7c	231.8±112.2c
xilosa	182.4±1.0a	224.1±21.4b	149.5±6.9c	98.7±8.1d	206.1±25.0b
galactosa	5119.9±341.9a	3349.5±252.4b	2165.2±45.3c	3129.4±245.3b	1673.6±302.3d
glucosa	2136.2±49.2a	2453.4±322.5a	1503.5±65.9bc	1614.1±100.6b	980.8±243.6c

c) Estudio de las enzimas implicadas en procesos de senescencia y del contenido de proteína y clorofila

El tratamiento con FGA (dosis 1) en plantas de pimiento ha incrementado un 5% el contenido de clorofila y un 15% el contenido de proteína. Las plantas tratadas han mostrado diferencias significativas en el contenido de clorofila y proteína respecto de los controles (Tabla 17).

Las actividades enzimáticas clorofilasa, proteasas y peroxidasa, que participan activamente en los procesos de senescencia, se han reducido significativamente respecto de los controles a lo largo de la experiencia cuando se ha aplicado el tratamiento con FGA (Tabla 19). Las actividades clorofilasa y peroxidasa se han reducido un 36% y un 42%, respectivamente. El tratamiento FGA por el contrario no ha mostrado diferencias significativas respecto de los controles para la actividad proteasa (Tabla 19).

Tabla 18. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre la concentración de clorofila y proteínas en plantas de pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	[clorofila] (mg/g peso fresco)	[proteína] (mg/g peso fresco)
control	0.59±0.02a	2.70±0.54a
FGA	0.62±0.06b	3.11±1.12a

Tabla 19. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre la actividad de las enzimas clorofilasa, proteasas y peroxidasa en plantas de pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	clorofilasa (μg clorofila degradada/ g peso seco \cdot min)	proteasas (μg proteína degradada/mg proteína total \cdot min)	peroxidasa (unidades catalíticas/mg proteína total)
control	2.86 \pm 0,04a	31.8 \pm 2.8a	75 \pm 2a
FGA	1.81 \pm 0,16b	34.3 \pm 3.9a	43 \pm 2b

d) Identificación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto proteico ha revelado un patrón de bandas diferente en las plantas tratadas y en las plantas control. Las plantas control presentan una banda proteica con un peso molecular aproximado de 148 KDa, banda que ha desaparecido en plantas tratadas con FGA (Fig 10). Así mismo, en las plantas control la banda de 68 KDa se ha subdividido en otros dos bandas en plantas tratadas

En las plantas tratadas con FGA se ha observado una banda intensa de unos 27 KDa. Sin embargo, en las plantas control dicha banda ha perdido intensidad (Fig 10).

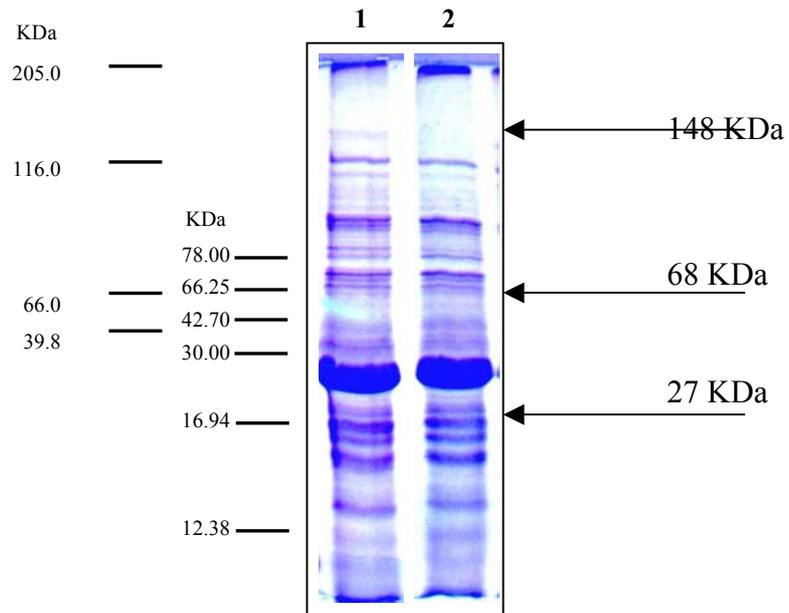


Figura 10. Electroforesis en gel desnaturalizante de proteínas de plantas de pimiento. Carrera 1: plantas control. Carrera 2: plantas tratadas con FGA (dosis 1). (En el margen se indican los pesos moleculares de los patrones de bandas utilizados).

4.2.2 Tratamiento con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2

4.2.2.1 Plantas de tomate

Para estudiar el efecto de los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 sobre los diferentes parámetros bioquímicos se ha utilizado la misma dosis que se había aplicado a los ensayos planta-patógeno.

a) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso

La respuesta de las plantas de tomate a estos tratamientos ha sido muy similar a la observada con el tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA. Los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 han inducido un aumento de la tasa fotosintética y del uso eficiente del agua respecto a las plantas control durante casi todo el ciclo del cultivo (86-90 días). Sin embargo, a diferencia de lo que ha ocurrido con el tratamiento con FGA, con estos tratamientos no se ha producido una disminución de la transpiración (Tabla 20).

Al final del ciclo (100 días después del transplante), no se han encontrado en las plantas tratadas valores significativamente diferentes a los de las plantas control para el uso eficiente del agua (LSD, $P \leq 0.05$), siendo éste un comportamiento muy similar al observado cuando se han aplicado los diferentes tratamientos con FGA (Tabla 20).

Tabla 20. Efecto de los tratamientos TOGE-1 y TOGE-2 sobre la tasa fotosintética, la transpiración y el uso eficiente del agua (uea) en plantas de tomate. Desviaciones no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	tasa fotosintética ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	tasa transpiración ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	uea ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)
dos tratamientos (56 días)			
control	10.4±0.2	4.2±0.12	2.5±0.1
TOGE-1	15.8±1.32	5.0±0.5	3.3±0.3
TOGE-2	13.7±3.8	4.6±1.1	2.6±0.6
cuatro tratamientos (86 días)			
control	8.3±1.5	3.3±0.6	2.5±0.1
TOGE-1	15.7±0.6	4.9±0.12	3.3±0.3
TOGE-2	15.2±2.4	6.3±1.2	2.9±0.6
cinco tratamientos (100 días)			
control	6.7±1.0	2.3±0.5	2.7±0.8
TOGE-1	5.1±0.6	3.7±0.5	1.4±0.4
TOGE-2	13.9±0.6	5.1±0.4	2.1±0.8

b) Estudio de los mecanismos implicados en la defensa de las plantas

b.i.) Estudio de la ruta fenilpropanoide

Los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 han incrementado las actividades enzimáticas fenilalanina amonio liasa y chalcona isomerasa cuando se han aplicado a plantas de tomate. Se puede observar que ambos tratamientos han aumentado significativamente la actividad de la enzima chalcona isomerasa. La actividad de la

enzima fenilalanina amonio liasa también se ha visto estimulada con los tratamientos aunque su efecto ha sido menos acusado (Tabla 21).

La respuesta de las plantas a estos tratamientos ha sido similar a la observada con el tratamiento FGA. Sin embargo, hay que destacar que el tratamiento FGA ha sido más eficaz para la actividad PAL que los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2.

Tabla 21. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona isomerasa (CHI) en plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD)

tratamiento	PAL	CHI
	[ácido cinámico] ($\mu\text{M/g}$ peso fresco \cdot h) $\times 10^{-2}$	unidades arbitrarias
control	17.0 \pm 2.0a	5.98 \pm 1.06a
TOGE-1	20.0 \pm 3.0b	10.32 \pm 0.86b
TOGE-2	18.0 \pm 3.0ab	15.78 \pm 2.86c

c) Estudio de las enzimas implicadas en procesos de senescencia y del contenido de proteína y clorofila

Al final de la experiencia las plantas tratadas con TOGE-1 y TOGE-2 han mostrado un contenido de clorofila superior a los controles, no observándose diferencias significativas entre ambos tratamientos. Se ha encontrado que en plantas tratadas el contenido de clorofila ha aumentado un 20% respecto a los controles (Tabla 22).

Por el contrario, sí que se han observado diferencias significativas entre las plantas tratadas con TOGE-1 y TOGE-2 y las plantas control (LSD, $P \leq 0.05$).

En cuanto al contenido de proteína se ha observado una respuesta similar a la encontrada para el contenido de clorofila. En las plantas tratadas con ambos compuestos se ha encontrado un incremento significativo de la proteína en hojas respecto a los controles. Éste incremento ha sido más acusado con el tratamiento con TOGE-2 (55%) que con el tratamiento con TOGE-1 (32%) (Tabla 22).

Tabla 22. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre la concentración de clorofila y proteínas en plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD)

tratamiento	[chl] (mg/g peso fresco)	[proteína] total (mg/g peso fresco)
control	0.180±0.006a	3.14±0.32a
TOGE-1	0.220±0.002b	4.16±0.46b
TOGE-2	0.210±0.005b	4.89±0.78b

Las actividades de las enzimas clorofilasa, proteasas y peroxidasa, que participan activamente en los procesos de senescencia, se han reducido significativamente a lo largo de la experiencia en las plantas tratadas respecto de los controles (LSD, $p \leq 0.05$). La inhibición parcial de las enzimas ha sido más acusada en peroxidasa, que en clorofilasa y proteasas. El tratamiento con TOGE-2 ha sido el más efectivo respecto al tratamiento con TOGE-1 y a los controles. La actividad peroxidasa se ha reducido un 59% con el

tratamiento con TOGE-2 y un 38% con el tratamiento con TOGE-1. Sin embargo, la actividad proteasa no se ha reducido significativamente con TOGE-1 respecto de los controles, al igual que ha ocurrido con la actividad clorofilasa (Tabla 23). El tratamiento con los compuestos de las mezclas TOGE-2 y FGA han mostrado resultados similares respecto al efecto que han causado sobre las actividades enzimáticas clorofilasa, proteasas y peroxidasa.

Tabla 23. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre la actividad de las enzimas clorofilasa, proteasas y peroxidasa en plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	clorofilasa (μg clorofila degradada/ g peso seco \cdot min)	proteasas (μg proteína degradada/mg proteína total \cdot min)	peroxidasa (unidades catalíticas/mg proteína total)
control	1.52 \pm 0.15a	16.23 \pm 3.51a	447 \pm 57a
TOGE-1	1.11 \pm 0.15ab	15.43 \pm 0.54a	274 \pm 5b
TOGE-2	0.96 \pm 0.25b	8.34 \pm 2.56b	181 \pm 15c

4.2.2.2 Plantas de pimiento

Para estudiar el efecto de los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 sobre los diferentes parámetros bioquímicos se ha utilizado la misma dosis que se había aplicado a los ensayos planta-patógeno.

a) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso

No se ha observado una clara influencia de los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 sobre los parámetros de intercambio gaseoso en plantas de pimiento. Las tasas fotosintética y de la transpiración no se han alterado visiblemente en las plantas tratadas respecto a los controles. No se han observado diferencias significativas en el uso eficiente del agua a lo largo del desarrollo del cultivo. Al final del ciclo vegetativo se ha observado el mismo efecto que causaba el tratamiento con FGA a las plantas. A los 100 días se ha producido un incremento de la tasa de transpiración en plantas tratadas, lo que implica una reducción de los valores del uso eficiente del agua respecto los controles (Tabla 24)

b) Estudio de los mecanismos implicados en la defensa de las plantas**b.i.) Estudio de la ruta fenilpropanoide**

La tabla 25 muestra los resultados de los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 sobre las actividades enzimáticas fenilalanina amonio liasa y chalcona isomerasa. Se puede observar que el tratamiento con TOGE-2 ha incrementado de manera significativa las actividades enzimáticas PAL y CHI. Sin embargo, el tratamiento con TOGE-1 no ha incrementado los valores encontrados en las plantas control para dichas actividades.

Tabla 24. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre el intercambio de CO₂, la tasa fotosintética, la transpiración y el uso eficiente del agua (uea) en plantas de pimiento. Desviaciones no superpuestas indican diferencias significativas con P≤0.05 (test LSD).

tratamiento	tasa fotosintética (μmol·m ⁻² ·s ⁻¹)	tasa transpiración (mol·m ⁻² ·s ⁻¹)	uea (μmol·mol ⁻¹)
dos tratamientos (56 días)			
control	10.8±0.8	3.3±0.4	3.6±0.4
TOGE-1	13.5±1.0	5.0±0.5	2.9±0.4
TOGE-2	22.0±0.4	5.6±0.4	4.1±0.4
cuatro tratamientos (86 días)			
control	12.1±0.7	4.3±0.3	2.9±0.3
TOGE-1	12.2±0.9	5.0±0.5	2.6±0.3
TOGE-2	12.7±1.3	5.3±0.5	2.3±0.2
cinco tratamientos (100 días)			
control	9.5±1.3	4.2±1.2	2.4±0.3
TOGE-1	5.0±1.1	10.4±0.9	0.5±0.1
TOGE-2	4.0±0.4	6.9±1.1	0.8±0.1

La respuesta de las plantas a los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 respecto al contenido de los compuestos antipatogénicos solubles (fenoles libres, ácido clorogénico y flavonoides) ha sido diferente. Mientras que el tratamiento con TOGE-2 ha incrementado el contenido de flavonoides y ácido clorogénico en la fracción de fenoles solubles, siendo diferente significativamente respecto los controles, el tratamiento con TOGE-1 no ha mostrado valores significativamente diferentes (Tabla 25). El contenido de fenoles de pared celular ha incrementado con el tratamiento con TOGE-2,

concretamente el contenido de fenoles libres y agliconas, sin embargo, el tratamiento con TOGE-1 no ha sido efectivo, ya que no se han observado diferencias significativas en ninguno de los componentes fenólicos respecto de los controles (Tabla 25).

Tabla 25. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre las actividades enzimáticas fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona isomerasa (CHI) en plantas de pimiento. Desviaciones no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test SD).

tratamiento	PAL	CHI
	[ácido cinámico] ($\mu\text{M/g}$ peso fresco \cdot h) $\times 10^{-2}$	unidades arbitrarias
control	10.41 \pm 1.16a	4.80 \pm 0.37a
TOGE-1	3.33 \pm 0.36b	4.12 \pm 0.31a
TOGE-2	12.91 \pm 0.16c	10.7 \pm 0.38b

Tabla 26. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre la composición fenólica en plantas pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

fenoles de pared celular (μg fenol / g extracto seco)			
tratamiento	fenoles libres	flavonoides	agliconas libres
control	2.9 \pm 0.1a	236.2 \pm 27.7a	4.5 \pm 0.4a
TOGE-1	1.3 \pm 0.1a	198.8 \pm 30.7a	1.9 \pm 0.5a
TOGE-2	4.9 \pm 0.0b	197.6 \pm 14.1a	14.1 \pm 0.2b
fenoles solubles (μg fenol/ g peso fresco)			
tratamiento	fenoles libres	ácido clorogénico	flavonoides
control	13.0 \pm 1.4a	22.3 \pm 0.1a	265.8 \pm 11.8a
TOGE-1	8.7 \pm 2.3a	19.5 \pm 0.7a	246.4 \pm 21.2a
TOGE-2	10.6 \pm 2.1a	23.0 \pm 3.0a	509.7 \pm 28.4b

c) Estudio de las enzimas implicadas en procesos de senescencia y del contenido de proteína y clorofila

Al final de la experiencia, las plantas tratadas con TOGE-2 han mostrado un incremento significativo del contenido de clorofila respecto los controles. Se ha estimado en las plantas tratadas que el contenido de clorofila ha aumentado un 33% respecto los controles (Tabla 27). Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en las plantas que habían sido tratadas con TOGE-1 respecto de las plantas control (LSD, $P \leq 0.05$).

Respecto al contenido de proteínas se ha observado que existe un incremento en las hojas de las plantas tratadas respecto los controles. Se ha encontrado que éste ha sido del 19% para el tratamiento con TOGE-2 y del 11% para el con TOGE-1 (Tabla 28).

Tabla 27. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre la concentración de clorofila y proteína en plantas de pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD)

tratamiento	[clorofila] (mg/g peso fresco)	[proteínas] total (mg/g peso fresco)
control	0.59±0.02a	2.70±0.13a
TOGE-1	0.62±0.02ab	3.01±0.21ab
TOGE-2	0.79±0.06b	3.21±0.14b

Las actividades de las enzimas clorofilasa y peroxidasa se han reducido a lo largo de la experiencia en las plantas tratadas, ésta reducción ha sido más acusada para la actividad peroxidasa. La actividad peroxidasa se ha reducido un 57% con el tratamiento con TOGE-2 y un 35% con el tratamiento con TOGE-1. Sin embargo, la actividad proteasa no se ha visto afectada significativamente por ningún tratamiento cuando se compara con los controles (Tabla 28).

Tabla 28. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre la actividad de las enzimas clorofilasa, proteasas y peroxidasa en plantas de pimiento. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

tratamiento	clorofilasa (μg clorofila degradada/ g peso seco \cdot min)	proteasas (μg proteína degradada/g proteína total \cdot min)	peroxidasa (unidades catalíticas/ mg proteína total)
control	2.86 \pm 0.04ab	31.8 \pm 2.8a	75 \pm 2a
TOGE-1	3.20 \pm 0.20a	30.1 \pm 9.4a	49 \pm 1b
TOGE-2	2.00 \pm 0.20b	27.6 \pm 4.8a	32 \pm 2c

d) Identificación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto proteico mostró un patrón de bandas diferente en las plantas tratadas respecto a las control. Las plantas control presentan una banda proteica con un peso molecular aproximado de 148 KDa, banda que ha desaparecido en las plantas tratadas con TOGE-1 y TOGE-2 (Fig 11).

En las plantas control aparecen dos bandas de unos 79 KDa. En las plantas tratadas con TOGE-1, dichas bandas prácticamente han desaparecido, mientras que en las plantas tratadas con TOGE-2 se han reducido a una única banda (Fig 11).

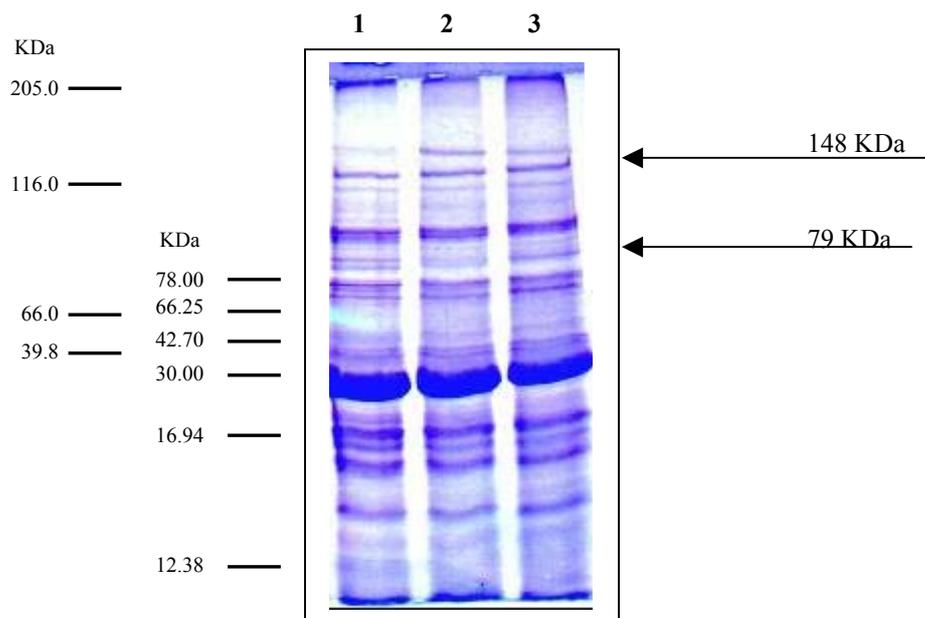


Figura 11. Electroforesis en gel desnaturalizante de proteínas de plantas de pimentero. Carrera 1: plantas control. Carrera 2: plantas tratadas con TOGE-1. Carrera 3: plantas tratadas con TOGE-2. (En el margen se indican los pesos moleculares de los patrones de bandas utilizados).

4.3 Estudio del efecto de la aplicación de los reguladores del desarrollo de plantas sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos

4.3.1 Efecto de la aplicación de los compuestos de la mezcla FGA sobre el desarrollo de hongos

Todos los resultados mostrados anteriormente se han basado en el estudio del efecto directo que los diferentes compuestos testados han desarrollado sobre las plantas y sobre la interacción planta-hongo. Las experiencias siguientes se han realizado para

comprobar el efecto que estos compuestos podían tener directamente sobre el crecimiento *in vitro* de *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora citrophthora*.

4.3.1.1 Estudio del crecimiento en placa

La aplicación del tratamiento con FGA al cultivo de hongos crecidos en PDA ha sido muy efectiva, ya que se han encontrado diferencias significativas en el retraso del desarrollo del micelio de los siguientes hongos: *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora citrophthora* respecto de los controles. Para todos los hongos estudiados el crecimiento se ha inhibido con el tratamiento que corresponde a la concentración más alta (0.5%). El tratamiento con FGA 0.1% ha retrasado el desarrollo de los hongos mostrando diferencias significativas respecto de los controles a lo largo del período que ha durado la experiencia (Fig 12). Los resultados han mostrado que el tratamiento con FGA puede ser específico para los diferentes tipos de hongos. En la figura 12 C se puede observar que el hongo *Phytophthora citrophthora* es más sensible al tratamiento con FGA 0.1% que el resto de hongos estudiados.

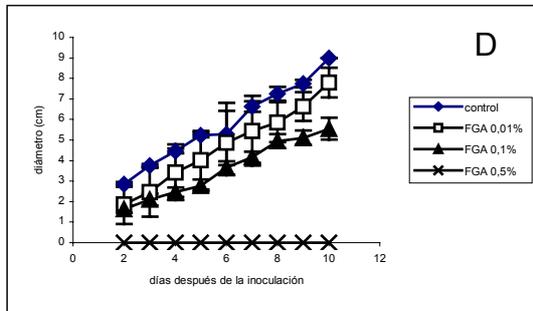
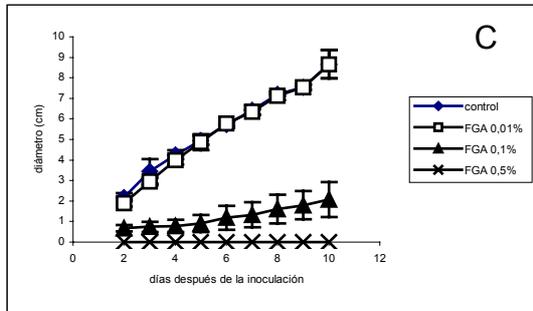
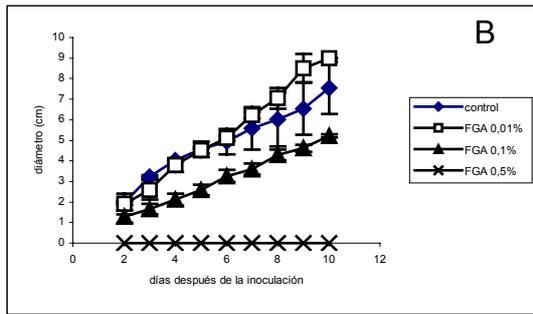
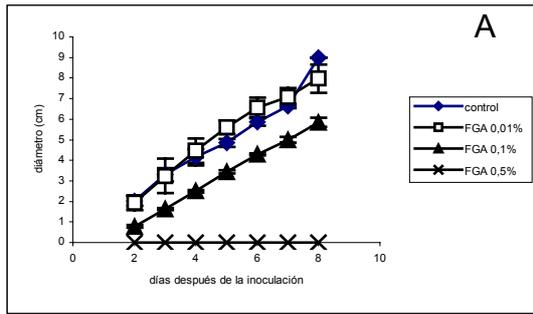


Figura 12. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla FGA sobre el crecimiento radial micelar de hongos fitopatógenos. (A) *Botrytis cinerea*, (B) *Alternaria solani*, (C) *Phytophthora citrophthora* y (D) *Phytophthora capsici*. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

4.3.2 Efecto de la aplicación de los compuestos de las mezclas TOGE-1 y TOGE-2 sobre el desarrollo de hongos

4.3.2.1 Estudio del crecimiento en placa

El efecto del tratamiento con TOGE-1 sobre el desarrollo del crecimiento del hongo ha mostrado resultados similares a los encontrados con el tratamiento con FGA. La dosis más alta de los compuestos de la mezcla TOGE-1 (0.5%) ha inhibido completamente el desarrollo de todos los hongos estudiados (*Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora citrophthora*) (Fig 13). Sin embargo, se ha encontrado una mayor sensibilidad del tratamiento con TOGE-1 (0.1%) para *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* (Fig 13 A y B). Estos resultados han mostrado la especificidad del tratamiento con TOGE-1 respecto a los diferentes tipos de hongos ensayados.

Cuando se ha aplicado el tratamiento con TOGE-2 al medio de cultivo se ha retrasado el desarrollo del micelio del hongo, siendo éste más acusado con el tratamiento 0.5% en todos los hongos analizados (Fig 14). Este tratamiento no ha mostrado un efecto letal sobre el crecimiento del hongo hecho que ha ocurrido con los tratamientos con TOGE-1 y FGA.

Con objeto de determinar el efecto del tratamiento con TOGE-2 (0.5%) sobre la capacidad de germinación de esporas de *Botrytis cinerea*, se ha estimado el porcentaje de germinación de esporas con una cámara cuentaglóbulos. En la figura 15 se observa que el tratamiento con TOGE-2 (0.5%) ha reducido significativamente el porcentaje de germinación de esporas a lo largo del período

estudiado, se han alcanzando valores próximos al 0%, mientras que en los controles el porcentaje de germinación de esporas ha oscilado entre un 20 -50% aproximadamente.

En las fotos 2 y 3 se compara la efectividad del tratamiento con TOGE-2 (0.5%) sobre la morfología del micelio de *Botrytis cinerera*. Se ha observado que el micelio cultivado con TOGE-2 presenta un estado más inmaduro, ha retrasado el porcentaje de germinación de las esporas y también se han observado conidias en pleno desarrollo, mientras que en las placas control el micelio ha presentado un aspecto más envejecido y completamente desarrollado.

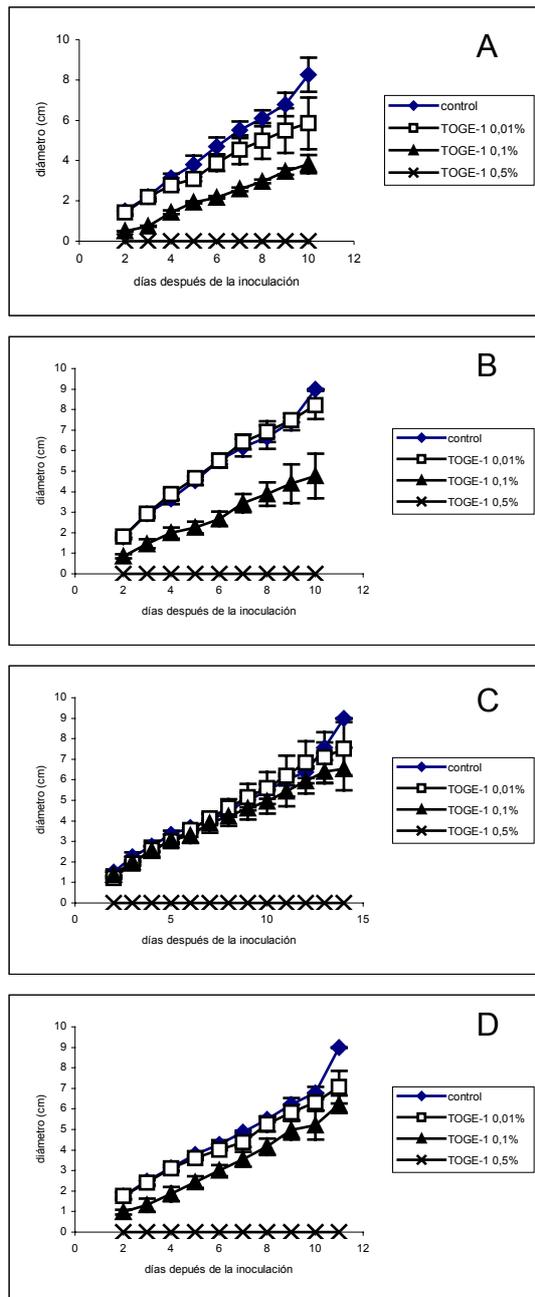


Figura 13. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla TOGE-1 sobre el crecimiento radial micelar de hongos fitopatógenos. (A) *Botrytis cinerea*, (B) *Alternaria solani*, (C) *Phytophthora citrophthora* y (D) *Phytophthora capsici*. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

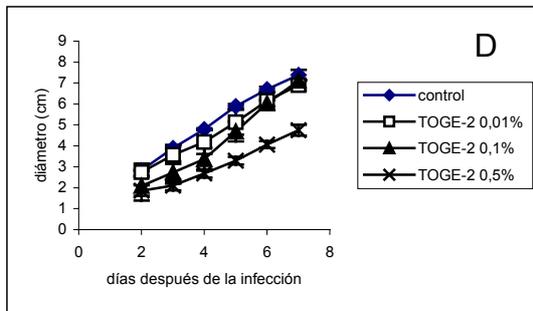
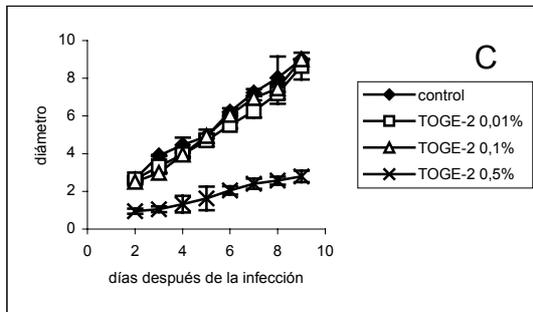
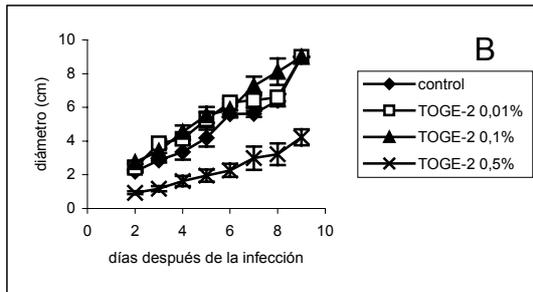
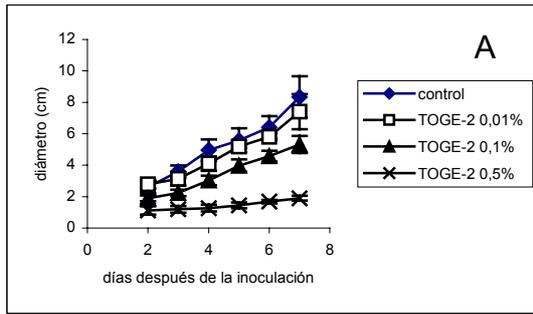


Figura 14. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla TOGE-2 sobre el crecimiento radial micelar de hongos fitopatógenos. (A) *Botrytis cinerea*, (B) *Alternaria solani*, (C) *Phytophthora citrophthora* y (D) *Phytophthora capsici*. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

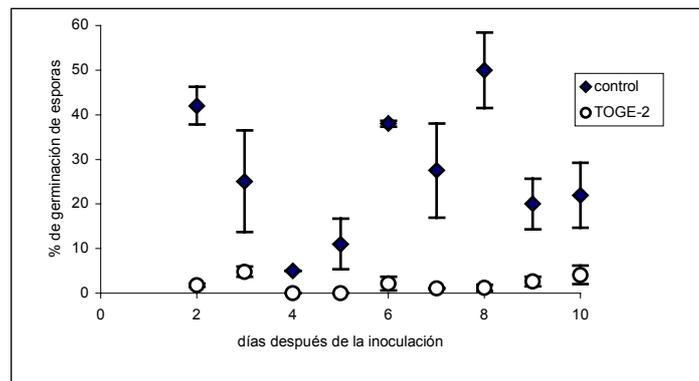


Figura 15. Efecto del tratamiento con los compuestos de la mezcla TOGE-2 (0.5%) sobre la germinación de esporas del hongo *Botrytis cinerea*. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

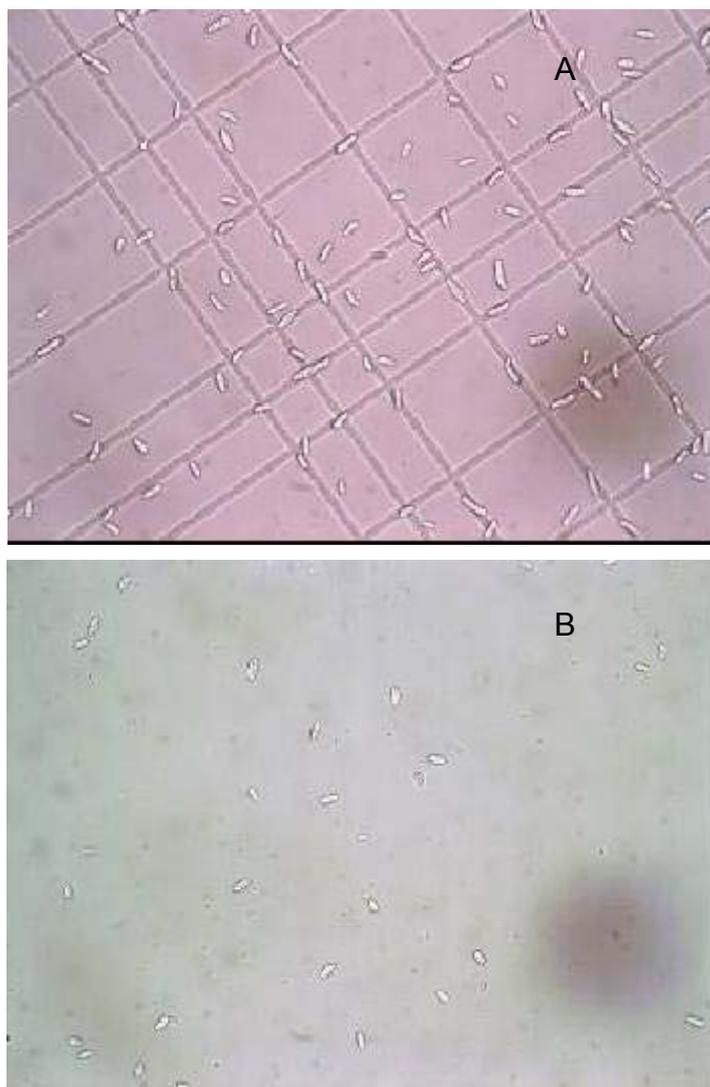


Foto 2. (A) Esporulación observada en las placas control. (B) Esporulación observada en las placas tratadas con TOGE-2 0.5%.

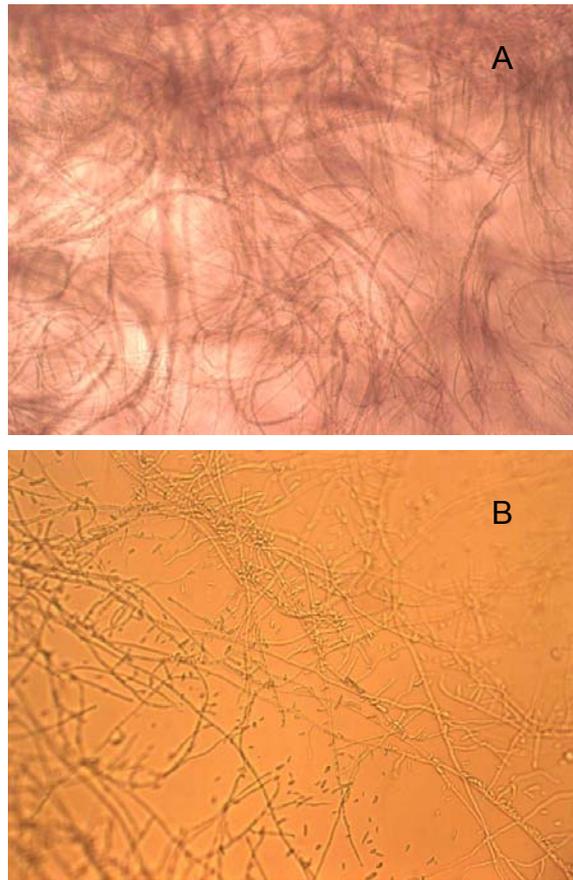


Foto 3. (A) Micelio observado en placas control. (B) Micelio observado en placas tratadas con TOGE-2 0.5%.

4.4 Estudio del efecto de la aplicación de los compuestos separados de la mezcla FGA (éster etílico del ácido adípico, furfurilamina y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa).

Con este estudio se ha caracterizado el efecto aislado de cada uno de los compuestos de la mezcla FGA sobre el desarrollo, la caracterización bioquímica y el crecimiento del hongo.

4.4.1 Efecto sobre el desarrollo

Cuando se ha aplicado a las plantas de manera aislada el éster etílico del ácido adípico se ha encontrado un aumento del contenido de azúcares en frutos de pimiento respecto a los controles. Así mismo se ha encontrado un aumento del número de entrenudos en plantas de tomate. En ambos casos se han encontrado diferencias significativas respecto a los controles (Tabla 29). Otro efecto del tratamiento ha sido reducir el número de frutos de pimiento no comerciales. Para el resto de parámetros estudiados no se han observado diferencias significativas respecto a los controles (LSD, $p \leq 0.05$).

El tratamiento de furfurilamina sobre el desarrollo ha mostrado que este compuesto ha reducido significativamente la floración (LSD, $p \leq 0.05$) (Fig 15). Así mismo ha reducido la altura media de las plantas cuando se han tratado con diferentes dosis de furfurilamina, siendo ésta más marcada con las dosis más altas (Fig 16).

Tabla 29. Efecto de monoéster efílico del ácido adípico (E) sobre el crecimiento y la calidad de fruto en plantas de pimiento (A) y plantas tomate (B).

(A) % incremento respecto a plantas y frutos control

	altura (cm)	peso g/fruto	frutos no comerciales	° brix
%	16.6 ns	12 ns	52 ^{*(1)}	13 *

(B) % % incremento respecto a plantas control

	altura (cm)	diámetro de la base (mm)	diámetro del ápice (mm)	número de entrenudos
%	8 ns	5 ns	5.2 ns	40 *

(1) valores expresados como disminución respecto a las plantas control.

* indica diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

ns indica diferencias no significativas con $P \leq 0.05$ (test LSD).

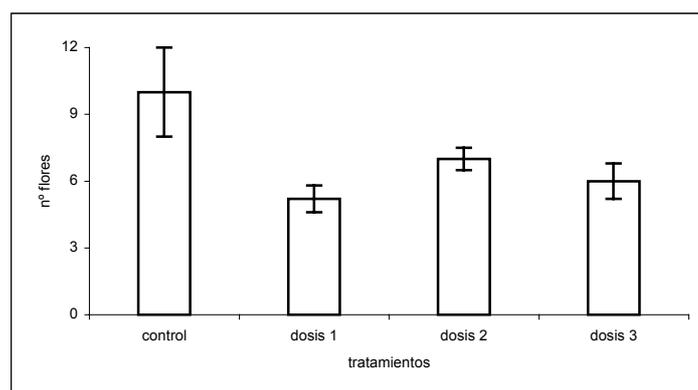


Figura 16. Efecto del tratamiento con furfurylamina sobre la floración en plantas de tomate. Floración determinada en los dos primeros pisos. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

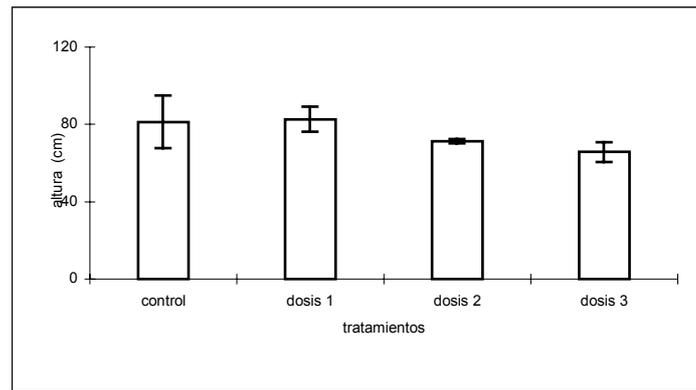


Figura 17. Efecto del tratamiento con furfurilamina sobre la altura de plantas de tomate. (Datos obtenidos a los 60 días después del trasplante). Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

4.4.2 Caracterización bioquímica

a) Estudio de la ruta fenilpropanoide

Los tratamientos con furfurilamina (dosis 1, 2 y 3) han inducido un aumento del 40% de la enzima fenilalanina amonio liasa respecto a las plantas control. No se han observado diferencias significativas entre las diferentes tratamientos de furfurilamina (Tabla 30).

Tabla 30. Efecto del tratamiento con furfurilamina sobre la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

tratamiento	unidades arbitrarias
control	18.72±6.48a
dosis 1	25.20±1.92b
dosis 2	25.20±0.60b
dosis 3	28.80±0.84b

Los diferentes tratamientos con furfurilamina han aumentado la concentración de fenoles libres de la fracción soluble y de la pared celular (dosis 2 y 3). Por el contrario, no se ha observado un incremento del contenido de flavonoides ni de ácido clorogénico en las dos fracciones estudiadas (Tabla 31).

Tabla 31. Efecto de los tratamientos furfurilamina sobre la composición fenólica en plantas de tomate. Letras distintas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

fenoles de pared celular (μg fenol / g extracto seco)			
tratamiento	fenoles libres	ácido clorogénico	flavonoides
control	178 \pm 14a	-	1.3 \pm 0.1a
dosis 1	24 \pm 6b	-	-
dosis 2	204 \pm 12c	-	-
dosis 3	224 \pm 34c	-	-

fenoles solubles (μg fenol / g peso fresco)			
tratamiento	fenoles libres	ácido clorogénico	flavonoides
control	0 \pm 0a	9.4 \pm 0.7a	119.0 \pm 8.0a
dosis 1	2 \pm 0.3b	1.7 \pm 0.03a	20.0 \pm 1.0b
dosis 2	1.4 \pm 0.4c	1.7 \pm 0.08a	24.0 \pm 5.0b
dosis 3	6.9 \pm 0.9d	1.4 \pm 0.04a	54.0 \pm 7.0a

b) Estudio de los parámetros de intercambio gaseoso

A los 56 días después del trasplante, la furfurilamina (dosis 3) ha inducido un incremento de la tasa fotosintética, estimándose en un 39% respecto de las plantas control. Ello ha ido acompañado de una reducción de la tasa de transpiración lo que ha provocado un aumento significativo del uso eficiente del agua. Sin embargo los tratamientos posteriores, del 3º al 5º, junto con el envejecimiento de las hojas, ha provocado la caída de la tasa fotosintética. Al final del ciclo vegetativo la tasa fotosintética de las plantas tratadas con furfurilamina (dosis 1) se ha reducido un 67% respecto de las plantas

control. Paralelamente se han reducido los valores para el uso eficiente del agua desde el tercer y cuarto tratamiento (Tabla 32).

Tabla 32. Efecto del tratamiento con furfuralmina sobre el intercambio de CO₂, la tasa fotosintética, la transpiración y el uso eficiente del agua (uea) en plantas de tomate. Desviaciones no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

tratamiento	tasa fotosintética ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	tasa transpiración ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	uea ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)
dos tratamientos (56 días)			
control	6.8±0.4	2.7±0.0	2.5±0.5
dosis 1	7.5±1.1	2.1±0.1	3.5±1.0
dosis 2	8.1±0.9	2.1±0.2	3.8±0.6
dosis 3	9.5±1.2	2.2±0.3	4.1±0.2
cuatro tratamientos (86 días)			
control	3.3±0.0	4±0.2	0.8±0.1
dosis 1	3.2±0.2	4.4±0.3	0.7±0.2
dosis 2	3±0.3	2.8±0.1	1.0±0.5
dosis 3	1.6±0.2	2.4±0.2	0.7±0.1
cinco tratamientos (100 días)			
control	3.7±0.2	2.6±0.3	1.2±0.5
dosis 1	1.2±0.2	1.4±0.4	0.8±0.1
dosis 2	1.9±0.2	2.4±0.1	0.7±0.1
dosis 3	1.8±0.1	2.1±0.0	0.9±0.2

4.4.3. Efecto sobre el crecimiento de hongos en placa

La adición del análogo de la glucosa 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa a un medio de cultivo de hongos ha reducido el crecimiento radial de todos los hongos analizados. Se han observado diferencias significativas en la reducción del crecimiento de todos los hongos estudiados respecto de los controles cuando se ha aplicado la dosis más alta (0.5%) (Fig 17). La 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa ha inhibido por completo el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* y *Phytophthora citrophthora* durante los primeros 3, 4 y 10 días después del tratamiento (0.5 % para *Alternaria solani* y *Phytophthora citrophthora* y 1% para *Botrytis cinerea*) (Fig 17 A, B y C). El hongo que ha mostrado una mayor sensibilidad al análogo de la glucosa ha sido *Phytophthora citrophthora*, debido a que la dosis 0.1% ha reducido significativamente su crecimiento, hecho que no se ha observado para el resto de hongos ensayados.

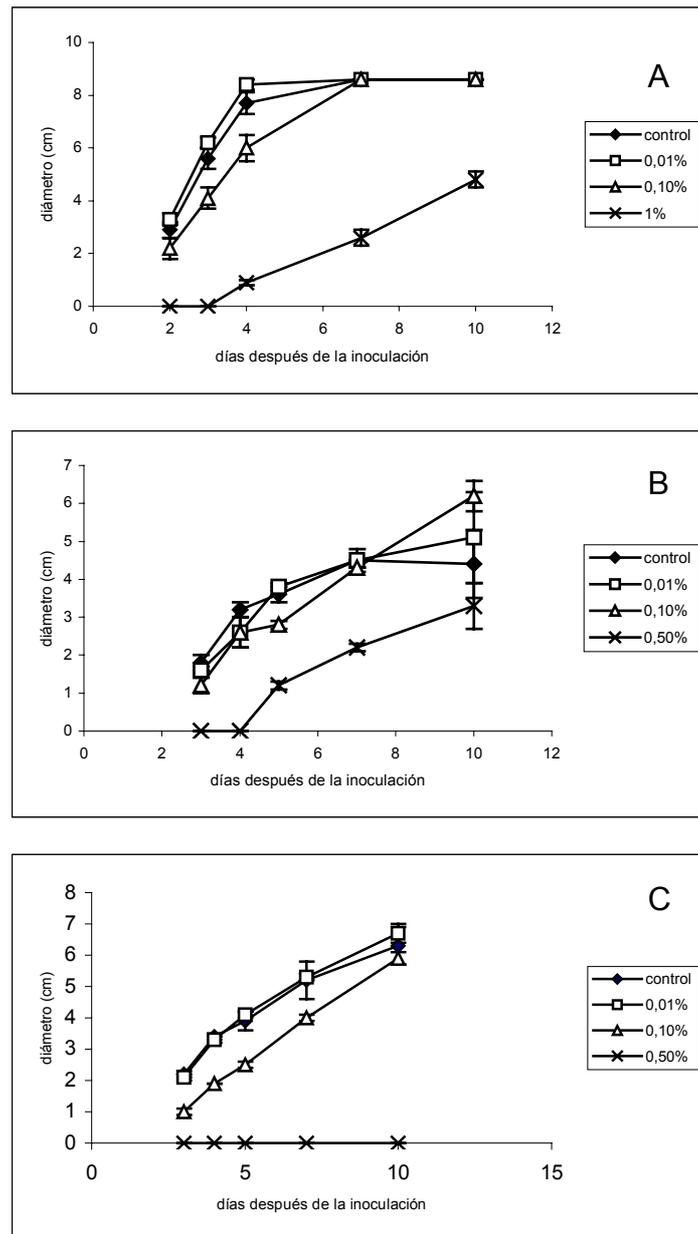


Figura 18. Efecto de la 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa sobre el crecimiento radial micelar de hongos fitopatógenos. (A) *Botrytis cinerea*, (B) *Alternaria solani* y (C) *Phytophthora citrophthora*. Letras diferentes indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

4.5. Estudio comparativo del efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 en plantas de tomate, pimiento y cítricos frente a patógenos

a) Sobre la interacción planta patógeno (planta entera)

Como se puede observar en la figura 19 (A), todos los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 inhiben el crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en plantas de tomate, no se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, si que han existido diferencias significativas respecto de los controles para todos los tratamientos. Todos los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 han retrasado el desarrollo del hongo hasta los 2 días después de la inoculación. Al final de la experiencia no hay diferencias respecto a la longitud de la infección entre los tratamientos (Fig 19 B).

En plantas de pimiento, todos los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 también han reducido el crecimiento de *Phytophthora capsici*, sin embargo éste ha sido menos acusado que en plantas de tomate. No han existido tampoco diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí respecto de los controles. Al principio de la experiencia se ha retrasado el crecimiento del hongo entre un 20 y un 30 % con todos los tratamientos, sin embargo, al final de la experiencia este porcentaje se ha reducido (Fig 20).

En plantas de cítricos se han observado diferencias significativas entre los tratamientos con FGA y TOGE-2 cuando se ha determinado el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Phytophthora citrophthora* respecto de los controles. Sin embargo el

tratamiento con TOGE-1 ha mostrado diferencias significativas respecto a los tratamientos con TOGE-2 y FGA (Fig 21). En la foto 4 se muestra una comparativa entre las plantas control y las plantas tratadas. Se ha observado en general una inhibición notable del crecimiento de la infección en aquellas plantas que habían sido tratadas con todos los tratamientos, FGA, TOGE-1 y TOGE-2 respecto a los controles.

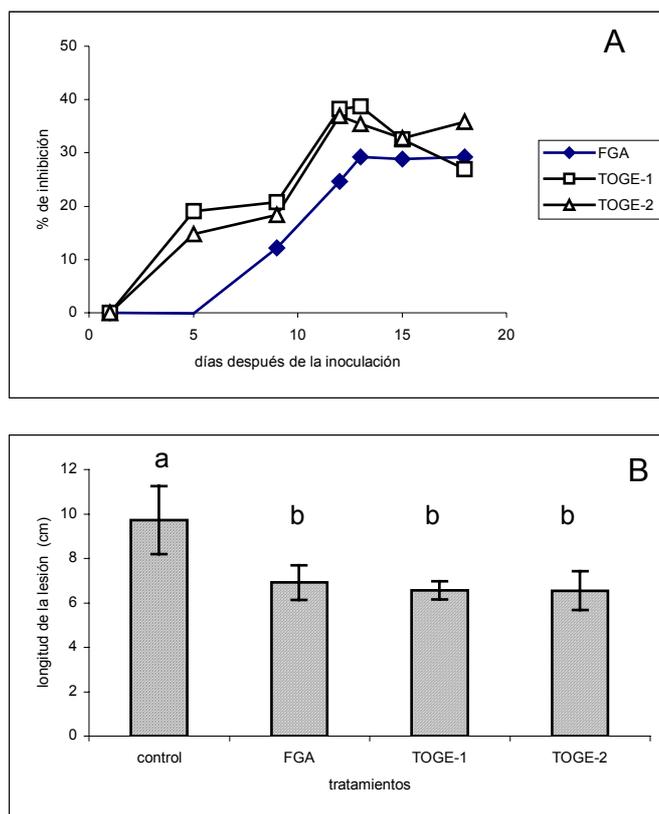


Figura 19. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos inoculados en plantas de tomate. (A) % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Phytophthora citrophthora* a lo largo del tallo respecto de los controles. (B) Longitud de la lesión (cm) a los 15 días después de la inoculación. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

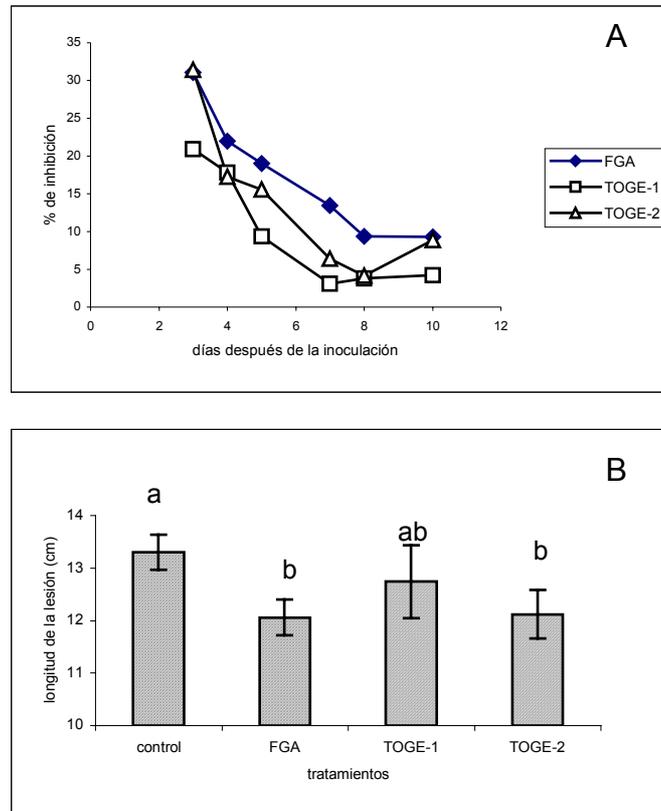


Figura 20. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos inoculados en plantas de pimiento. (A) % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Phytophthora capsici* a lo largo del tallo respecto de los controles. (B) Longitud de la lesión (cm) a los 10 días después de la inoculación. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

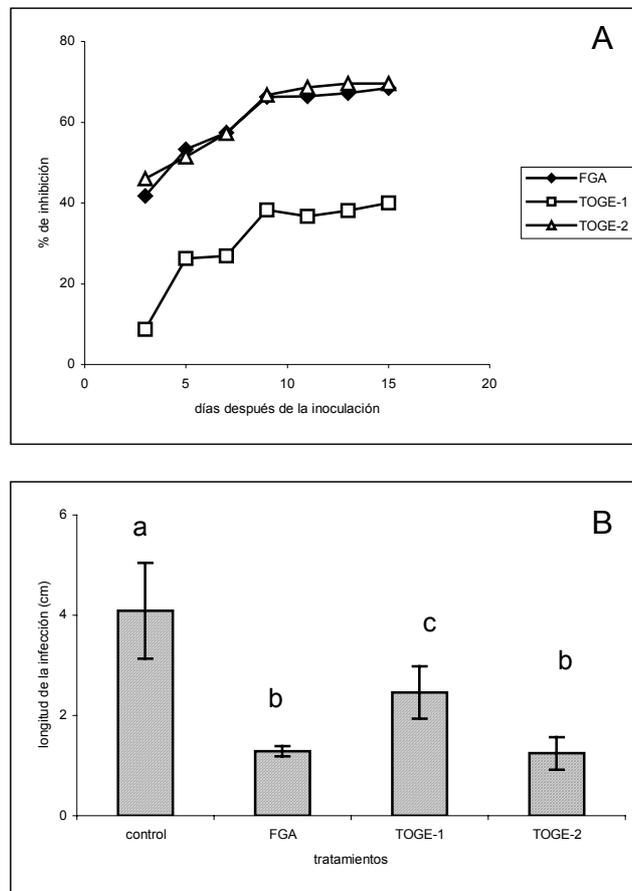


Figura 21. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos en plantas de cítricos. (A) % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Phytophthora citrophthora* a lo largo del tallo respecto de los controles. (B) Longitud de la lesión (cm) a los 15 días después de la inoculación. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

b) Sobre la interacción planta-patógeno (hoja aislada)

A diferencia de lo que ha ocurrido en el estudio de la interacción planta-patógeno en planta entera, en hojas aisladas de pimiento tratadas con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo no ha disminuido con el tiempo, sino que a lo largo de la experiencia se ha mantenido o incrementado (Fig 22 A).

Los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 han reducido el crecimiento del hongo mostrando diferencias significativas respecto a los controles a los 15 días después de la inoculación. Se han observado diferencias significativas entre el tratamiento con FGA y los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2, siendo estos últimos más eficaces en la inhibición del crecimiento de *Alternaria solani* (Fig 22 B).

En hojas aisladas de tomate, los tratamientos con FGA y TOGE-2 no son significativamente diferentes entre sí y se han mostrado más efectivos que el tratamiento con TOGE-1. Todos los tratamientos han inhibido significativamente el crecimiento de *Alternaria solani* respecto a los controles (Fig 23 A y B). La foto 5 muestra el desarrollo de la infección en las hojas al final del experimento, se observa una notable diferencia en el contenido de clorofila en las hojas y un menor diámetro de la infección en las hojas que habían sido tratadas con FGA, TOGE-1 y TOGE-2.

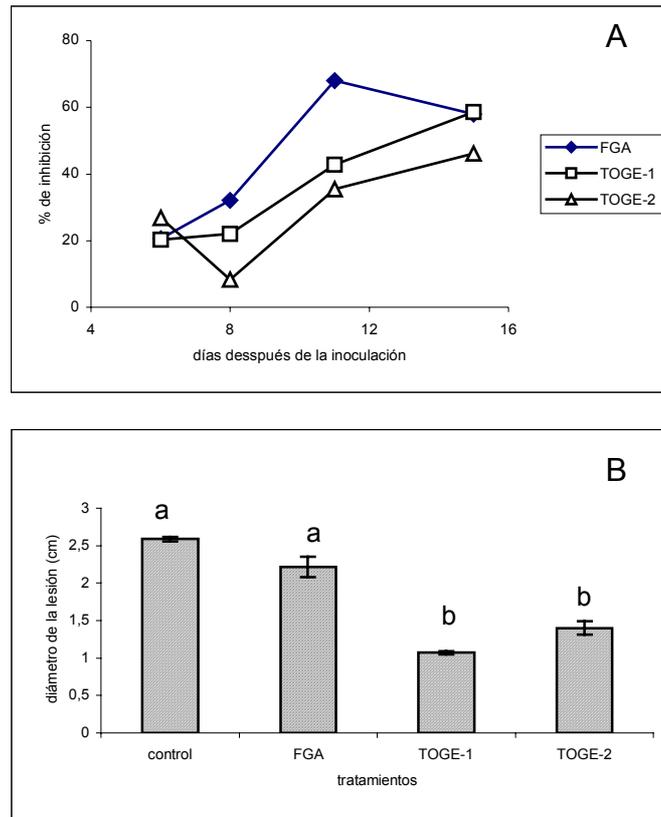


Figura 22. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos en hojas aisladas de pimiento. (A) % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Alternaria solani* respecto a los controles. (B) Diámetro de la lesión (cm) a los 15 días después de la inoculación. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

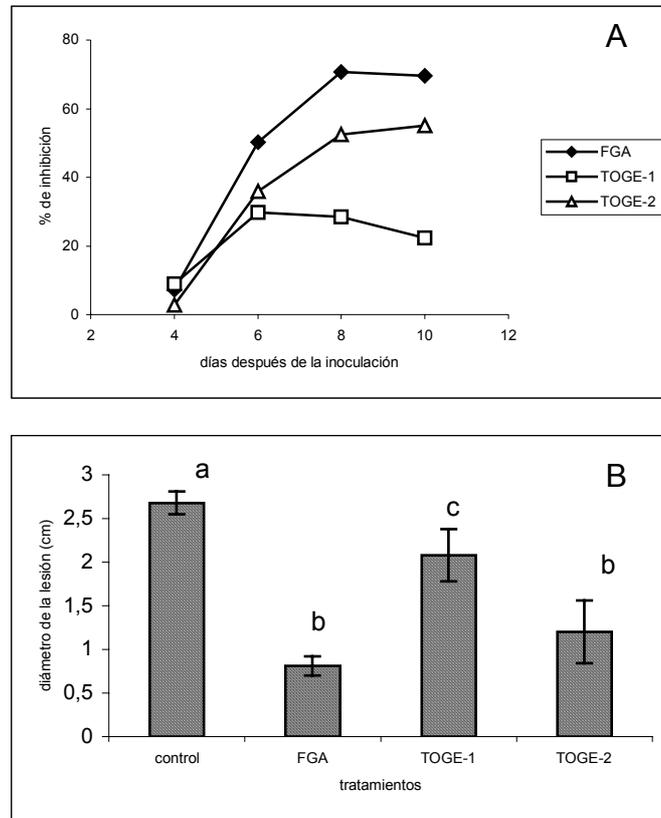


Figura 23. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos en hojas aisladas de tomate. (A) % de inhibición del crecimiento de la infección producida por *Alternaria solani* respecto a los controles. (B) Diámetro de la lesión (cm) a los 10 días después de la inoculación. Desviaciones estándar no superpuestas indican diferencias significativas con $P \leq 0.05$ (Test LSD).

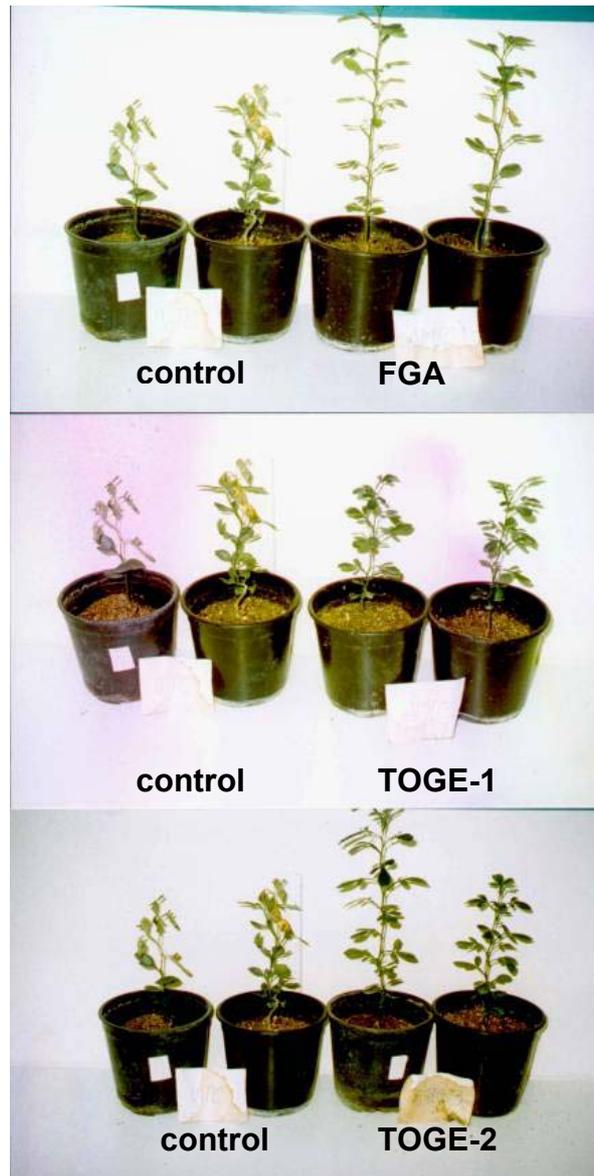


Foto 4. Efecto de los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en plantas de cítricos. (Datos obtenidos a los 15 días después de la inoculación).

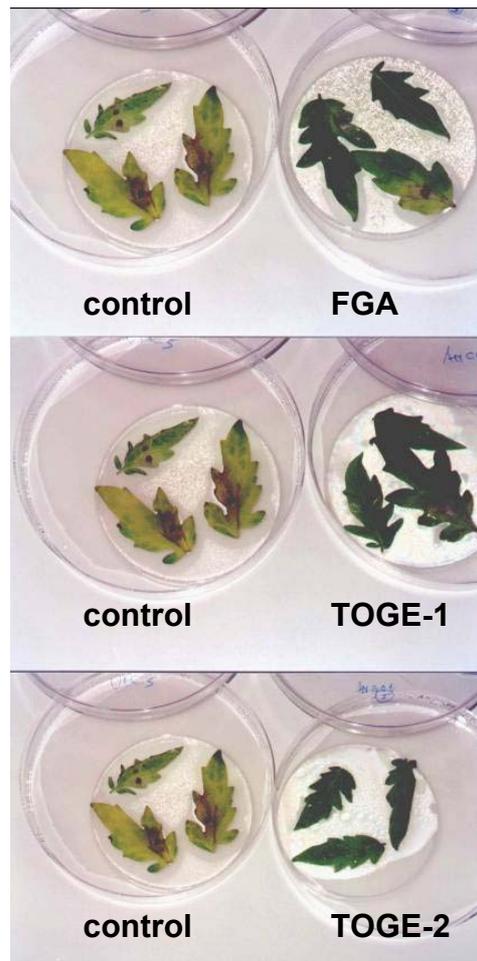


Foto 5. Efecto de los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de *Alternaria solani* en hojas aisladas de tomate. Fotos tomadas 10 días después de la inoculación).

4.6 Estudio comparativo del efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1, TOGE-2 en plantas de tomate y pimiento sobre diferentes actividades enzimáticas y el contenido de proteína y clorofila

En la figura 24 A se puede observar que los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 en plantas de pimiento han incrementado el contenido de proteínas respecto a los controles, siendo este efecto más acusado en plantas de tomate. Este mismo efecto también se ha observado para el contenido de clorofila. El tratamiento con FGA ha sido más acusado en tomate, mientras que en pimiento ha sido el tratamiento con TOGE-2 el que ha resultado ser significativamente diferente respecto a los otros tratamientos (Fig 23 B). En cuanto a las actividades enzimáticas PAL y CHI se ha observado que los tratamientos con FGA y TOGE-2 han incrementado ambas actividades en ambos cultivos: Sin embargo, el tratamiento con TOGE-1 solamente ha sido efectivo en plantas de tomate (Fig 24 C y D).

De este estudio se puede concluir que, en ambos cultivos, los tratamientos con FGA y TOGE-2, en general, han incrementado el contenido de clorofila y proteínas y de las actividades enzimáticas CHI y PAL, a excepción de los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2 en ambos cultivos respecto a la actividad PAL.

En la figura 25 (A) se puede observar que los tratamientos con FGA y TOGE-2 inhiben la actividad clorofilasa en pimiento y tomate, mientras que el tratamiento con TOGE-1 sólo la ha reducido en tomate.

La actividad proteasa (Fig 25 B) se ha reducido ligeramente con los tratamientos con los principios activos de las mezclas FGA y TOGE-1, sin embargo, con el tratamiento con TOGE-2 se ha inhibido más del 40% en tomate. No se han obtenido resultados muy claros para la actividad proteasa en pimiento. Se observa que mientras el tratamiento con FGA no ha reducido la actividad proteasa, los otros dos tratamientos la han inhibido, siendo el efecto más acusado con el tratamiento con TOGE-1.

Por otro lado, todos los tratamientos, FGA, TOGE-1 y TOGE-2 han reducido la actividad peroxidasa en plantas de tomate, siendo el tratamiento con TOGE-1 el más efectivo. Resultados similares han sido encontrados en plantas de pimiento, aunque en este cultivo no se han observado diferencias significativas entre los tratamientos con FGA y TOGE-1 (Fig 25 C).

De este estudio comparativo se puede concluir que el efecto de todos los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre las actividades enzimáticas estudiadas no tiene un comportamiento estrictamente similar para ambos cultivos, sin embargo, sí que se han obtenido resultados comparables en ambos cultivos para el tratamiento con FGA cuando se estudia el efecto del mismo sobre las actividades peroxidasa, clorofilasa y proteasa.

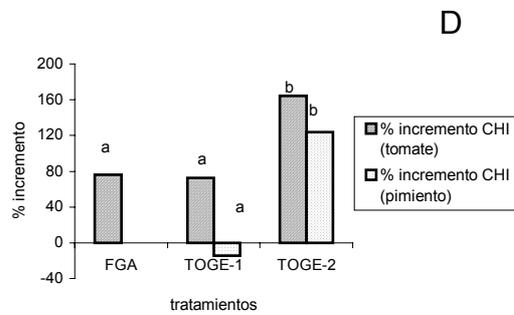
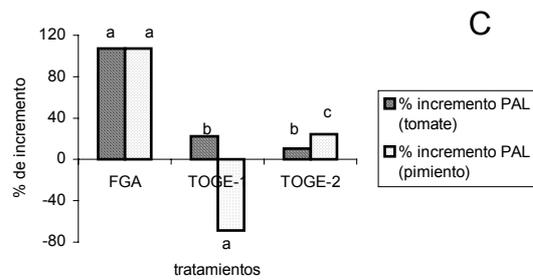
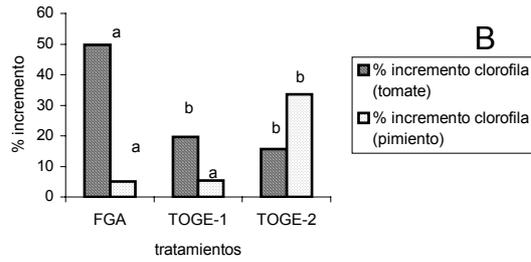
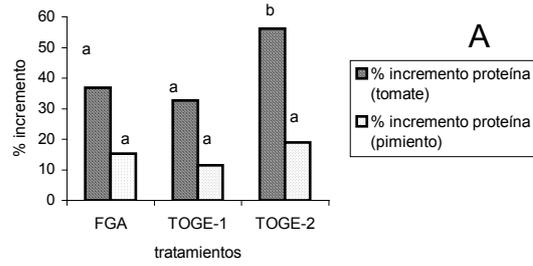


Figura 24. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 en plantas de pimiento y tomate. % de incremento de respecto los controles (A) proteína (B) clorofila. (C) actividad enzimática PAL (D) actividad enzimática CHI.

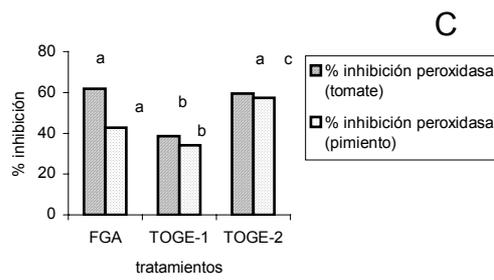
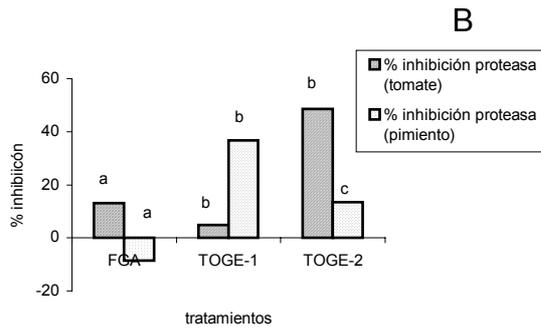
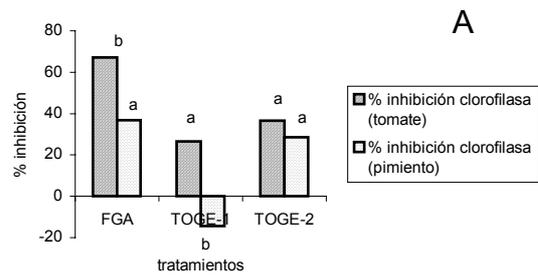


Figura 25. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 en plantas de pimiento y tomate. % de inhibición respecto de los controles. (A) clorofilasa (B) proteasas (C) peroxidasa.

4.7 Estudio comparativo del efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el desarrollo de hongos fitopatógenos cultivados *in vitro*

Las tablas 33, 34, 35 y 36 muestran el efecto de los diferentes tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento de los hongos estudiados. Se puede observar que la dosis 0.5% de los compuestos de las mezclas FGA y TOGE-1 ha inhibido por completo el crecimiento radial de todos los hongos ensayados. El tratamiento con TOGE-2 (0.5%) ha reducido también el desarrollo de los distintos hongos entre un 35 y un 85% respecto de los controles cuando se comparan los diferentes hongos.

Tabla 33. Efecto de los tratamientos con los compuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento radial de *Botrytis cinerea*. Datos expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento respecto de hongos control.

%	FGA	TOGE-1	TOGE-2
0.01	4.9	30.7	0
0.1	19.2	47.9	8.7
0.5	100	100	35.3

Tabla 34. Efecto de los tratamientos con los copuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento radial de *Alternaria solani*. Datos expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento respecto de los hongos control.

%	FGA	TOGE-1	TOGE-2
0.01	31.3	5.5	14.7
0.1	44.9	41.0	33.6
0.5	100	100	85.4

Tabla 35. Efecto de los tratamientos con los copuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento radial de *Phytophthora citrophthora*. Datos expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento respecto de los hongos control.

%	FGA	TOGE-1	TOGE-2
0.01	0	3.2	0
0.1	76	21.1	8.03
0.5	100	100	48.9

Tabla 36. Efecto de los tratamientos con los copuestos de las mezclas FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre el crecimiento radial de *Phytophthora capsici*. Datos expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento respecto de los hongos control.

%	FGA	TOGE-1	TOGE-2
0.01	2.5	21	0
0.1	40	24	0
0.5	100	100	67

5. DISCUSIÓN

Los resultados presentados sugieren que los compuestos estudiados, FGA, TOGE-1 y TOGE-2, producen efectos similares a los observados con derivados del ácido adípico, aminas y hexosas (Todorov et al, 1992; Muñoz, 1994; El Gaouth et al, 1995; Todorov y Karanov, 1995; Muñoz, 1997). Se ha comprobado que favorecen el desarrollo de algunas especies vegetales, como tomate y pimiento, induciendo al mismo tiempo diversos mecanismos de defensa frente a patógenos. Así mismo, se ha comprobado que ejercen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de algunos hongos fitopatógenos.

A la vista de los resultados obtenidos inicialmente con la mezcla FGA, se planteó sintetizar un compuesto que englobase sus principios activos, de manera que favoreciera la absorción de los mismos, y que pudiera facilitar o incluso potenciar, sus efectos individuales. Para ello se abordó inicialmente la síntesis de un éster, a partir de los compuestos de la mezcla, adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa.

El adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa (TOGE) pierde la capacidad de desprotonarse a pH fisiológico, por tanto se reduce el grado de ionización, haciéndolo más permeable a las membranas celulares. Así mismo, se ha descrito que la efectividad de los ácidos mono y dicarboxílicos depende del pH (Dijan et al, 1994), sin embargo la efectividad de los tratamientos con TOGE sería independiente del mismo.

Se estudiaron también otras mezclas que contenían adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa (TOGE) y furfuralmina, componente a su vez de la mezcla FGA y se le

denominó TOGE-1. También se añadió al compuesto TOGE la poliamina 1,3-diaminopropano, compuesto del que se conocen efectos beneficiosos sobre el desarrollo de plantas y se le denominó TOGE-2.

PROMOCIÓN DEL DESARROLLO VEGETAL

La aplicación exógena de FGA, TOGE-1 y TOGE-2 produce diversos efectos sobre el desarrollo de plantas de tomate y pimiento. En ambos casos disminuye la relación raíz/parte aérea (RSR). En plantas de tomate, aumenta el peso fresco y seco de las hojas, así como el peso seco de raíz, y el número de entrenudos, produciendo un aumento de la biomasa vegetal, aunque no se observa un aumento significativo de la altura media de la planta. Estos resultados coinciden con datos previos obtenidos en maíz, donde se ha descrito que los ésteres etílicos de los ácidos succínico y adípico incrementan el peso seco y fresco de hoja. (Todorov et al, 1992; Todorov y Karanov, 1995).

Los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 producen un efecto muy similar en plantas de pimiento, observándose un aumento del número de entrenudos y de la biomasa, sin afectar la altura de las plantas. Así mismo, uno de los tratamientos con FGA (dosis 1) incrementa el número de frutos y flores.

Resultados previos han mostrado que la aplicación foliar de ésteres de ácidos carboxílicos mejoran el transporte y absorción de nutrientes, aumentando la translocación, la asimilación y el almacenamiento del P, N y K (Novoa y Loomins, 1981; Guo et al, 1993;

Muñoz, 1994; Todorov y Karanov, 1995). Estos resultados sugieren que el éster del ácido adípico en solución acuosa, o esterificado con glucosa, es el responsable del aumento de la biomasa, así como del incremento del número de entrenudos observado tras la aplicación de FGA, TOGE-1 y TOGE-2 a los cultivos de tomate y pimiento.

Por otra parte existe controversia respecto al papel que juegan los ésteres etílicos de ácidos dicarboxílicos en diferentes especies vegetales, ya que en guisante se ha descrito que reducen el crecimiento (Alexieva y Karanov, 1987 a y b), y sin embargo en maíz se ha observado que lo incrementan (Todorov y Karanov, 1995). Los efectos observados al tratar con FGA, TOGE-1 y TOGE-2, donde incrementa el número de entrenudos, sin afectar a la altura de las plantas, apoyaría la idea de que el efecto de los ácidos dicarboxílicos y sus derivados, sobre el desarrollo de las plantas, es específico tanto de la estructura química del ácido, como del cultivo.

Los tratamientos realizados con FGA, TOGE-1 y TOGE-2, en tomate aumentan el contenido de clorofila, inhibiendo la actividad clorofilasa. En pimiento se observa el mismo efecto, con la excepción del tratamiento con TOGE-1. Estos resultados confirman datos previos, en los que se muestra que los retardantes (ácidos carboxílicos y derivados) tienen capacidad de inhibir la destrucción de la clorofila durante el envejecimiento de la planta (Alexieva y Karanov, 1987 a y b). Este efecto se produce mediante procesos de inhibición de la actividad clorofilasa, mediante el incremento de la síntesis de clorofila o mediante ambos mecanismos (Alexieva, y Karanov 1987 a y b; Todorov et al, 1992).

Adicionalmente, es conocido que las poliaminas, espermidina, espermina y putresceína aplicadas foliarmente, mantienen la estabilidad de la membrana tiolacoidal y, en consecuencia, reducen la pérdida de clorofila bajo ciertas condiciones de luz (Cohen et al, 1979).

Estas evidencias sugieren que el éster etílico del ácido adípico del FGA, el adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa (TOGE), la furfúrilamina de FGA y TOGE-1 y la 1,3-diaminopropano de TOGE-2, podrían ser los responsables del retraso de la degradación de la clorofila y pueden mantener la concentración foliar de la misma a través de los mecanismo descritos anteriormente.

Los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 incrementan en ambos cultivos la concentración de proteína, debido posiblemente a la inhibición observada en la actividad de las proteasas, a excepción del tratamiento con FGA en pimiento.

También habría que destacar que los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 reducen la actividad peroxidasa en ambos cultivos. La hipótesis propuesta para explicar la disminución de la actividad peroxidasa en plantas tratadas es suponer que puesto que los tratamientos inducen un aumento en el contenido de flavonoides y agliconas, y como estos son capaces de detoxificar los radicales de peróxido y superóxido por una vía no enzimática, reducirían la concentración del sustrato de las reacciones catalizadas por la peroxidasa (Foyer et al 1993; Lacan y Baccou, 1998; Ortuño et al, 1997).

La disminución de las actividades peroxidasa, proteasa y clorofilasa, y el incremento del contenido en proteína y clorofila, ponen de manifiesto el retraso de la senescencia producido por los

tratamientos realizados. Este efecto se podría atribuir a los ácidos carboxílicos y a las aminas presentes en los compuestos utilizados, ya que se ha propuesto para ellos un papel antisenescente (Shih et al, 1982; Todorov et al, 1992; Alexieva, 1994).

También se dispone de datos (Todorov et al., 1992) que han demostrado una correlación entre la tasa fotosintética, el contenido foliar de clorofila y la actividad clorofilasa. El mantenimiento de la fotosíntesis observado tras la aplicación de todos los tratamientos en ambos cultivos, se correlaciona con un incremento en el contenido de clorofila, y con el retraso de la senescencia o envejecimiento de los mismos. Otros autores han atribuido este papel a los ácidos carboxílicos (Todorov et al., 1992), lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados.

El incremento observado en la tasa fotosintética cuando se aplica FGA en plantas de pimiento y tomate, va acompañado por una disminución en la tasa de transpiración. Sin embargo, la aplicación de TOGE-1 y TOGE-2 no produce este efecto. Por lo tanto, los principios activos contenidos en la mezcla FGA podrían ejercer un efecto antitranspirante en las plantas de tomate y pimiento. Algunos estudios previos han asignado dicho efecto a los ácidos adípico, itacónico, succínico (Todorov et al, 1992) y trihidroxiglutarico (Muñoz, 1994), cuando se han aplicado foliarmente en cultivos de maíz y algodón, respectivamente.

Las diferencias encontradas entre los tratamientos realizados con FGA, TOGE-1 y TOGE-2, respecto al efecto antitranspirante, podrían deberse a la pérdida del grupo carboxilo libre en los tratamientos con TOGE-1 y TOGE-2. Así mismo, a la vista de los

resultados obtenidos, se podría afirmar que el cambio de las aminas en estos compuestos no afecta la tasa de transpiración.

De los resultados discutidos anteriormente se puede concluir que FGA, TOGE-1 y TOGE-2 son mezclas de compuestos con acción bioestimulante, que actúan como reguladores sintéticos del desarrollo, lográndose así uno de los objetivos planteados en este trabajo.

INDUCCIÓN DE LAS DEFENSAS NATURALES DE LA PLANTA

La ruta del ácido siquímico, es una de las vías de síntesis de flavonoides, y constituye el principal sistema de defensa de las plantas frente a patógenos (Hahlbrock et al, 1970; Hahlbrock y Grisebach, 1979; Dixon et al, 1983; Hahlbrock and Scheel, 1989).

Los tratamientos con FGA y TOGE-2 incrementan las actividades PAL y, CHI, así como el contenido en flavonoides y en ácido clorogénico, en la fracción fenólica soluble de ambas especies vegetales. Estos resultados confirman que los tratamientos con FGA y TOGE-2 estimulan los principales mecanismos de defensa de la planta, activando las principales enzimas que en ellas intervienen. Muñoz (1994) demostró que los ácidos polihidroxicarboxílicos pueden alterar la ruta del ácido siquímico en algodón, e inducir un aumento de la síntesis de lignina y de la fitoalexina gossipol.

Los resultados obtenidos indican que cuando se aplica furfuralamina individualmente a plantas de tomate se estimula la enzima PAL, y se produce un incremento en la concentración foliar

de fenoles libres, pero no de flavonoides, ni de ácido clorogénico. Sin embargo, FGA y TOGE-2 aumentan tanto la actividad de la enzima PAL, como la concentración foliar de ácido clorogénico y de flavonoides. Este hecho confirma que no se produce un efecto antagónico entre los componentes del FGA y TOGE-2, aunque deja abierta la posibilidad de que exista cierto antagonismo entre el compuesto TOGE y la furfuralamina (TOGE-1), ya que este último no actúa de forma similar en la ruta del ácido siquímico.

Otro mecanismo de protección frente a agentes dañinos externos lo constituyen las barreras físicas, como la pared celular (Scholes, 1992). Por lo tanto, el aumento de los azúcares de la pared celular, especialmente ácidos urónicos, encontrado en ambos cultivos tras la aplicación de FGA puede contribuir a mejorar las defensas mecánicas de las plantas frente al ataque de ciertos patógenos.

Para verificar que los efectos observados tras los tratamientos confieren resistencia frente al ataque de patógenos, se llevaron a cabo diversos ensayos en los que se estudió la interacción planta-hongo. Los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 reducen el avance de las lesiones producidas por *Phytophthora citrophthora* en plantas de tomate, *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento, y *Alternaria solani* en hojas aisladas de tomate y pimiento. Los resultados indican que las plantas de tomate responden mejor a los tratamientos, siendo FGA y TOGE-2 los más efectivos en retrasar el avance de las infecciones, posiblemente porque producen una mayor activación de las enzimas de la ruta del ácido siquímico que TOGE-1.

En relación con estos resultados existen trabajos que han demostrado que es posible inducir la ruta del ácido siquímico mediante aplicaciones exógenas de diferentes compuestos químicos. En *Tangelo nova* ha sido posible inducir resistencias específicas mediante el incremento de la concentración de escoparona (fitoalexina de origen cumárico) (Ortuño et al., 1997). Resultados similares se han obtenido aplicando el Fosetyl-AI y el ácido fosforoso en otras variedades de cítricos, induciendo resistencia a *Phytophthora citrophthora* por acumulación de escoparona (Afek y Szetejnberg, 1988).

Los resultados obtenidos permiten comprobar que los compuestos utilizados inducen los mecanismos de defensa en las plantas, preparándolas frente al ataque de hongos patógenos, alcanzando así otro de los objetivos planteados en este trabajo. Además, los resultados obtenidos con plántulas de cítricos, confirman que los efectos observados no son específicos para plantas de tomate y pimiento, y por tanto los tratamientos podrían aplicarse a una gran variedad de cultivos.

A partir de los resultados obtenidos se puede plantear el posible mecanismo de acción de FGA, TOGE-1 y TOGE-2 en la inducción de las defensas de la planta. Por una parte se produce un aumento de la concentración foliar de clorofila y una estimulación de la fotosíntesis durante la fase vegetativa de la planta, lo que podría promover la síntesis de compuestos C₃, y en definitiva de azúcares que podrían depositarse en la pared celular formando pectinas (aumento de ácidos urónicos determinado experimentalmente). Esto produciría el aumento de las defensas estructurales o mecánicas de la pared celular de la planta.

Por otro lado el aumento de la actividad fotosintética podría generar un incremento de poder reductor, que la planta podría emplear en rutas biosintéticas de compuestos como las fitoalexinas terpénicas. El aumento de poder reductor puede repercutir en un incremento en los precursores de la ruta del ácido siquímico (eritrosa-4-P), tal como se comprobó previamente en cultivo de algodón tratado con el éster etílico del ácido adípico (Muñoz, 1994).

La estimulación de las enzimas PAL y CHI promueve la síntesis de compuestos antimicrobianos de origen fenólico, y por tanto puede activar las defensas activas de las plantas previamente al ataque de cualquier agente patógeno.

La inducción de las defensas mecánicas de las células vegetales (pectinas de pared celular), junto con el aumento de las defensas activas (fitoalexinas fenólicas y tal vez terpénicas), podría preparar a la planta y disminuir los daños producidos por algunos hongos fitopatógenos.

INHIBICIÓN DEL DESARROLLO DE HONGOS FITOPATÓGENOS

A la vista de que los tratamientos utilizados producían un retraso en la infección de hongos patógenos en planta, se estudió la posible actividad fungitóxicas de FGA, TOGE-1 y TOGE-2 sobre *Alternaria solani*, *Phytophthora citrophthora*, *Botrytis cinerea* y *Phytophthora capsici*.

Los resultados obtenidos indican que FGA y TOGE-1 inhiben el crecimiento *in vitro* de los hongos ensayados, siendo la dosis más

efectiva la de 0.5% (p/v). El compuesto TOGE-2 retrasa, pero no inhibe por completo el desarrollo de los hongos.

Algunos autores han encontrado que determinadas hexosas y sus derivados, como la desoxi-glucosa y desoxi-manosa, pueden reducir la incidencia de podredumbres de frutos en post-cosecha (Janisiewicz et al, 1992; El Gaouth et al, 1995; Salzman et al, 1998).

El mecanismo propuesto para explicar este efecto se basa en que se conoce que los azúcares modificados inhiben la síntesis de ATP, mediante el bloqueo de la glucólisis (El Gaouth et al., 1995). Los análogos de glucosa podrían ser susceptibles de entrar en la ruta de la glucólisis y ser fosforilados en el carbono 6 por la enzima hexoquinasa, aunque no por la glucosafosforilasa (son específicas del sustrato glucopiranososa).

Si la hexoquinasa es capaz de fosforilar la glucosa acetilada, el siguiente paso metabólico de la glucólisis quedaría inhibido por la imposibilidad de abrir el anillo piranósico necesario para formar la cetona, y por tanto se inhibiría la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa. En el caso de que se produzca un efecto similar cuando se aplica el compuesto TOGE, éste debería ser sustrato para la HK, pero en esta ocasión se bloquearía la enzima debido a que ésta no dispondría del carbono 6 libre para formar el éster de fosfato. En ambos casos la consecuencia sería la inhibición de la formación de ATP en la célula del hongo, lo cual produciría la muerte del mismo, o atenuaría en gran medida su crecimiento.

Por otra parte, los ésteres de ácidos orgánicos alifáticos como el ácido fórmico, el ácido acético, el ácido adípico o el ácido láctico, poseen propiedades nematocidas (Djian et al, 1994).

Otros estudios han mostrado que la aplicación de algunas poliaminas sintéticas como la (E)-1,4-diaminobut-2-eno provocan una excesiva acumulación intracelular de putresceína, que inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos (Havis et al., 1994). En trabajos posteriores se ha encontrado que las poliaminas cíclicas afectan al desarrollo de *Erisiphe graminis* (Havis y Walters, 1997). La mayoría de hongos fitopatógenos tienen como única vía de síntesis de poliaminas la descarboxilación de la arginina, conocida como ruta de la arginina descarboxilasa (ADC) (Slocum y Galston, 1987). La alteración del funcionamiento normal de esta ruta biosintética en hongos, es la base para la inhibición del crecimiento mediante la aplicación de poliaminas exógenas.

Los resultados obtenidos indican que FGA y TOGE-1 son más efectivos inhibiendo el crecimiento *in vitro* de los distintos hongos ensayados que TOGE-2. Estos resultados sugieren que posiblemente las aminas jueguen un papel importante en la inhibición del crecimiento de los hongos ensayados, siendo la furfurilamina más efectiva que la 1,3-diaminopropano.

Por otra parte El Gaouth et al. (1995) demostraron que la 2-desoxi-D-glucosa (DOG) modifica la morfología de *Botrytis cinerea* y reduce su capacidad de esporulación. Ésta es la causa por la que el compuesto DOG inhibe el crecimiento *in vitro* del hongo, y también en frutos inoculados con esporas de *Botrytis cinerea*. La aplicación de TOGE-2 (0.5% p/v) en cultivos *in vitro* de *Botrytis cinerea* reduce significativamente su capacidad de esporulación, y retrasa la formación de conidios. Este efecto posiblemente contribuye a la inhibición del crecimiento *in vitro* de los hongos ensayados, cuando crecen en un medio con FGA, TOGE-1 y TOGE-2.

Todos los resultados obtenidos han permitido comprobar que los tratamientos realizados tienen un efecto fungicida, lográndose así otro de los objetivos planteados en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos tras la aplicación de los distintos tratamientos a los diferentes hongos ensayados, abren la posibilidad en un futuro de realizar baños en frutos, siendo una alternativa a los fungicidas en post-cosecha. El uso de estos compuestos podría ser compatible con el desarrollo de nuevas técnicas de lucha biológica en post-recolección. Los compuestos podrían actuar de modo sinérgico con organismos antagonistas de hongos aplicados tras la recolección de los frutos.

De todos los resultados obtenidos se puede concluir que los tratamientos con FGA y TOGE-2, y en menor medida con TOGE-1, pueden actuar como bioestimulantes o reguladores del crecimiento, induciendo las defensas naturales de las plantas frente a patógenos previamente al ataque de los mismos. Así mismo, se ha comprobado que actúan directamente sobre los hongos patógenos, mostrando actividad fungicida.

El desarrollo de estos nuevos bioestimulantes, o reguladores del desarrollo, podría reducir el uso de fitohormonas, disminuyendo así el efecto negativo (desórdenes fisiológicos) que muchas de ellas ejercen sobre las plantas (Alexieva, 1994).

Los estudios realizados hasta el momento en planta, indican que no existen diferencias significativas entre el tratamiento realizado con la mezcla FGA y con la molécula TOGE (adipato de etilo y 1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa), sintetizada con el objeto de englobar dos de los principios activos de dicha mezcla. Sin embargo, no se puede descartar que en estudios futuros pueda presentar

alguna ventaja frente a la mezcla, por ejemplo en situaciones de estrés abiótico, en las que se pueda alterar la absorción de alguno de los componentes individuales. Así mismo, no se puede descartar que la molécula sintetizada presente ventajas frente a la mezcla, si los tratamientos propuestos se aplican a otros cultivos, o se utilizan en post-cosecha. Otra alternativa sería sintetizar el compuesto adipato de etilo y 1-fufurilamin-2,3,4,tri-O-acetil-D-glucopiranososa, para poder mejorar el efecto de los compuestos empleados en las distintas mezclas. Este compuesto podría ser más versátil para suelos con diferentes tipo de pH.

La investigación realizada abre un campo muy interesante en el estudio de nuevos reguladores del crecimiento sintéticos, que además puedan incrementar las defensas de las plantas frente a otros tipos de estreses bióticos o abióticos.

A pesar de que se han desarrollado diferentes procedimientos para la determinación prematura de enfermedades fúngicas en cultivos, estas técnicas no están al alcance de la mayoría de los agricultores (Judelson y Tooley, 2000; Meyer y Spotts, 2000). Por otro lado, la determinación visual de una micosis suele implicar un desarrollo muy avanzado de la enfermedad, que ya es muy difícil de erradicar. Por lo tanto, sigue siendo de gran interés emplear métodos preventivos que generen resistencias de los cultivos antes de la aparición de las enfermedades.

El uso agronómico de FGA, TOGE-1 y TOGE-2 podría tener como resultado la reducción de tratamientos fungicidas, y retrasar el envejecimiento o senescencia de los cultivos. Hoy día la lucha contra las plagas de los cultivos se sigue realizando con pesticidas que indirectamente pueden provocar la aparición de resistencias en

los patógenos. Al mismo tiempo, la creciente demanda de prácticas agronómicas inocuas para el medio ambiente hace más importante, si cabe, el desarrollo de nuevas estrategias de control de enfermedades de plantas que sean respetuosas con el medio ambiente. Otro posible uso sería en la industria agroalimentaria, lo que podría aumentar la exportación de frutos por haber seguido tratamientos que prolonguen la vida de los mismos facilitando su comercialización y su manipulación.

A los compuestos ensayados se les puede considerar como compuestos biodegradables debido a su naturaleza química, a excepción de la furfuralamina que puede ser más estable en el entorno. Sin embargo, las bajas dosis que se han aplicado están lejos de alcanzar los límites máximos permitidos (LMR).

Este trabajo ha sido financiado en parte por la empresa CODIAGRO S.L., dedicada a la comercialización de agroquímicos, destacando como empresa puntera en el desarrollo de productos cuya base son los ácidos carboxílicos. La empresa está muy interesada en la investigación de productos que sean biodegradables y causen efectos beneficiosos para los cultivos. La incorporación de este tipo de compuestos en productos comerciales contribuiría a solucionar problemas agronómicos concretos.

6. CONCLUSIONES

1. Los principios activos contenidos en FGA, TOGE-1 y TOGE-2 incrementan el peso fresco y seco de las hojas y de la raíz, el número de entrenudos, la concentración de clorofila y de proteína, en los cultivos de pimiento y tomate. El incremento de la biomasa vegetal se podría atribuir en gran medida al efecto producido por el monoéster etílico del ácido adípico.
 2. Los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 reducen la actividad enzimática peroxidasa en ambos cultivos. Este efecto se podría asociar a la disminución en la concentración de sustratos (radicales libres y fenoles), que pueden causar los flavonoides y agliconas. Así mismo, se ha reducido la actividad proteasa y clorofilasa. Estos resultados indican que los principios activos de FGA, TOGE-1 y TOGE-2, tienen un efecto claramente antisenescente en ambos cultivos herbáceos.
 3. El tratamiento con FGA incrementa la tasa fotosintética y disminuye la tasa de transpiración, lo que produce un efecto antitranspirante.
 4. Tanto FGA como TOGE-1 y TOGE-2 inducen un aumento de las actividades enzimáticas PAL, CHI, y de los compuestos fenólicos y flavonoides intermediarios de la ruta del ácido siquímico. Estos resultados apoyan la idea de que los tratamientos realizados inducen los sistemas naturales de defensas de las plantas, frente al futuro ataque de patógenos.
 5. Los compuestos utilizados en los tratamientos también presentan un efecto fungicida *in vitro* sobre distintos hongos, poniendo de manifiesto la posible utilización de estos compuestos como fungicidas.
-

6. Los estudios de interacción planta-hongo realizados en cultivos herbáceos (tomate y pimiento) y cultivos leñosos (cítricos), confirman que los tratamientos con FGA, TOGE-1 y TOGE-2 retrasan el avance de la infección de distintos hongos. En este caso el efecto podría deberse a su acción tanto sobre la planta como sobre el patógeno.
 7. Los resultados obtenidos apoyan el posible uso agronómico de los tratamientos ensayados. Por una parte podrían retrasar los procesos de senescencia de ambos cultivos herbáceos (tomate y pimiento), y, al mismo tiempo, estimular las defensas naturales de las plantas, reduciendo así el uso de fungicidas perjudiciales para el medio ambiente. Así mismo, resultaría de gran interés su posible utilización en post-cosecha.
 8. Los resultados preliminares obtenidos con cítricos indican que los tratamientos utilizados no son efectivos exclusivamente para cultivos herbáceos, lo que abre un campo de estudio muy interesante en cuanto a su posible aplicación a otros cultivos.
-

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Afek U.; Szejtnberg A. 1988. Accumulation of scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathol.* 78, 1678-1682.
 2. Agazio M. De; Giardina M. C.; Grego S. 1988. Effect of exogenous putrescine, spermidine, and spermine on K⁺ uptake and H⁺ extrusion through plasma membrane in maize root segments. *Plant Physiol.* 87, 176-178.
 3. Alexieva V. 1994. Chemical structure, plant growth regulating activity of some naturally occurring and synthetic aliphatic amines. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 47, 779-82.
 4. Alexieva V.; Karanov E. 1987b. Growth retarding activity of mono- and dihydrazines of aliphatic dicarboxylic acids. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 40, 88-90.
 5. Alexieva V.; Karanov E. 1987a. Growth retarding activity of certain aliphatic dicarboxylic acids and their diethyl esthers. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 40, 85-88.
 6. Alfano J. R.; Collmer A. 1996. Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. *Plant Cell* 8, 1683-1698.
 7. Aloni R. 1987. Role of cytokinin in defferenciation of secondary xilem fibers. *Plant Pathol.* 70, 1631-1633.
 8. Apelbaum A.; Burgoon A. C.; Anderson J. D.; Lieberman M.; Ben-Arie R.; Mattoo A. K. 1981. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher-plant tissue of fruit protoplasts. *Plant Physiol.* 68, 453-456.
 9. Apelbaum A.; Goldlust A.; Ickson I. 1985. Control by ethylene of arginine decarboxylase activity in pea seedlings and its
-

- application for hormonal regulation of plant growth. *Plant Physiol.* 79, 635-640.
10. Arteca R. 1996. *Plant growth substances: Principles and applications*. Chapman & Hall. New York, USA.
 11. Ayres P. G. 1991. Growth responses induced by pathogens and other stresses. En: *Responses of plants to multiple stresses* (H. J. Mooney, E. J. Pell y W. E. Winner, eds). Academic Press. London, U. K. p. 227-248.
 12. Ayres P. G. 1992. Pests and pathogens, plant responses to foliar attack. *Environmental Plant Biology Series*. (W. J. Davies, eds). BIOS Scientific Publisher Limited . Oxford, United Kingdom
 13. Bagni N. 1966. Aliphatic amines and a growth factor of coconut milk stimulate cellular proliferation of *Heliantus tuberosus in vitro*. *Experientia* 22, 732-736.
 14. Bailey A. V. 1988. Antimicrobial compound bis(carbomethoxymethyl) adipate. US Department of Agriculture patents. Jan 19, (4,720,574).
 15. Bailey J. A.; Mainsfield J. W. 1982. *Phytoalexins*. Blackie and son. Glasgow y Londres, UK.
 16. Bais H. P.; Sudha G.; Ravishankar G. A. 1999. Putresceine influences growth and production of coumarins in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local). *J. Plant Growth Regul.* 18: 159-165.
 17. Barrington E. J. W. 1975. Hormone. En: *The New Encyclopaedia Britannica. Macropaedia. Encyclopaedia Britannica, Inc. Chicago, USA. V. 8, p. 1074-1088.*
 18. Bavaresco L.; Colla R.; Fogher C. 2000. Different responses to root infection with endophytic microorganisms of *Vitis vinifera*
-

- L. cv. pinot blanc grown on calcareous soil. *J. Plant Nutrition* 23 (8) 1107-1116.
19. Besford R. T.; Ludwig L. J.; Withers A. C. 1990. The greenhouse effect: acclimation of tomato plants growing in high CO₂, photosynthesis and ribulose-1,5-carboxylase protein. *J. Exp. Bot.* 41, 925-931.
20. Besford R.T. 1990. The greenhouse effect: acclimation of tomato plants growing in high CO₂, relative changes in Calvin cycle enzymes. *J. Plant Physiol.* 136, 458-463.
21. Bitonti A. J. 1985. Catalytic irreversible inhibition of *Trypanosoma brucei brucei* ornithine decarboxylase by substrate and product analogs and their effect on murine trypanosomiasis. *Biochem. Pharm.* 34 (10), 1773-1777.
22. Blok W. J.; Lamers J. G.; Termorshuizen A. J.; Bollen G. J. 2000. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathol.* 90: 253-259.
23. Blumenkratz N.; Absoe-Hansen G. 1973. New method of quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54, 484-489.
24. Bors W.; Langebartels C.; Michel C.; Sandermann H. 1989. Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochem.* 28 (6), 1589-1595.
25. Bowers J. H.; Locke J. C. 2000. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of Fusarium wilt in the greenhouse. *Plant Dis.* 84: 300-305.
-

26. Bowles D. 1992. Signals in the wounded plant. En Pests and Pathogens, plant responses to foliar attack (W. J. Davies, ed). BIOS Scientific Publishers Limited Oxford, UK. p. 33-38.
 27. Boyarkin A. 1951. Rapid method for peroxidase activity determination. *Biokhimiya Moscow* 16, 352-357.
 28. Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-255.
 29. Brown A. W.; Reeve D. R.; Crozier A. 1975. The effect of light on the gibberelin metabolism and growth of *Phaseolus coccineus* seedlings. *Planta* 126, 83-91.
 30. Burg S. P.; Burg E. A. 1966. The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. *PNAS* 55, 262-269.
 31. Campbell M. M.; Brian E. E. 1992. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. *Plant Pathol.* 32, 123-130.
 32. Candela M. E.; Alcázar M. D.; Espín A.; Egea C.; Almela L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Physiol.* 98, 62-70.
 33. Castelluccio C.; Paganga G.; Melikian N.; Bolwell G. P.; Pridham J.; Sampson J.; Rice-Evans C. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Lett.* 368, 188-192.
 34. Chanda S. V.; Sood C. R.; Reddy V. S.; Singh Y. D. 1998. Influence of plant growth regulators on some enzymes of nitrogen assimilation in mustard seedlings. *Soil Sci. Plant Anal.* 21 (8) 1765-1777.
 35. Cheng S.-H.; Kao C.-H. 1983. Localized effect of polyamines on chlorophyll loss. *Plant Cell Physiol.* 24, 1463-1467.
-

36. Cheng S.-H.; Shyr Y.-Y.; Kao C.-H. 1984. Senescence of rice leaves. XII. Effects of 1,3-diaminopropane, spermidine and spermine. *Bot. Bull. Acad. Sci.* 25, 191-196.
 37. Clark S. T. H. 1992. Influence of PHCA on soybean physiology and metabolism. Department of Agronomy, University of Arkansas, Fayetteville, AR.
 38. Cohen A. S.; Popovic R. B.; Zalik S. 1979. Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity, and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. *Plant Physiol.* 64, 717-720
 39. Cohen A. S.; Zalik S. 1978. Magnesium replacement by polyamines in higher plant cell-free polyphenylalanine synthesis. *Phytochem.* 17, 113-118.
 40. Cohen J. D.; Bandurski R. S. 1978. The bound auxins: protection of indole-3-acetic acid from peroxidase-catalized oxidation. *Planta* 139, 203-208.
 41. Conway W. S. 1982. Effect of postharvest calcium treatment on decay of Delicious apples. *Plant Dis.* 66, 402-403.
 42. Cortellini W.; Maini P. 1994. Utilizzo del biostimolante Siapton per migliorare l'efficacia di anticrittogamici. *Informatore Fitopatologico* 4, 44-47.
 43. Danell K.; Huss-Danell K.; Bergström R. 1985. Interactions between browsing moose and two species of birch in Sweeden. *Ecology* 66, 1867-1878.
 44. Davies P. J. 1987. The plant hormones. En: *Plant hormones and their role in plant growth and development* (P.J. Davies, ed). Ch. Al. Martinus Nijhoff. Boston, USA.
 45. Dawson W. O.; Hiff M. E. 1992. Host-range determinants of plant viruses. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 43, 527-555.
-

46. Del Río J. A.; Fuster M. D.; Sabater F.; Porras I.; García-Lidón A.; Ortuño A. 1995. Effect of benzylaminopurine on the flavanones hesperidin, hesperetin 7-O-glucoside, and purin in tangelo Nova fruits. *J. Agric Food Chem.* 43 (8), 2030-2034.
 47. Delaney T. P.; Uknes S.; Vernooji B.; Friedrich L.; Weymann K. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Sicence* 266, 1247-1249.
 48. Dixon R. A.; Dey P. M.; Whitehead I. M. 1982. Purification and properties of chalcone isomerase from cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta.* 715, 25-33.
 49. Dixon R. A.; Gerrish C.; Lamb C. J.; Robbins M. P. 1983. Elicitor-mediated induction of chalcone isomerase in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Planta* 159, 561-569.
 50. Djian C.; Ponchet M.; Cayrol J. C. 1994. Nematocidal properties of carboxylic acids and derivatives. *Pest. Biochem. Physiol.* 50, 229-239.
 51. Dodge J. D. 1970. Change in chloroplast fine structure during the autumnal senescence of *Betula* leaves. *Ann. Bot.* 34, 817-824.
 52. Dubois M.; Gilles K. A.; Hamilton J. K.; Rebers P. A.; Smiths F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ann. Biochem.* 28, 350-356.
 53. Eatos F. M. 1955. Physiology of the cotton plant. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 6, 299-325.
 54. Eatos F. M.; Ergle D. R. 1948. Carbohydrate accumulation in the cotton plant at low nutrient levels. *Plant Physiol.* 23, 169-187.
 55. Eatos F. M.; Ergle D. R. 1949. Organic acids of the cotton plant. *Plant Physiol.* 24, 373-386.
-

56. Edwards P. J. 1989. Insect herbivory and plant defence theory. En: Toward a more exact ecology (P. J. Grubb y J. B. Whittaker, eds). Blakwell Scientific Publication. Oxford, UK. p.275-295.
 57. El Gaouth A.; Wilson C. L.; Winsniewski M. E. 1995. Sugar analogs as potential fungicides for postharvest pathogens of apple and peach. *Plant Dis.* 79 (3), 254-258.
 58. El Ghaouth A.; Arul J.; Grenier J.; Asselin A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathol.* 82, 398-402.
 59. Engelke A. L.; Hamzi H. Q.; Skoog F. 1973. Cytokinin-gibberellin regulation of shoot development and leaf form in tobacco plantlets. *Am. J. Bot.* 60, 491-495.
 60. Estrada B.; Bernal M. A.; Díaz J.; Pomar F.; Merino F. 2000. Fruit development in *Capsicum annuum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *J. Agric. Food Chem.* 48 (12) 6234-6239.
 61. Evans P. T.; Malmberg R. L. 1989. Do polyamines have roles in plant development? *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 235-269.
 62. Faust M. 1974. The role of calcium in the respiratory mechanism and senescence of apples. *Colloq. Int. C. N. R. S.* 238, 87-92.
 63. Flink L.; Pettijohn D. E. 1975. Polyamines stabilize DNA folds. *Nature* 253, 62-63.
 64. Foster S. A.; Walters D. R. 1993. Fungicidal activity of the polyamine analogue, ketoputresceine. *Pest. Sci.* 37, 267-272.
 65. Foyer C. H. 1987. The basis of source-sink regulation in leaves. *Plant Physiol. Biochem* 25, 649-657.
-

66. Foyer C. H. 1993. Ascorbic acid. En: Antioxidants in Higher Plants (eds R. G. Alscher, J. L. Hess). CRC Press. Boca Ratón, FL, pp. 31-58.
 67. Fujimura M.; Ochiai N.; Ichiishi A.; Usami R.; Horikoshi K.; Yamaguchi I. 2000. Fungicide resistance and osmotic stress sensitivity in os mutants of *Neurospora crassa*. Pest. Biochem. Physiol. 67 (2) 125-133.
 68. Fuster M. D.; Porras I.; García-Lidón A.; Sabater F.; Ortuño A.; Del Río J. A. 1994. Efecto del Brotomax sobre el crecimiento y producción de flavonoides en frutos de tangelo Nova. Levante Agrícola 33, 60-64.
 69. Galston A. W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. Biosci. 33, 382-388.
 70. Galston A. W.; Altman A.; Kaur-Sawnhey R. 1978. Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat leaf protoplast. Plant Sci. Lett. 11, 69-79.
 71. García-Puig D.; Pérez M. L.; Fuster M. D.; Ortuño A.; Sabater F.; Porras I.; García-Lidón A.; Del Río J. A. 1995. Modification by ethylene of the secondary metabolites naringin, narirutin, and nootkatone, in grapefruit. Planta Medica. 61, 283-285.
 72. Geiger D. R. 1976. Effects of translocation and assimilate demand on photosynthesis. Can. J. Bot. 54, 2337-2345.
 73. Geissman T. A.; Clinton R. O. 1946. Flavonones and related compounds. I. The preparation of polyhydroxychalcones and flavonones. J. Am. Chem. Soc. 68, 670-697.
 74. Georgiev G. I.; Karanov E.; Alexieva V.; Moskova K. 1991. Effect of MESA on water relations maize & barley seedlings. Proc. Inter. Youth Symposium. Plant Metab. Regul. Sofia, Bulgaria 5, 17-21.
-

75. Georgiev G. T.; Karanov E. 1989. IFR 13 a biological active substance for comproving of quality and productivity of soybean. Proceedings of Inter Conference on Chemistry and Biotechnology. Sofia, Bulgaria 5, 356-360.
 76. Gerrish C.; Robbins M. P.; Dixon R. A. 1985. Trans-cinamic acid as a modulator of chalcone isomerase in bean cell suspension cultures. *Plant Sci.* 38, 23-27.
 77. Goeschl J. D.; Pratt H. K.; Bonner B. 1967. An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumula portion of the etiolated pea seedlings. *Plant Physiol.* 42, 1077-1080.
 78. Goodwin; Mercer. 1988. Plant phenolics. En: Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press.Oxford, UK. p.558-567.
 79. Gottstein H. D.; Kuc J. A. 1989. Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. *Phytopathol.* 79, 176-179.
 80. Gould K. S.; Kuhn D. N.; Lee D. W.; Oberbauer S. T. 1995. Why leaves are sometimes red *Nature* 378, 241-242.
 81. Grisebach H.; Börner H. 1982. Enzime induction in soybean infected by *Phytophthora megasperma* f. *Sp glycea*. *Arch. Biochem. Biophys.* 217 (1) 67-71.
 82. Grisebach H.; Ebel J. 1978. Phytoalexins, chemical defence substance of higher plants. *Amgew. Chem. Int. Ed Engl.* 17, 635-647.
 83. Guo C. D.; Oosterhuis M.; Zhao D. 1993. Effect of carboxylic acids on nutrient uptake, photosynthesis and soluble carbohydrate components of cotton plants. Beltwide Cotton Conference, USA. 3, 1272-1280.
-

84. Guo Z.-J.; Lamb C.; Dixon A. R. 1998. Potentiation of the peroxidative burst and isoflavonoid phytoalexin accumulation by serine protease inhibitors. *Plant Physiol.* 118 (4) 1487-1497.
 85. Gur A.; Altman A.; Stern R.; Sigler T.; Wolowitz B. 1987. Interactions between myo-inositol and cytokinins: Their basipetal transport and effect on peach roots. *Physiologia Plantarum* 69, 633-638.
 86. Hadwiger L. A.; Loschke D. C. 1981. Molecular communication in host-parasite interactions: Hexosamine polymers (chitosan) as regulator compounds in race-specific and other interactions. *Phytopathol.* 71, 756-762.
 87. Hahlbrock K.; Zilg H.; Grisebach H. 1970. Stereochemistry of the enzymatic cyclisation of 4,2',4'-trihydroxychalcone to 7,4'-dihydroxyflavanone by isomerases from mung bean seedlings. *Eur. J. Biochem.* 15, 13-18.
 88. Hahn M. G.; Bucheli P.; Cervone F.; Doares S. H.; O'Neil R. A.; Darvill A.; Albersheim P. 1989. *Plant Microbe Interactions*. Vol 3. (J. E. Nester y T. Kosuge, eds). McMillan Press.
 89. Hahlbrock K.; Grisebach H. 1979. Enzymatic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, 105-130.
 90. Hahlbrock K.; Scheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 40, 433-469.
 91. Harold F. M. 1964. Stabilization of *Streptococcus faecalis* protoplasts by spermine. *J. Bacteriol.* 88, 1416-1420.
 92. Havis N. D.; Walters D. R.; Cook F. M.; Robins D. J. 1997. Synthesis, fungicidal activity, and effects on fungal polyamine
-

- metabolism of novel cyclic diamines. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2341-2344.
93. Havis W. D.; Walters D. R.; Foster S. A.; Martin W. P.; Cook F. M.; Robins D. J. 1994a. Fungicidal activity of the synthetic putresceine analogue, (e)-1,4-diaminobut-2-ene, and derivatives. *Pest. Sci.* 41, 61-69.
94. Havis N. D.; Walters D. R.; Foster S. A.; Martin W. P.; Cook F. M.; Robins D. J. 1994b. Fungicidal activity of three putresceine analogues. *Pest. Sci.* 41, 71-76.
95. Heath M. C. 1991. Evolution of resistance to fungal parasitism in natural ecosystems. *New Phytol.* 119, 331-343.
96. Heinonen M.; Rein D.; Satue-Gracia M. T.; Huang S. W.; German J. B.; Frenkel E. N. 1998. Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin-liposome oxidation system. *J. Agric. Food Chem.* 46 (3), 917-922.
97. Herold A. 1980. Regulation of photosynthesis by sink activity – the missing link. *New Phytol.* 86, 131-144.
98. Hewett E. W.; Wareing P. F. 1973. Cytokinins in *Populus x robusta* Schneid: Light effects on endogenous levels. *Planta* 114, 119-129.
99. Hiatt A. C.; Malmberg R. L. 1988. Utilization of putresceine in tobacco cell lines resistant to inhibitors of polyamine synthesis. *Plant Physiol.* 86, 441-446.
100. Hoagland P. R.; Arnon D. J. 1950. The water culture method for grown plants without soil. *Cal. Agric. Exp. Stat. Cir.* 347, 1-32
101. Holbert J.; Hoppe P.; Smith A. 1935. Some factors affecting infection with and spread of *Diplodia seae* in host tissue. *Phytopathol.* 25, 1113-1114.
-

102. Holden M. 1960. The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase. *Biochem. J.* 78, 359-364.
 103. Hoos G.; Blaich R. 1990. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *J. Phytopathol.* 129, 102-110.
 104. Horsfall J. 1975. The story of a nonconformist. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13, 1-13.
 105. Howell C. R.; Hanson L. E.; Stipanovic R. D.; Puckhaber R. S. 2000. Induction in terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathol.* 90: 248-252.
 106. Hutchison M. L.; Tester M. A.; Gross D. C. 1995. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomicin in transmembrane ion flux: A model for the mechanism of action in plant-pathogen interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 610-620.
 107. Ioku K.; Tsushida T.; Takei Y.; Nakatani N.; Terao J. 1995. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1234 (1), 99 -104.
 108. Isaac S. 1992. Fungal plant interactions. Chapman y Hall. Londres.
 109. Jahardhan, K. V.; Vasudeva N.; Gopel N. H. 1973. Diurnal variation of endogenous auxin in arabica coffee leaves. *J. Plant Crops* 1 (Suppl), 93-95.
 110. Janisiewicz W. J. 1987. Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathol.* 77, 481-485.
 111. Janisiewicz W. J. 1991a. Control of postharvest diseases of fruits with biocontrol agents. En: *Biological control of plant*
-

- diseases (Bay-Petersen, ed). FFTC book series No. 42. Food and fertilizer technology centre for asian and pacific region. Tapei, Taiwan. p.56-67.
112. Janisiewicz W. J. 1994. Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears. *Appl. Env. Microbiol.* 60 (8), 2671-2676.
113. Janisiewicz W. J.; Tworkoski T. J.; Sharer C. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathol.* 90: 1196-1200.
114. Janisiewicz W. J.; Roitman J. 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathol.* 78, 1697-1700.
115. Janisiewicz W. J.; Usall J.; Bors B. 1992. Nutritional enhancement of biocontrol of the blue mold on apples. *Phytopathol.* 8, 1364-1370.
116. Janisiewicz W. J. 1991b. Biological control of postharvest fruit diseases. En *Handbook of applied mycology* (D. K. Arora, B. Rai, K. G. Mukerji, G. R. Knudsen, eds). Marcel Dekker, Inc. New York, USA. Vol. 1, 301-326.
117. Jordan V. W. L. 1973. The effect of prophylactic spray programs on the control of pre- and postharvest diseases of strawberry. *J. Plant Pathol.* 22, 67-70.
118. Judelson J. S.; Tooley P. W. 2000. Enhanced polymerase chain reaction method for detecting and quantifying *Phytophthora infestans* in plants. *Phytopathol.* 90: 1112-1119.
119. Jung J. 1979. Possibilities for optimalization of plant nutrition by new agrochemical substances – especially in cereals. En:
-

- Plant regulation and world agriculture (T. M. Scott, ed). Plenum Press, New York.
120. Karanov E.; Alexieva V. 1985. Retardation of leaf senescence by some aliphatic dicarboxylic acids and their diesters. Acta Univ. Agric. Brno. CSSR. 33, 453-456.
121. Karanov E.; Iliev L.; Alexieva V.; Georgiev G. T.; Thang N. T.; Natova L. 1995. Synthesis and plant growth regulating activity of some novel 2-methoxy-4-(1-OR 2-propenyl)-6-substituted phenols. Bulg. J. Plant Physiol. 21 (4), 39-47.
122. Kaur-Sawhney R.; Galston A. W. 1979. Interaction of polyamines and light on biochemical processes involved in plant senescence. Plant Cell Environ. 2, 189-196.
123. Kintzios S.; Drossopoulos J. B.; Lymperopoulos C. 2000. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of rose. Soil Sci. Plant Anal. 23 (10) 1407-1420.
124. Knogge W. 1996. Fungal infection of plants. Plant Cell 8, 1711-1722.
125. Kuchenbuch R.; Jung J. 1988. Changes in root-shoot ratio and ion uptake of maize (*Zea mays* L.) from soil as influenced by a plant growth regulator. Plant and Soil 109, 151-157.
126. Kudrev T.; Petrova L. 1975. Influence of some PGR on water balance. Fiziol. Na. Rast. Sofia 4, 71-75.
127. Lacan D.; Baccou J.-C. 1998. High levels of antioxidant enzymes correlate with delay senescence in nonnetted muskmelon fruits. Planta 204, 377-382.
128. Lamb C. J.; Merrit T. K.; Butt V. S. 1979. Synthesis and removal of phenylalanine ammonia-lyase activity in illuminated discs of
-

- potato tuber parenchyme. *Biochim. Biophys. Acta* 582, 196-212.
129. Lecoq C.; Koukkari W. L.; Brenner M. L. 1983. Rhythmic changes in abscisic acid (ABA) content of soybean leaves. *Plant Physiol.* 72 (suppl.), 52.
130. Lee Y.; Howard L. R.; Villalon B. 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J. Food Sci.* 60 (3), 473-476.
131. LeRedulier D.; Goas G. 1975. Influence des ions ammonium et potassium sur l'accumulation de la putresceine chez les jeunes plantes de *Soja hispida Moench*, privées de leurs cotyledons. *Physiol. Veg.* 13, 125-136.
132. Levi M. P.; Cowling E. B. 1969. Role of nitrogen in wood deterioration. VII Physiological adaptation of wood-destroying and other fungi to substrate deficient in nitrogen. *Phytochem.* 59, 460-468.
133. Liang X.; Dron M.; Cramer C. L.; Dixon R. A.; Lamb C. J. 1989. Differential regulation of phenyl alanine ammonia-lyase genes during development and environmental clues. *J. Biol. Chem.* 264, 14486-14492.
134. Lindsay R. B.; Brian A.; McGaw. 1992. *Metabolismo secundario*. En: J. Azcón-Bieto y M. Talón. McGraw-Hill Interamericana de España.
135. Maas K. 1999. Plant hormones. www.plant-hormones.bbsrc.ac.uk/education/Kenh.htm.
136. Mahboobi H.; Yucel M.; Ökten H. A. 2000. Changes in total protein profiles of barley cultivars in response to toxic boron concentration. *J. Plant Nutrition* 23 (3) 391-399.
-

137. Malamy J.; Carr J. P.; Klessig D. F.; Raskin I. 1990. Salicylic acid – a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1002-1004.
 138. Mauch F.; Hadwiger L. A.; Boller T. 1984. Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol.* 76, 607-611.
 139. McLaren D. J.; Ortega-Pirres G.; Parkhouse R. M. E. 1987. *Trichinella spiralis*: Immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using monoclonal antibody probes. *Parasitology* 94, 101-114.
 140. McNeil M.; Darvill A. G.; Albersheim P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem* 53, 625.-666.
 141. Meyer U. M.; Spotts R. A. 2000. Detection and quantification of *Botrytis cinerea* by ELISA in pear stems during cold storage. *Plant Dis.* 84: 1099-1103.
 142. Miller E.; Schreier P. 1985. Studies on flavonol degradation by peroxidases (donor: H₂O₂-oxidoreductase, EC 1.11.1.7). Part 2: Quercetin. *Food Chem.* 17, 143-154.
 143. Mitsuhashi-Kato M.; Mishibaoka H.; Shimokoriyama M. 1978. Anatomical and physiological aspects of developmental processes of adventitious root formation. *Plant Cell Physiol.* 19, 393-400.
 144. Mörschbacher B.; Noll U.; Gorrichon L.; Reisener H. 1990. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to wheat stem rust. *Plant Physiol.* 93, 465-470.
-

145. Muñoz S. C. 1993. Non preference induced effect on the spwf Bemisia tabaci (GENN.) type B on carboxy treated cotton plants. Proquisa, Microflo, Head, Research Department. Mexico's Brach. El Paso, Texas.
 146. Muñoz S. C. 1994. Non preference induced effect of the sweetpotato whitefly, *Bermisia Tabaci* (Genn.) type B on carboxy treated cotton plants. Cotton insect research and control conference. En: Beltwide Cotton Conferences. USA. 1231-1233.
 147. Muñoz S. C. 1995. PHCA (TOG) enhancer power novelty for potasium nitrate uptake nutrient efficiency on cotton. Cotton soil management and plant nutrition conference. En: Beltwide Cotton Conferences. U.S.A. 1350.
 148. Muñoz S. C. 1997. Finesse, a very promising concept in postharvest horticulture. Asian internacional postharvest conferences. Manila, Filipinas.
 149. Nickell L. 1982. Plant growth regulators. Springer-Verlag Publishers. New York, U.S.A
 150. Ortuño A.; Botía J. M.; Fuster M. D.; Porras I.; Garcia-Lidón A.; Del Río J. A. 1997. Effect of scoparone (6,7-dimetoxycoumarin) biosynthesis on the resistance of Tangelo Nova, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. J. Agric. Food Chem. 45 (7), 2740-2743.
 151. Paul N. D. 1990. Modification of the effects of plant pathogens by other components of natural ecosystems. En: Pest, Pathogens and Plants Communities (eds J. J. Burdon y S. R. Leather). Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. p.81-96.
-

152. Perreneud S. 1977. Potassium and plant health. Research Topics. En Potash. Inst Bern. Switzerland.
 153. Pezet R.; Pont V. 1990. Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea*. J. Phytopathol. 129, 19-30.
 154. Phillips J. L. 1994. A comparison of methods for inoculating bean plants with *Elasmopalpusaphis trichopoea* and some factors affecting infection. Ann. Appl. Bot. 125, 97-104.
 155. Piquery L.; Davoine C.; Huault C.; Billard J.-P. 2000. Senescence of leaf sheaths of ryegrass stubble: changes in enzyme activities related to H₂O₂ metabolism. Growth Regulation. 30, 71-77.
 156. Porter C. W.; Sufrin J. R. 1986. Interference with polyamine biosynthesis and/or function by analogs of polyamines or methionine as a potential anticancer chemotherapeutic strategy. Anticancer Res. 6, 525-542.
 157. Prego M. C.; Díaz J.; Bernal M. A.; Merino F. 1997. Efecto de compuestos fenólicos sobre el crecimiento de hongos patógenos del pimiento. V Congreso Hispano-luso de Fisiología Vegetal. XII Reunión Nacional de la SEVF. Córdoba, España. C6-15, 258.
 158. Pritsos C. A.; Pastores J.; Pardini R. S. 1991. Role of superoxide dismutase in the protection and tolerance to the prooxidant allelochemical quercetin in *Papilio polyxenes*, *Spodoptera eridania* and *Trichoplusia ni*. Arch. Insect and Biochem. Physiol. 16 (4), 273-282.
 159. Pruitt P. D. 1999. An explanation of plant hormones. <http://www.op.net/~socrtwo/plants.htm> .
-

160. Rajam M. V.; Weinstein L. H.; Galston A. W. 1985. Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 82, 6874-6878.
 161. Rajasekaran L. R.; Blake T. J. 1999. New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of jack pine seedlings. *J. Plant Growth Regul.* 18: 175-181.
 162. Raposo R.; Gomez V.; Urrutia T.; Melgarejo P. 2000. Fitness of *Botrytis cinerea* associated with dicarboximide resistance. *Phytopathol.* 90: 1246-1249.
 163. Rastogi R.; Davies P. 1991. En *Biochemistry and physiology of polyamines in plants* (eds R. Slocum, H. Flores). CRC Press. 187-200.
 164. Redman R. S.; Freeman S.; Clifton D. R.; Morrel J.; Brown G.; Rodríguez R. J. 1999. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic andophytic mutant of *Colletotrichum magna*. *Plant Physiol.* 119, 795-804.
 165. Reuveni R.; Agapov V.; Reuveni M. 1994. Foliar spray of phosphates induces growth increase and systemic resistance to *Puccinia sorghi* in maize. *Plant Pathol.* 43, 245-50.
 166. Rhodes J. D.; Thain J. F.; Wildon D. C. 1996. The pathway for systemic electrical signal conduction in the wounded tomato plant. *Planta* 200, 50-57.
 167. Rich J. R.; Keen N. T.; Thomason I. J.; McCarthy J. C.; Smith J. D. H.; Parrot W. L.; Shepherd R. L. 1988. Effects on bioregulators on flavonoids insect resistance and yield of seed cotton. *J. Agric. Food Chem.* 36, 1055-1061.
 168. Richards F. J.; Coleman R. G. 1952. Occurrence of putresceine in potassium deficient barley. *Nature* 170, 460.
-

169. Roberts D. A.; Boothreoyd C. W. 1984. Fundaments of plant pathology. (W. H. Freeman y col.; eds). New York.
 170. Salisbury F. B.; Ross C. W. 1992. Plant Physiology. Wadsworth, Belmont, CA. USA. p.357-407 y 531-548.
 171. Salzman R. A.; Tikhonova I.; Bordelon B. P.; Hasegawa P. M.; Bressan R. A. 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 117, 465-472.
 172. Sanchez-Casas P.; Klessig D. F. 1994. A salicylic-acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol.* 106, 1675-1679.
 173. Scholes J. D. 1992. Photosynthesis: cellular tissue aspect in diseased leaves. En: *Pests and Pathogens, plant responses to foliar attack* (W. J. Davies, ed). BIOS Scientific Publishers Limited Oxford, UK. p. 85-106.
 174. Sekizawa Y.; Mase S. 1980. Recent progress in studies on non-fungicidal controlling agent Propenazole, with reference to the induced resistance in rice plant. *Rev. Plant Protec. Res.* 13, 114-121.
 175. Sembdner G.; Gross D.; Liebich H.W.; Schneider G. 1980. Biosynthesis and metabolism of plant hormones. En *Hormonal regulation of development I.* (J. MacMillen, ed). Springer Verlag Heidelberg, Germany.
 176. Sharp J. K.; McNeil M.; Albersheim P. 1984. The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(3-o-glucopyranosyl)-D-glucitol from the mycelial walls of
-

- Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. J. Biol. Chem. 259, 11321-11336.
177. Sharples R. O. 1980. The influence of orchard nutrition on the storage quality of apples and pears grown in the United Kingdom. En Mineral nutrition of fruit trees (D. Atkinson, J. E. Jackson, R. O. Sharples, M. W. Waller, eds). Butterworth's. London, UK. p.17-28.
178. Sheen J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. Plant Cell 2, 1027-1038.
179. Shih. L. M.; Kaur-Sawhney R.; Fuhrer J.; Samanta S.; Galston A. 1982 Effects of exogenous 1,3-diaminopropane and spermidine on senescence oat leaves I. Plant Physiol. 70:1592-1596.
180. Slocum R. D.; Kaur-Sawhney R.; Galston, A. W. 1984. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. Arch. Bioch. Biophys. 235, 283-303.
181. Slusarenko A. J.; Croft K. P.; Voisey C. R. 1991. Biochemical and molecular events in the hypersensitive response of bean to *Pseudomonas phaseolicola* pv. *Phaseolicola*. En Biochemistry and molecular biology of plant-pathogen interactions (C. J. Smith, ed) Clarendon Press. Oxford, UK. p.126-143.
182. Smith T. A. 1985. Polyamines. Ann. Rev. Plant Physiol. 36, 117-143.
183. Sommer N. F. 1985. Strategies for control of postharvest diseases of selected commodities. En Postharvest technology of horticultural crops (A. A. Kader, R. F. Kasmire, F. G. Mitchell, M. S. Reid, N. F. Sommer, J. F. Thompson, eds). Coop. Ext.; Univ. Calif.; Davis, USA. p.83-99.
-

184. Spotts R. A.; Cervantes L. A. 1984. Populations pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp.; *Penicillium* spp.; and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Dis.* 70, 106-108.
 185. Stahl R. S.; Grossl P.; Bugbee B. 2000. Effect of 2(N-morphilo)ethane)sulphonic acid (MES) on the growth and tissue composition of cucumber. *Soil Sci. Plant Anal.* 22 (2) 315-330.
 186. Stitche L.; Mauch-Mani B.; Métraux J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 35, 235-270.
 187. Strange R. N. 1992. Resistance: the role of the hypersensitive response and phytoalexins. En: *Pests and Pathogens, plant responses to foliar attack* (W. J. Davies, ed) BIOS Scientific Publishers Limited Oxford, UK. p.39-55.
 188. Stutte A. C. 1990. Influence of PCHA on soybean physiology and metabolism. Research Report. University of Arkansas. Dept. of Agronomy, Altheimer Laboratory.
 189. Subler S.; Dominguez J.; Edwards C. A. 1998. Assessing biological activity of agricultural biostimulants: Bioassays for plant regulators in three soil additives. *Soil Sci. Plant Anal.* 29 (7-8) 859-866.
 190. Tabor C. W. 1962. Stabilization protoplasts and spheroplasts by spermine and other amines. *J. Bacteriol.* 83, 1101-1111.
 191. Taiz L.; Zeiger E. 1991. *Plant Physiology*. Benjamin/Cummins Publishing Company. Calif. USA.
 192. Takahama U. 1988. Hydrogen peroxide-dependent oxidation of flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives in epidermal and guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol.* 29, 475-481.
-

193. Thomas H. 1975. Regulation of alanine aminotransferase in leaves of *Lolium temulentum* senescence. *Z. Pflanzenphysiol* 74, 208-218.
 194. Timpa J. D.; Burne J. J.; Quisenberry J. E.; Wendt C. W. 1986. Effects of water stress on the organic acid and carbohydrate compositions of cotton plants. *Plant Physiol.* 82, 724-728.
 195. Todorov D.; Alexieva V.; Karanov E.; Velichov D.; Velikova D. 1992. Effect of certain dicarboxylic acids monoesters on growth, chlorophyll content, chlorophyllase and peroxidase activities, and gas-exchange of young maize plants. *J. Plant Growth Reg.* 11, 233-238.
 196. Todorov D.; Karanov E. 1995. Changes in mineral content of young maize plants under the influence of some dicarboxylic acid monoesters. *J. Plant Nutrition* 18 (1), 25-34.
 197. Toivonen P. M. A.; Sweeney M. 1998. Differences in chlorophyll loss at 13 °C for two broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars associated with antioxidant enzyme activities. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1), 20-24.
 198. Turner N. 1986. A decade of progress. En *Advances in Agronomy, crop and water deficits.* (N. C. Brady, ed). Academic Press. London, U.K. 39, 1-43.
 199. Van Staden, J.; Smith, A.R. 1978. The synthesis of cytokinin in excised roots of maize and tomato under aseptic conditions. *Ann. Bot.* 42, 751-753.
 200. VanderPlank J. 1984. Sink-induced loss of resistance, high sugar disease processes and biotrophy. En *Disease-resistance in plants* (J. E. Vanderplank, ed). Academic Press, London, UK. 107-121.
-

201. Vassileva V.; Ignatov G. 1999. Effect of polyamines on oxygen and metabolite transport across mitochondrial and symbiotic membranes of *Galega orientalis* nodules. *Bulg. J. Plant Physiol.* 25 (1-2) 49-57.
 202. Velichov D.; Georgiev G. T. S.; Tsonev T. S.; Karanov E. 1989. Effects of some aliphatic dicarboxylic acid esters on soybean (*Glycine max* M.) photosynthesis and transpiration. *Fiziol. Na. Rast. Sofia, Bulgaria.* 15, 21-26.
 203. Viñas I.; Usall J.; Teixidó N.; Sanchis V. 1994. *Hortofruticultura.* Noviembre, 26-30.
 204. Walters D. R.; Murray D. C. 1992. Induction of systemic resistance to rust in *Vicia faba* by phosphate and EDTA: effects of calcium. *Plant Pathol.* 41, 444-448.
 205. Walton L. D. 1996. Host selective toxins agents of compatibility. *Plant Cell* 8, 1723-1733.
 206. Wareing P. F.; Phillips I. D. J. 1981. *Growth and differentiation in plants.* Pergamon Press. Great Britain.
 207. Weinstein L.; Kaur-Sawhney R.; Rajam M. V.; Wett Laufer S.; Dalston A. W. 1986. Cadmium induced accumulation of putrescine in oat and bean leaves. *Plant Physiol.* 82, 641-645.
 208. Weiss M.; Mikolagenski S.; Peipp H. 1997. Tissue-specific and development-dependent accumulations of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. *Plant Physiol.* 114, 15-27.
 209. West H. M.; Walter D. R. 1988. The effects of polyamine biosynthesis inhibitor of infection of *Hordeum vulgare* L. by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* Marchal. *New Phytol.* 110, 193-200.
 210. Wilson C. L.; Wisniewski M. 1989. Biological control of postharvest diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27, 425-441.
-

211. Wilson C. L.; Wisniewski M. 1989. Biological control postharvest diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27, 425-441.
 212. Wolfe S. L. 1993. *Molecular and cellular biology*. Wadsworth. Belmont, CA, USA. p. 702-704.
 213. Wong S. C. 1979. Elevated atmospheric pressure of CO₂ and plant growth. Interaction of nitrogen and photosynthetic capacity in C₃ and C₄ plants. *Ecologia* 44, 68-74.
 214. Wright K. A. 1987. The nematode's cuticle –its surface and the epidermis: Function, homology, analogy –A current consensus. *J. Parasitol.* 73, 1077-1083.
 215. Yamasaki H.; Sakihama Y.; Ikehara N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115, 1405-1412.
 216. Yao K.; De Luca V.; Brisson N. 1995. Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 7, 1787-1799.
 217. Young D. H.; Kaus H. 1983. Release of calcium from suspension-cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations, and polyamines in relation to effects on membrane permeability. *Plant Physiol.* 73, 698-702.
 218. Young N. D.; Galston A. W. 1983. Are polyamines transported in etiolated peas? *Plant Physiol.* 73, 912-914.
 219. Zähringer U.; Ebel J.; Grisenbach H. 1978. Induction of phytoalexin synthesis in soybean. *Arch. Biochem. Biophys.* 188, 2, 450-455.
 220. Zheleva D.; Karanov E. 1994. Changes of endogenous polyamine level in pea leaves after application of antrazine,
-

- polyamines and combination between them. *Comp. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 47 (9), 73-76.
221. Zook M. N.; Rush J. S.; Kuc J. A. 1987. A role of Ca^{+2} in the elicitation of rishin and lubimin accumulation in potato tissue. *Plant Physiol.* 84, 520-525.
222. Zucker M. 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 40 (5), 779-784.
223. Novoa R.; Loomins R. S. 1981. Nitrogen and plant production. En: J. Monteith and C. Webb (eds) *Soil Water and Nitrogen in Mediterranean-type Environments*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, publishers. The Hague, The Netherlands. 177-204.
224. Slocum R.D.; Galston A.W. 1987. Inhibition of polyamine biosynthesis in plants and plant pathogenic fungi. En: *Inhibition of polyamine metabolism. Biological significance and basis for new therapies*. (P.P. McCann, A.E. Pegg y A. Sjoerdsma, eds). Academic. E.E.U.U.; New York. 305-316.
-