

**RESPUESTA DE DEFENSA RELACIONADA CON LA APLICACIÓN DEL
EXTRACTO DE *Heliopsis longipes* EN EL PATOSISTEMA TOMATE-*Fusarium
oxysporum f.sp. lycopersici***

SUSANA GONZÁLEZ MORALES

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

**Buenvista, Saltillo, Coahuila, México.
Octubre de 2011**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

RESPUESTA DE DEFENSA RELACIONADA CON LA APLICACIÓN DEL
EXTRACTO DE *Heliopsis longipes* EN EL PATOSISTEMA TOMATE-*Fusarium*
oxysporum f.sp. lycopersici

TESIS

PRESENTADA POR:

SUSANA GONZÁLEZ MORALES

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada
como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal

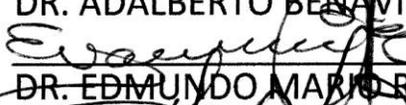


DR. ALBERTO FLORES OLIVA

Asesor

DR. ADALBERTO BENAVIDES MENDOZA

Asesor



DR. EDMUNDO MARIO RODRÍGUEZ CAMPOS

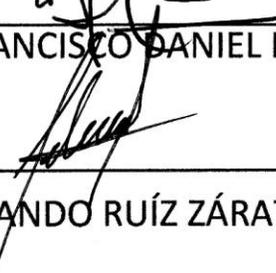
Asesor



DR. GUSTAVO FRIAS TREVINO

Asesor

DR. FRANCISCO DANIEL HERNANDEZ CASTILLO



DR. FERNANDO RUÍZ ZÁRATE

Subdirector de Posgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Octubre del 2011

DEDICATORIA

Este proyecto importante que concluyo se lo quiero dedicar muy especialmente a la persona que en todo momento está presente en mi vida; que me alienta y me da fuerzas para seguir adelante, tu eres mi inspiración en todas las cosas que hago, y la persona que soy hoy en día es gracias a ti, a tu amor, aunque no estés presente físicamente tengo la certeza que me acompañas siempre, gracias **Papá**.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la oportunidad de finalizar este trabajo y por todas sus bendiciones.

A mi **esposo Armando**, amor, gracias por todo el apoyo y el amor incondicional que siempre me has dado, gracias por acompañarme en todas mis locuras, momentos felices y los tristes, el estar a tu lado me hace ser mejor persona y este logro es de los dos. TA

A mi **hijo Alan**, tu eres una parte fundamental en este proyecto, porque naciste cuando apenas empezaba el doctorado, gracias por tu amor, por darme esas sonrisas y esos abrazos de oso que me hacen el día, eres mi inspiración.

A **mi mamá**, gracias por tu apoyo incondicional y paciencia, ten la certeza que todo lo que emprendo en mi vida es gracias a tu amor y tu ejemplo, este trabajo te lo dedico, eres la mujer más valiente que conozco.

A **mi hermana Claudia** por creer siempre en mí sobre todas las cosas y darme ánimos en todo momento, gracias por demostrarme siempre tu cariño y tu amor.

A **mi sobrinos Antonio y Valeria**, gracias por su alegría y su amor, y por su ayuda cuando trabajé en el invernadero.

A **mis suegros (Marina y Armando)** este trabajo también es de Ustedes, gracias por su apoyo incondicional y por su amor.

A **mi cuñado Adrian, Tatiana y Adriancito** gracias por todo su cariño y su apoyo.

A **mis amigos:** Araceli, Ruth, Mario, Lili, Jake, AnaVero, Cynthia, Rosita, Hector, Yza, Kikis, Alo, Teo, Miriam y Dante; gracias por ser mi motivación y estar presentes en todo momento. Los quiero.

A mis **compañeras de laboratorio Andrea, Betty, Magda y Martha**, gracias por su amistad y su apoyo en mi estancia por la Narro.

Al **Dr. Alberto Flores Olivas** por haber confiado en mí para realizar este trabajo; por su paciencia y por brindarme su conocimiento.

Al **Dr. Adalberto Benavidez Mendoza, al Dr. Edmundo Rodríguez Campos, al Dr. Gustavo Frías Treviño y al Dr. Daniel Hernandez Castillo** gracias por su tiempo y su apoyo incondicional.

A **Hortencia** por su amistad y su gran ayuda en la realización de este proyecto.

A **Blanquita Mares** por su amistad, y su ayuda en el laboratorio.

A **Leticia Portos Gaona** por su ayuda en el laboratorio de Microscopía.

A **Hermila, Julia y Erika** del laboratorio de Horticultura, gracias por su amistad y su inmensa ayuda en el uso del HPLC.

Al **Dr. Cristóbal N. Aguilar** por su amistad, ayuda y apoyo en este proyecto.

Al **CINVESTAV Irapuato** por su ayuda en la determinación de afinina.

A **Lorena Chávez, Simón Guzmán, José Luis Santillán y Jorge Ramírez** de la Unidad de Microarreglos de la UNAM por la realización del análisis de Microarreglos.

COMPENDIO

**RESPUESTA DE DEFENSA RELACIONADA CON LA APLICACIÓN DEL
EXTRACTO DE *Heliopsis longipes* SOBRE EL PATOSISTEMA TOMATE-*Fusarium
oxysporum f. sp. Lycopersici*.**

POR

SUSANA GONZÁLEZ MORALES

**DOCTOR EN CIENCIAS
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO BUENAVISTA,
SALTILLO, COAHUILA, OCTUBRE DE 2011**

Dr. Alberto Flores Olivas. Asesor

Palabras Clave: Resistencia sistémica en plantas, elicitor, cultivo de tomate, afinina.

Al igual que otros organismos, las plantas se encuentran sometidas al ataque de numerosos y diferentes microorganismos patógenos, que incluyen nematodos, virus, bacterias y hongos. Tanto las partes aéreas como las subterráneas están en continuo contacto con potenciales agentes patógenos. Por ello, no nos sorprenden las pérdidas causadas por las plagas en cosechas y cultivos. En el medio natural cada planta suele ser atacada por varios cientos o miles de individuos de un mismo tipo de patógeno. A pesar de que estas plantas resultan en menor o mayor grado dañadas, muchas de ellas sobreviven a estos ataques y algunas de ellas continúan desarrollándose y multiplicándose, exceptuando la posibilidad de desplazamiento, que les permitiría buscar ambientes más favorables. Las plantas difieren de los animales en dos aspectos que determinan profundamente las estrategias a seguir para defenderse de los patógenos. En primer lugar, las plantas carecen de un sistema inmunológico, de forma que no existen células especializadas para defender el organismo, cada célula individual debe tener la capacidad de responder al ataque del patógeno. En segundo lugar, las plantas pueden perder porciones considerables de su estructura sin que ello traiga consigo problemas de supervivencia, pudiendo inducir la muerte de órganos invadidos por el patógeno para evitar la propagación de este al resto de la planta, y este mecanismo de defensa es el más utilizado por las plantas para defenderse frente a los organismos patógenos. El proceso de interacción entre huésped y patógeno es un proceso dinámico en el que ambos intervienen. Cada patógeno ha evolucionado de una forma distinta en cuanto al modo en que invade a su planta huésped, y la existencia de distintas

barreras de defensa en la planta junto con las condiciones ambientales presentes en un determinado momento, condicionan el éxito del patógeno en cuanto a su colonización y proliferación en el huésped.

INDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Cultivo del tomate.....	4
Importancia económica y distribución geográfica.....	4
Posición taxonómica.....	5
Plagas del cultivo del tomate.....	6
Enfermedades del cultivo del tomate.....	6
Marchitez vascular del cultivo del cultivo de tomate.....	7
Clasificación taxonómica y características morfológicas de <i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>	10
Manejo de la enfermedad.....	11
Alternativas de manejo de enfermedades.....	14
Inducción de resistencia en plantas.....	16
Resistencia sistémica inducida y Resistencia sistémica adquirida.....	17
Defensa en plantas.....	22
Defensa estructural.....	22
Defensa metabólica o bioquímica.....	32
Expresión diferencial de genes.....	41
Control de genes en eucariotas.....	46
Silenciamiento genético en plantas.....	57
Sustancias utilizadas para inducir resistencia en plantas.....	58
Uso de extractos botánicos para el control de plagas en plantas.....	64

ARTICULO CIENTÍFICO I: Actividad inhibitoria del extracto de <i>Heliopsis longipes</i> sobre <i>Fusarium oxysporum f. sp lycopersici</i>	71
ARTICULO CIENTÍFICO II: Respuesta de defensa estructural del extracto de <i>Heliopsis longipes</i> sobre el patosistema: tomate – <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	89
ARTICULO CIENTÍFICO III: Expresion diferencial de genes y metabolitos relacionados a la inducción de defensa relacionada a la aplicación del extracto de <i>Heliopsis longipes</i> sobre el patosistema tomate- <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	112
CONCLUSIONES GENERALES	150
LITERATURA CITADA	151

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Clasificación de proteínas PR.....	34
---	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Planta de tomate.....	4
Figura 2: Macroconidias y clamidiosporas de <i>F. oxysporum</i>	8
Figura 3: Síntomas de marchitez por <i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>	9
Figura 4: Macroconidias e hifas de <i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>	11
Figura 5: Estructura típica de un ARNm eucariótico.....	54

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es una hortaliza con importancia a nivel nacional e internacional debido a su alta demanda, con mercado para consumo en fresco o industrializado (Rodríguez, 2006). La FAO en sus registros ubica a china como el principal país productor de jitomate con 35 millones de toneladas. México ocupa el décimo lugar con producción de 3 millones de toneladas anuales (FAOSTAT, 2006) El tomate es la principal hortaliza cultivada en todo el mundo tanto a cielo abierto como en invernadero (Flores *et al.*, 2007).

El tomate es una de las especies hortícolas más importantes de nuestro país debido al valor de su producción y a la demanda de mano de obra que genera. Es el principal producto hortícola de exportación, ya que representa el 37% del valor total de las exportaciones de legumbres y hortalizas y el 16% del valor total de las exportaciones agropecuarias (Flores *et al.*, 2007).

En México el 80% de la producción de tomate se realiza a cielo abierto, lo que expone al cultivo a una diversidad de patógenos que se encuentran en el suelo y que podrían mermar la producción (Echavarría y Castro, 2002). La Marchitez Vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* que ha evolucionado a razas 1, 2 y 3 (Tello *et al.*, 1988), destaca como una de las principales limitantes debido a su potencial destructivo. Esta enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo causando importantes pérdidas en el cultivo de tomate (Cai *et al.*, 2003). Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad llegan a ser del 60% del rendimiento, además de mermar la calidad de los frutos en variedades susceptibles (Ascencio *et al.*, 2008; Agrios, 2001). El primer reporte de F. f. sp. *lycopersici* raza3 en México se realizó en 1996 a partir de unas plantas de tomate colectadas en Sinaloa (Valenzuela *et al.*, 1996).

Una nueva forma de hacer agricultura, vinculada con la producción de alimentos sanos y orientados al mercado de exportación ha venido ganando importancia en la agricultura mundial desde los años 80; esta es la agricultura orgánica, ecológica o biológica, la cual se define como un sistema de producción que utiliza insumos naturales a través de prácticas especiales, como composta, abonos verdes, control biológico, repelentes naturales a base de plantas, asociación y rotación de cultivos entre otros más, este tipo de agricultura excluye insumos de síntesis química (Gómez *et al.*, 2006).

Existen numerosos reportes relacionados con los mecanismos de resistencia de plantas a patógenos. Ellos indican diversas estrategias desarrolladas por la planta que consisten en defensa física o estructural y defensa química. La defensa química involucra la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Una de las principales rutas de biosíntesis de Metabolitos Secundarios, es la de los fenilpropanoides; a través de ella se sintetizan compuestos con diversas funciones en plantas. Los compuestos fenólicos se forman en esta ruta metabólica y una de las funciones que desempeñan es la de proteger a las plantas contra hongos, bacterias y virus (Vermerris y Nicholson, 2006; Vincenzo *et al.*, 2006).

Por lo anterior descrito, en el presente estudio se pretende establecer si el uso del extracto crudo de *Heliopsis longipes* ofrece ventajas importantes en la inducción de resistencia sobre el Patosistema: Tomate – *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de la expresión de resistencia sistémica en el patosistema tomate-FOL con la aplicación del extracto crudo de *Heliopsis longipes*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluación del desarrollo de la enfermedad en el patosistema tomate-FOL con la aplicación del extracto crudo de *H. longipes*.
- 2) Evaluación de cambios estructurales y bioquímicos como respuesta a la aplicación del extracto crudo de *H. longipes* en el patosistema tomate-FOL.
- 3) Análisis diferencial de la expresión genética en presencia del extracto de *H. longipes* en el patosistema tomate-FOL.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cultivo del Tomate

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es una planta nativa de América tropical, cuyo origen se localiza en la región de los andes (Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú y México), e introducido a Europa en el siglo XVI; al principio, fue cultivado como planta de ornato. A partir de 1900, se extendió el cultivo como alimento humano y actualmente ocupa un lugar importante entre las hortalizas en el mundo. Además es una importante materia prima para la industria de transformación (FAO, 2002).



Figura 1: Planta de tomate

Importancia Económica y Distribución Geográfica

El tomate cultivado es considerado como una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, por el gran número de productos que se obtienen. Mundialmente ocupa el segundo lugar en importancia entre las hortalizas debido a su nivel de producción, la cual es superada solamente por el cultivo de la papa (SAGARPA, 2005). En México, el

tomate cultivado está considerado como la segunda especie hortícola más importante, debido a la superficie sembrada, y como la hortaliza de mayor importancia por sus niveles de producción (SAGARPA, 2005). Los principales países productores son: Estados Unidos, Canadá, Grecia, Italia, México, Turquía, Egipto, India y España (Jiménez, 2003). La producción anual mundial creció 9.5% en los últimos cuarenta años, siendo la hortaliza más cultivada. A nivel nacional se siembran alrededor de 81,000 ha donde se obtienen cerca de 2 millones de ton, siendo los principales estados productores: Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Sonora, Nayarit, Morelos y Michoacán; y a menor escala: Jalisco, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo y Puebla (Jiménez, 2003).

El tomate tiene gran importancia mundial por su variedad de usos; consumo en fresco, como ingrediente en jugos, pastas y bebidas, por su valor nutritivo y su alto valor comercial por unidad de superficie cultivada (FAO, 2002).

La producción mundial de tomate es, aproximadamente, de 36, 000,000 ton por año, cultivadas en 1, 8000,000 ha. El área cultivada comprende un 30% del total de las hortalizas. Esta situación justifica el desarrollo de grandes esfuerzos para resolver los problemas que limitan su producción (FAO, 2002).

Posición Taxonómica

Recientemente, se ha propuesto un cambio en la nomenclatura del genero *Lycopersicon esculentum* Mill. Pasa a denominarse *Solanum lycopersicon* L. (Peralta y col., 2005).

Reino.... Metaphyta

División....Magnoliophyta

Clase....Magnoliopsida

Orden....solanales

Familia....solanaceae

Genero....*solanum*

Especie....*lycopersicon*

Plagas del Cultivo de Tomate

Dentro de las plagas más importantes se encuentran: gusano cortador (*Agrotis spp*), grillo (*Acheta domesticus* y *gryllus bimaculatu*), hormiga (*Solenopsis*), pulgones (*Myzus persicae*), arañita roja (*Tetranychus urticae*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), falso medidor (*Trichoplusia ni*), gusano de cuerno (*Manduca sexta*), entre otras. Algunos insectos pueden ser transmisores de virus, por lo que los frutos atacados maduran disparejos. En el lugar del picado se endurece la carne del fruto (Van Haeff, 1995).

Enfermedades del Cultivo de Tomate

Las enfermedades de las plantas son importantes para el hombre debido a que perjudican a las plantas y sus productos. Los marchitamientos vasculares son enfermedades destructivas productivas producidas por diversos agentes etiológicos y se encuentran ampliamente

distribuidos en poblaciones y cultivos de un sin número de especies de plantas (Agris, 2002).

El cultivo del tomate se ve mermado por enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias, nematodos y virus. Dentro de las enfermedades fungosas, sobresalen los hongos que ocasionan marchitez en las plantas; tales como: *Verticillium*, *Fusarium*, *Alternaría solani*, *Phytophthora infestans*, entre otros (Steiner y Doudoroff, 1977; Fravel, 1988; Schippers *et al.*, 1987; Weller, 1988).

Existen diferentes tipos de enfermedades en este cultivo siendo las más importantes las de origen patológico (Mendoza, 1996). La más importante en la actualidad por su impacto y distribución es el marchitamiento vascular o fusariosis (*Fusarium oxysporum f sp. lycopersici*) Snyder and Hansen (*Fol*) (Ramírez, 1998).

Marchitez Vascular del Tomate

El ciclo de la enfermedad ocasionada por *Fusarium oxysporum f sp. lycopersici* se inicia con la presencia del inculo en el suelo o residuos de cosecha del inculo constituido por hifas, esporas o clamidosporas que germinan cuando son activadas por los exudados producidos en las raíces fibrosas del tomate; los tubos germinativos del hongo penetran la epidermis de las raíces directamente o por heridas, pasan a la corteza o a la endodermis, y una vez dentro del hospedante se mueven por colonización de los vasos del xilema produciendo la oclusión del sistema vascular de la planta. Su disseminación en el campo se produce a través de material de propagación infectado, fragmentos de plantas enfermas y

movimientos de suelo infestado con clamidiosporas de *F. oxysporum* las cuales pueden sobrevivir en este por más de 10 años (Haglund y Kraft, 20001).



Figura 2: Macroconidias y clamidiosporas de *Fusarium oxysporum*

La tasa de velocidad de la infección depende de factores como el tiempo de la infección inicial, la virulencia y condiciones climáticas. Dependiendo de la tasa de velocidad de infección, el hongo puede ocasionar pudrición radicular y muerte, incluso en plantas muy jóvenes (Agrios, 20002).

Esta enfermedad es más agresiva en climas cálidos y suelos con textura arenosa (González, 1974); sin embargo, fuertes afecciones en cultivares susceptibles se han reportado bajo condiciones de invernadero. Los daños se presentan con mayor severidad cuando las plantas son sometidas a un periodo de estrés hídrico, principalmente en la etapa de floración y fructificación (González, 1974; Ramírez, 1998). Los síntomas más notables de *F.oxysporum* f. sp. *lycopersici* ocurren al inicio de la floración, poco después de la formación de los primeros frutos (Beckman, 1987; Mendoza, 1993; Ramírez, 1998).

Síntomas

Los síntomas inician con un amarillamiento en las hojas más viejas, extendiéndose a toda la planta y ocasionando una clorosis que a veces se presenta en las hojas de un solo lado de la planta, y en ocasiones solo en la mitad de estas (Cárdenas, 2000). Las hojas afectadas se marchitan y mueren, aunque pueden permanecer adheridas al tallo. Si se realiza un corte transversal del tallo, se observa una necrosis vascular de color café en forma de anillo, la cual se extiende hacia la parte apical de la planta de acuerdo con la severidad de la enfermedad, marchitando y matando a las plántulas o plantas adultas (Sánchez, 1998). Las plantas más viejas pueden marchitarse y morir repentinamente; sin embargo, comúnmente muestran achaparramiento, epinastia, amarillamiento de las hojas inferiores, marchitez de las hojas y tallo jóvenes, defoliación, necrosis marginal de hojas y finalmente la muerte de la planta (Sanchez,1998). Cuando las raíces y los tallos son colonizados, los síntomas se muestran como una pudrición necrótica, particularmente sobre las raíces laterales más pequeñas; lo cual acelera el marchitamiento del follaje. Después que la planta muere, el hongo fructifica sobre la superficie del tallo bajo condiciones de ambiente húmedo (Angulo, 1996; Valdez, 1999).



Figura 3: Síntomas de marchitez por *F. oxysporum f. sp. lycopersici*

Clasificación taxonómica y características morfológicas de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

F. oxysporum pertenece a la clase Sordariomycetes, Orden hipocreales, Familia Nectriaceae (Nelson *et al.*, 1993). Es un hongo imperfecto, que aparentemente ha perdido el estado perfecto o sexual. Estos se reproducen por medio de conidias (una espora asexual formada en el extremo de una hifa). El hongo sobrevive por largos periodos en el suelo en forma de clamidosporas. El micelio es generalmente aéreo, abundante, algodonoso, con diferentes coloraciones como blancas, durazno, salmón, pero usualmente con un tinte purpura o violeta más intenso.

El hongo se caracteriza por producir tres clases de esporas, una de ellas son las microconidias, que son esporas unicelulares, septadas, hialinas, de forma variable, formadas sobre fialides laterales o sobre conidióforos poco ramificados. Las microconidias tienen entre 5-12 micras de largo x 2.5-3.5 micras de ancho (Nelson, 1981). Las macroconidias son de pared delgada, fusiformes, largas y moderadamente curvas en forma de hoz, poseen de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada. Tiene un tamaño de 27-60 x 3-5 micras (Nelson, 1981).

Las clamidosporas son globosas, de doble pared gruesa, se encuentran solitarias o en pares, formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y las conidias. Con esta estructura el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en ausencia de plantas hospedantes. Su tamaño varía de 5-15 micras de diámetro (Summerell *et al.*, 2002; Barrera y Gómez, 1995; Nelson, 1981).

Esta especie se caracteriza por producir distintas formas especiales, las cuales no se pueden diferenciar por su morfología o por las características culturales de las colonias, sin embargo, son fisiológicamente diferentes por su capacidad de parasitar y ocasionar enfermedades en plantas hospedantes y sus exudados radicales satisfacen los requerimientos nutricionales del hongo y por lo tanto, puede desarrollarse solo en este tipo de plantas (Nelson, 1981; Gordon y Martyn, 1997).



Figura 4: Macroconidias e hifas de *F. oxysporum f. sp. lycopersici*

Manejo de la Enfermedad

Control cultural

En suelos arenosos evitar encharcamientos para impedir el traslado de nematodos ya que las heridas que generan éstos en las raíces facilitan el ingreso de la enfermedad. También las plantas enfermas deben eliminarse lo más pronto posible a efectos de reducir el inóculo (Gonzales, 2006).

Teniendo en cuenta que este patógeno es más severo en condiciones de suelos ácidos, se recomienda la aplicación de cal agrícola o cal hidratada para aumentar el pH. Medios o

sustratos de crecimiento que poseen un pH alto tienden a mantener niveles más altos de nutrientes, mayores poblaciones de microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetos) y menor severidad de marchitamiento por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. La severidad de la enfermedad se ha reducido cuando se han aplicado fertilizantes nitrogenados con base en nitratos, y ha aumentado con fertilizantes nitrogenados con base en amonio. El riego con aguas salinas y la fertilización con sulfato de amonio predisponen la planta al ataque por el hongo (FAO, 2003).

Es de vital importancia para el control de la enfermedad seleccionar muy bien el semillero y sembrar plántulas sanas en campo. (FAO, 2003.)

Control químico

El uso de agroquímicos como el bromuro de metilo, metam sodio y metam potasio han sido utilizados como estrategias para el control de fitopatógenos por su amplio espectro contra patógenos del suelo (Ohr *et al.*, 1996) estos productos son empleados en las principales zonas productoras de jitomate para el control de *Fusarium oxysporum*.

Variedades resistentes

Gonzales en el (2006), afirma que la utilización de variedades resistentes es la medida más adecuada para el manejo de *F. oxysporum*. En el mercado existen variedades con resistencia a las razas 1 y 2 y en menor proporción a la raza 3. Báez *et al*, 2010 mencionan

que patrones o portainjertos pueden ser usados como una alternativa viable de control de patógenos radiculares y en este caso especial sobre la marchitez causada por *F. oxysporum*.

Control biorracional

Marcos en 1996, menciona que el uso de extractos vegetales acuosos de *C. ambrosioides* y de *N. Glauca* son muy efectivos para el control de *F. oxysporum* inclusive sobre el tratamiento químico Metalaxil.

Garduño en el (2009) obtuvo como resultado que 12 especies vegetales mostraron actividad antifúngica ante *F. oxysporum*. El extracto hexánico con *C. ambrosioides* (por su actividad fungicida), los extractos metanólicos con *S. purpurea* y *P. guayaba*, así como los extractos acuosos con *L. esculenta* y *G. ulmifolia* inhibieron el crecimiento micelial con un porcentaje superior al 50%. También, los polvos de *B. crassifolia* disminuyeron el porcentaje de germinación y esporulación. Todas las especies presentaron actividad antifúngica en forma de extracto metanólico. La alta diversidad química de las especies vegetales analizadas, afectó diferencialmente el desarrollo del hongo, ya sea por los compuestos individuales o por sinergismo de algunos de ellos.

Rodríguez –Montilla (2002) demuestran que realizando una inmersión de raíces de plantas en solución del extracto *Citrus paradisi* más la aplicación semanal al suelo logra reducir la marchitez en un 85%, seguido por la aplicación combinada al suelo y al follaje con un 64% de reducción. La aplicación del extracto de *C. paradisi* al follaje o al suelo ocasionan una reducción del 42% comparado con el testigo. Los resultados indican la posibilidad de controlar patógenos del suelo con el uso del extracto de semilla de *C. paradisi*.

Control biológico

La siembra de semillas pregerminadas con suspensiones del hongo *Trichoderma koningii*, c y de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* al suelo de los semilleros, posibilitan un adecuado control de *Fusarium oxysporum* (FAO, 2003).

La pre inoculación de plantas de tomate siete días antes del trasplante con *Penicillium oxalicum* reduce la severidad de la enfermedad. La aplicación de las bacterias *Serratia plymuthica* y *Pseudomonas* sp. a las semillas, también ha permitido una disminución de la incidencia y severidad de la marchitez por *Fusarium oxysporum*. (FAO, 2003).

Mojica *et al* 2009 encontraron que de 64 cepas de *B. thuringiensis* probadas solo ocho cepas mostraron un efecto inhibitorio contra *F. oxysporum*. De estas solo cinco inhibieron más del 30% del crecimiento y una reducción en la tasa de crecimiento de 0,52 a 0,10 cm/día.

Alternativas de Manejo de Enfermedades

En la agricultura moderna, se ha hecho a un lado la sostenibilidad de la productividad agrícola. El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos substanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sustentabilidad de la agricultura. La práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos han reducido la biodiversidad de los agroecosistemas, causando la inestabilidad de los mismos, la cual se manifiesta, entre otros efectos nocivos,

en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos. Esto y los problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas de manejo de plagas y enfermedades. Así, surge el interés por el control ecológico que puede definirse como: “cualquier forma de control que reduce la incidencia o severidad de la enfermedad, o incrementa la producción del cultivo, aun cuando no haya aparentemente un efecto significativo en la reducción de la enfermedad o inóculo, y su impacto nocivo en el ambiente sea mínimo o nulo” (Zavaleta-Mejía, 1994).

Para que el manejo de las enfermedades de nuestros cultivos sea ambientalmente sano y racional se podrá lograr primero, aceptando que nuestro objetivo principal no debe de ser el de eliminar al patógeno responsable de la enfermedad sino más bien que a pesar de su presencia logremos obtener rendimientos económicamente redituables para el agricultor; y segundo, entendiendo más acerca de la naturaleza de la enfermedad y de la fisiología de la planta.

El uso de variedades resistentes; fechas de siembra; la solarización y acolchado (arropamiento) del suelo mediante el uso de plásticos degradables; la rotación y asociación de cultivos, preferentemente al utilizar plantas con propiedades antagonistas; la incorporación al suelo de residuos de plantas que durante su descomposición liberan compuestos nocivos a los fitopatógenos con origen en el suelo; la incorporación al suelo de materia orgánica que favorece la actividad antagónica de la biota habitante del suelo; la aplicación de organismos antagonistas; la aplicación de cubiertas epidermales (antitranspirantes) para proteger a los cultivos de algunas enfermedades foliares; y la

fitomineraloterapia, son alternativas ecológicas cuya eficacia ha sido probada desde el punto de vista práctico y económico (Agrios, 2005).

Inducción de Resistencia en Plantas

Una de las alternativas utilizadas en la protección de las plantas es el método de la inducción de resistencia. Este método está basado no en la supresión directa del patógeno como ocurre con la aplicación de plaguicidas, si no, que se basa en la estimulación de mecanismos naturales de defensa en los tejidos de las plantas. La inducción de resistencia es frecuentemente referida como: inmunización, sensibilidad, vacunación, inmunidad adquirida y algunas veces como protección cruzada. En principio todos estos términos denotan algún fenómeno que es una activación artificial de los mecanismos de defensa de las plantas en el curso de su ontogénesis. Se conocen dos tipos de inducción de resistencia: local y sistémica; la resistencia inducida local se desarrolla dentro de un área limitado de tejidos de la planta, por ejemplo en el sitio de inducción. La inducción de resistencia sistémica se desarrolla en los tejidos de la planta más allá del sitio de inducción (Ozeretskoyanskaya 1995).

Algunos supuestos de la inducción de resistencia discutidas por Sequeira citado por Mishaghi (1982), son las siguientes:

- 1.- La inducción de resistencia depende de factores ambientales como luz y temperatura.
- 2.- La inducción de resistencia no es inmediata y requiere de un intervalo de tiempo entre la inoculación inicial y el cambio.
- 3.- En algunos sistemas planta-patógeno la inducción de resistencia es sistémica, esto es que se disemina a toda la planta desde el sitio de inoculación inicial.

4.- A la resistencia inducida le falta especificidad con respecto a lo que induce y al cambio.

5.- En algunos casos la protección adquirida (resistencia) no ha sido duradera, por ejemplo, la resistencia sistémica inducida por inoculaciones de TMV en variedades de tabaco que son hipersensibles al virus, duro cerca de 20 días.

6.-La persistencia de la protección sistémica inducida por hongos depende de la sobrevivencia del inóculo inicial.

Resistencia sistémica inducida y Resistencia sistémica adquirida

La resistencia inducida es un “estado fisiológico” de incremento de la capacidad defensiva de la planta producida como respuesta a estímulos medioambientales específicos, por medio de los cuales las defensas innatas de esta son potencializadas en contra de diversos patógenos.

La Resistencia sistémica inducida (RSI) fue descubierta a comienzos del siglo pasado, en 1901, con los ensayos de "inmunización" realizados separadamente por Ray y Beauverie (Beauverie 1901). La Resistencia sistémica adquirida (RSA) fue descrita por primera vez por Ross en 1961 en estudios de resistencia inducida al TMV en el tabaco. Ambos RSI y RSA son mecanismos naturales de defensa, considerados términos sinónimos para un importante grupo de investigadores en este campo. No obstante, otros científicos consideran que la RSI ocurre cuando los mecanismos de defensa en la planta son estimulados y actúan para resistir la infección causada por el patógeno. Esta activación de RSI se da por la proximidad de microorganismos estrechamente relacionados o en asociación con el tejido de la planta. Mientras que, en el caso de la RSA en el momento en que se da una infección localizada y la mediación activa de un inductor hace que las células del

hospedante enciendan el ciclo de SAM (adenosin-metionina) por una cadena de genes que desencadenan uno o varios mecanismos de defensa contra ese patógeno en particular o inespecífico, contra otros potenciales agresores. La inducción de RSA produce una señal sistémica, entiéndase la protección espacial de diferentes órganos de la misma planta, en un amplio espectro y duración, donde la HR y varias familias de genes de PR son inducidos como mecanismos asociados, determinantes de la respuesta de defensa (Ryals *et al.*, 1996). La RSA es dependiente de la vía del ácido salicílico y la RSI depende de la vía del etileno y del ácido jasmónico (Walters *et al.*, 2007). La RSA resulta de la aplicación exógena de diferentes sustancias activadoras, tales como: el ácido salicílico (AS) sus derivados y sus análogos funcionales como el BTH, el ácido nicotínico derivado del 2,6-dicloroisonicotínico ácido, el acibenzolar-S-metil comercializado como Actigard™ o BION™, el cual fue el primer químico sintético desarrollado que funciona estrictamente como activador de RSA (Ruess *et al.*, 1996).

Resistencia sistémica inducida (RSI)

Otro tipo de resistencia sistémica inducida se desarrolla a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos de la rizosfera, particularmente rizobacterias. Este tipo de resistencia es conocida como *resistencia sistémica inducida* (RSI) y se caracteriza por estar mediada por vías metabólicas sensibles al ácido jasmonico y al etileno y ser independiente de la expresión de los genes PR y del ácido salicílico (Pieterse y Van Loon 1999).

La RSI está basada en una rápida e intensa respuesta de la planta a una subsecuente infección, que resulta de una rápida expansión de genes de defensa. Específicamente, el

promedio e intensidad de necrosis de células de papa y la producción de fitoalexinas en respuesta a la infección con *Phytophthora infestans* son esencialmente altas en tubérculos de papa inducidos sistémicamente por promotores biogénicos comparados con el control (Ozeretskovskaya *et al* 1986).

Las bacterias PGPR mejor caracterizada son las cepas de varias especies de *Pseudomonas* que no causan daños visibles en el sistema de raíces de las plantas. RSI no causa la acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis ni ácido salicílico, sino que se utilizan las vías reguladas por el ácido jasmonico y el etileno (Valland y Goodman, 2004).

Las interacciones entre plantas y patógenos puede conducir a una infección con éxito (respuesta compatible) o resistencia (respuesta incompatibles). En las interacciones incompatibles, la infección por virus, bacterias u hongos que provocan una serie de respuestas localizadas en y alrededor de las células huésped infectadas. Estas respuestas incluyen una explosión oxidativa que puede conducir a la muerte celular (Kombrink y Schmelzer, 2001). Por lo tanto, el patógeno puede ser "atrapado" en las células muertas y parece ser impedida la propagación de la localización de la infección inicial. Además las respuestas locales en las células circundantes incluyen cambios en la composición de las células de la pared que pueden inhibir la penetración por el patógeno, y la síntesis *de novo* de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas (Kuc, 1995; Hammerschmidt, 1999)

Las fitoalexinas son principalmente una característica de la respuesta local, las proteínas PR se producen tanto a nivel local y sistémica. Originalmente, las proteínas PR se detectaron y

se definen como ausentes en las plantas sanas, pero se acumula en grandes cantidades después de la infección (Van Loon y van Kammen, 1970).

Resistencia sistémica adquirida (RSA)

Se ha observado que el primer patógeno infectante, “inmuniza” a la planta contra infecciones posteriores por patógenos homólogos, aun cuando la planta no lleve genes determinantes de la resistencia específica del cultivar. Obviamente, el primer patógeno infectante, “indujo” la expresión de reacciones de resistencia contra subsecuentes infecciones de patógenos, independientemente si son virus, hongos o bacterias. Esta capacidad de las células para repeler los ataques subsecuentes, se dispersa a través de toda la planta. A esta respuesta se le llama resistencia sistémica adquirida (RSA) (Moffat, 1992).

Dos características de RSA son: (1) es efectiva contra un amplio espectro de diferentes patógenos y (2) es a largo plazo. El espectro de patógenos puede variar dependiendo de la planta tratada (Moffat, 1992). La fuerza y estabilidad de la resistencia inducida durante varias semanas pueden ser influenciadas por factores como las condiciones climáticas y la nutrición. La observación de que RSA se dispersa en la planta principalmente en dirección apical, y se mueve hacia yemas injertadas, sugiere fuertemente que las señales que establecen RSA son traslocadas a través de la planta.

Un requerimiento esencial para la resistencia sistémica adquirida es que la primera infección por un patógeno cause una lesión necrótica. La necrosis inducida puede ser el resultado de la muerte celular programada después del reconocimiento del patógeno en una interacción incompatible-donde se produjo una respuesta hipersensitiva (RH)- o de la

muerte celular causada por la acción del patógeno en una interacción compatible. La secuencia de eventos que permiten la respuesta sistémica comienza localmente; es decir, en las células adyacentes a la respuesta hipersensitiva se observa el engrosamiento de las paredes celulares por incorporación de proteínas estructurales o lignina, deposición de calosa y la inducción de la síntesis de fitoalexinas.

En las células más distantes o sea las partes no infectadas de la planta, las primeras reacciones de defensa tipo RSA son la síntesis de proteínas relacionadas a la protogenesis llamadas PR, las enzimas β -1,3 glucanasas, endohidrolasas, quitinasas, inhibidores de enzimas como la taumatina, inhibidores de amilasa y proteinasas. Los genes que son inducidos en las infecciones primarias por el patógeno, se expresan localmente y también sistémicamente en la planta por lo tanto son llamados genes RSA. Otros genes que también gobiernan las reacciones de defensa no son expresados sistémicamente (Sha y Klessig, 1996).

Se identificaron las señales intracelulares y sustancias reguladoras involucradas en la activación de un gen llamado *pin* que codifica el inhibidor de proteínas. Entre las señales de activación o sustancias reguladoras se encontraron al etileno; ácido jasmonico y el metil éster de ácido jasmonico que es volátil y es liberado de la membrana plasmática por enzimas lipasas; ácido abscisico; y sistemina que es un polipeptido de 18 aminoácidos (Farmer y Ryan, 1990). Todas estas sustancias pueden ser mensajeros secundarios dentro de una cadena de transducción de señales que efectúan la activación de las reacciones de defensa, o están involucradas en la transducción de señales de manera desconocida.

Defensa en plantas

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas pueden poseer *mecanismos constitutivos* de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa *estructurales constitutivos*, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa *químicos constitutivos*, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales (*Hutcheson 1998*).

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como *resistencia inducida*, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (*Collinge et al. 1994*). La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (*Hutcheson 1998*).

Defensa estructural

La primera línea de defensa de las plantas ante el ataque de los patógenos es su superficie, la cual estos últimos deben penetrar para causar infección. Algunas defensas estructurales se encuentran ya en las plantas incluso antes de que el patógeno entre en contacto con ellas. Esas estructuras incluyen la cantidad y la calidad de la cera y de la cutícula que cubren a las

células epidérmicas, la estructura de las paredes celulares de estas últimas, el tamaño, localización y forma de los estomas y lenticelas y, por último, la presencia en la planta de tejidos protegidos por paredes celulares gruesas que obstaculizan el avance del patógeno.

Las ceras de las hojas y de la superficie de los frutos forman una superficie repelente al agua que impide que sobre los tejidos se forme una película de agua en la cual los patógenos pudieran depositarse y germinar (hongos) o bien reproducirse (bacterias). De hecho, una cubierta gruesa de estructuras pilosas sobre la superficie de los órganos de una planta, puede también ejercer un efecto semejante al mencionado y con ello disminuir la infección.

El grosor de la cutícula aumenta la resistencia a las infecciones en las enfermedades en las cuales el patógeno penetra en su hospedante sólo mediante penetración directa. Sin embargo, el grosor de la cutícula no siempre está relacionado con el factor resistencia, y muchas variedades vegetales que presentan una cutícula de grosor considerable son fácilmente invadidas por patógenos que penetran en forma directa.

El grosor y dureza de la pared externa de las células epidérmicas, al parecer son factores importantes en la resistencia de algunas plantas ante el ataque de ciertos patógenos.

Las paredes gruesas y firmes de las células epidérmicas hacen que la penetración directa de los hongos patógenos sea difícil o imposible. Las plantas con ese tipo de pared celular con frecuencia son resistentes, pero en caso de que el patógeno llegue más allá de la epidermis de esas plantas a través de una herida, sus tejidos internos son fácilmente invadidos por el

patógeno. Muchas de las bacterias y hongos patógenos entran en las plantas sólo a través de sus estomas. Aun cuando la mayoría de ellos penetran en las plantas a través de sus estomas cerrados, algunos de ellos como la roya del tallo del trigo, pueden penetrar en las plantas sólo cuando sus estomas están abiertos. Debido a esto, algunas variedades de trigo (en las que los estomas se abren al atardecer), son resistentes debido a que los tubos germinativos de las esporas que germinan durante la noche desecan el rocío, lo cual hace que éste se evapore antes de que los estomas se abran. El tipo de estructura de los estomas, por ejemplo, la presencia de un orificio bastante estrecho y de amplias células oclusivas pronunciadas, puede conferir también una cierta resistencia a ciertas variedades contra el ataque de algunos patógenos.

El grosor y la dureza de la pared celular de los tejidos que son invadidos varía y pueden en ocasiones dificultar de manera notable el avance del patógeno. En particular, la presencia de haces o de amplias zonas de células esclerenquimatosas, como los que se encuentran en los tallos de muchos cereales, detiene la propagación de patógenos tales como las royas del tallo.

De la misma forma, el xilema, el parénquima limítrofe y las células esclerenquimatosas de las nervaduras de la hoja bloquean eficazmente la propagación de algunas bacterias, hongos y nematodos que producen las distintas manchas foliares "angulares" debido a que su avance es sólo en las zonas comprendidas entre las nervaduras de la hoja y no a través de ellas.

Aunque algunos patógenos se ven imposibilitados de entrar e invadir a las plantas debido a que éstas presentan estructuras de defensa internas o superficiales preformadas, la mayoría de ellos logran penetrar en sus hospedantes y producir diversos grados de infección. Sin embargo, incluso después de que el patógeno ha penetrado las estructuras de defensa

preformadas, las plantas muestran varios grados de resistencia que consisten en la formación de uno o más tipos de estructuras que tienen más o menos una cierta efectividad para contrarrestar las invasiones posteriores de los patógenos sobre ellas. Algunas de las estructuras de defensa formadas incluyen a los tejidos que impiden el avance del patógeno (hacia el interior de la planta), por lo que se les denomina estructuras histológicas de defensa; otras comprenden las paredes de las células invadidas y se les denomina estructuras celulares de defensa; todavía otras incluyen al citoplasma de las células atacadas y al proceso se le denomina reacción de defensa citoplásmica. Por último, la muerte de las células invadidas puede proteger a la planta de otras invasiones, por lo que se le denomina al proceso reacción necrótica o reacciones de hipersensibilidad (Agrios, 2005).

Las barreras estructurales

En muchas plantas se ha observado de manera contundente que las paredes celulares se lignifican después de la infección por hongos, bacterias, virus y nematodos. Esta lignificación de las paredes celulares es uno de los mecanismos importantes de resistencia (Carver *et al.*, 1994; Mauch-maní y Slusarenko, 1996; Morschbacher *et al.*, 1990). La lignina se forma por polimerización y deshidratación de precursores producidos en la vía metabólica de fenilpropanoides (Vance *et al.*, 1980). El primer paso en esta vía es la desaminación de fenilalanina a ácido cinámico catalizado por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). PAL suministra los precursores de lignina y para varios productos secundarios derivados de fenilpropanoides involucrados en la resistencia. Son ejemplos las fitoalexinas furanocumarina y isoflavonoides en perejil y leguminosas, respectivamente, así como al ácido salicílico (AS) (Ward *et al.*, 1991).

Aunque se sabe poco de su papel en RSA, la lignificación puede contribuir a la resistencia de diferentes maneras. La incorporación de lignina en la pared celular la fortalece mecánicamente y la hace más resistente a la degradación por enzimas secretadas por un invasor. Fortificar la pared celular puede aumentar la resistencia de varias maneras. Para los biotrofos extracelulares como *Pseudomonas syringae* sellar la pared puede impedir el lixivio de contenidos del citoplasma, reduciendo la disponibilidad de nutrientes para los patógenos. Para los necrotrofos como *Botrytis cinerea* que hidroliza la pared celular durante el crecimiento de la hifa, se retrasa la dilución de toxinas y enzimas en las células sensibles. Un tipo de fortificación de la pared celular que ocurre rápidamente en respuesta a la invasión de hongos es la formación de papilas que son heterogéneas en composición y se considera que bloquean físicamente la penetración del hongo. Las papilas de hojas de trigo inoculadas con *Botrytis cinérea* son altamente resistentes a la degradación *in vitro* por varias especies de hongos (Ride, 1980). En mono y dicotiledóneas es bien conocida la formación de aposiciones (papilas) en el sitio de intento de penetración como un medio para restringir la penetración de hongos en las células de la epidermis (Aist, 1976).

Después de la infección, la enzima peroxidasa también puede fortalecer la pared celular realizando uniones cruzadas de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Bradley *et al.*, 1992). Todas estas alteraciones en la estructura de la pared celular después de la infección puede contribuir a la resistencia, ya sea deteniendo el ingreso del patógeno directamente o disminuyendo el proceso de penetración, permitiendo que la planta active después los mecanismos de defensa. Se ha propuesto que la polimerización de los precursores de lignina por radicales libres en el espacio intracelular también puede permitir la lignificación de estructuras del patógeno. Hammerschmidt y Kuc, (1982) demostraron que el micelio de

Colletotrichum lagenarium y *Cladosporium cucumerinum* se lignifica *in vitro* en presencia de alcohol coniferilo H₂O₂ y una preparación cruda de peroxidasas de plantas inmunizadas.

Estructuras celulares de defensa

Las estructuras celulares de defensa incluyen cambios morfológicos en la pared celular o cambios derivados de ella cuando la célula es invadida por el patógeno. Sin embargo, la efectividad de estas estructuras como mecanismos de defensa es limitada. Tres tipos principales de estas estructuras se han observado en las enfermedades de las plantas: a) La capa externa de la pared celular de las células parenquimatosas que entra en contacto con grupos de bacterias incompatibles se hincha, y este hinchamiento va acompañado de la producción de material fibrilar amorfo que rodea y atrapa a las bacterias y evita que se multipliquen; b) engrosamiento de las paredes celulares en respuesta a algunos virus y hongos patógenos, como es el caso de la respuesta de una lesión local a las infecciones virales y la respuesta del pepino al hongo de la sarna, *Cladosporium cucumerinum*. El material de engrosamiento parece ser de naturaleza celulósica, pero suele estar saturado de sustancias fenólicas que aumentan aún más su resistencia a la penetración; c) depósitos de calosa, papilas, en la superficie interna de las paredes celulares en respuesta a la invasión por hongos patógenos. Al parecer las células producen estas papilas al cabo de algunos minutos después de haber sido lesionadas y al cabo de 2 a 3 horas después de haber sido inoculadas con los microorganismos. Aunque la función principal de las papilas al parecer es reparar el daño celular, a veces en particular si las papilas están presentes antes de la inoculación parecen evitar también que el patógeno entre subsecuentemente en la célula. En algunos casos, las puntas de las hifas de los hongos que penetran una pared celular y crecen

hacia el lumen celular son rodeadas por materiales celulósicos (de calosa) que después se saturan de sustancias fenólicas y forman una vaina o en torno a la hifa (Devoto, 2002).

Córtex

La corteza (córtex), el sistema fundamental forma una zona bien diferenciada, está situada entre la epidermis y el cilindro vascular o central. Presenta parénquima clorofiliano, grandes espacios intercelulares. La parte periférica presenta colénquima (Dicotiledónea) o esclerénquima (Monocotiledónea) o fibras formando anillos o bandas.

Los tallos de Gimnospermas y Angiospermas carecen generalmente de una endodermis (capa más interna de la corteza) no está diferenciada y puede contener abundantes granos de almidón se conoce entonces como vaina amilífera. Esta vaina en las Gimnospermas por lo general no se encuentra.

La corteza presenta un parénquima a menudo clorofílico. Los espacios intercelulares son prominentes, pero no tanto como en la corteza primaria de la raíz.

En muchas Angiospermas acuáticas, la corteza se desarrolla como un parénquima con un sistema de grandes espacios intercelulares.

La parte periférica de la corteza generalmente presenta un colénquima dispuesto en cordones o en una capa más o menos continua. Es menos frecuente encontrar esclerénquima como tejido de sostén primario en la región externa de la corteza del tallo Gonzalez *et al.*, (2007).

Médula

Es el tejido parenquimático colocado en el centro del tallo y rodeado de tejido vascular. Sus células en ocasiones contienen cloroplastos y es frecuente que tengan leucoplastos que forman almidón; además, pueden depositarse tanino y cristales, y contener células de sostén como fibras o escleridas. Su origen es del meristemo fundamental (Gonzales *et al.*, 2007).

Haces vasculares

Los tejidos vasculares primarios se forman a partir del procámbium. En el tallo de las plantas vasculares el xilema y el floema primarios se presentan asociados formando cordones denominados haces vasculares. Tanto el xilema como el floema constan de dos partes que se desarrollan una después de otra: proto y metaxilema, y proto y metafloema.

El protoxilema está formado por traqueidas anilladas o espiraladas que eventualmente se estiran y destruyen. El metaxilema es más complejo, puede tener vasos reticulados y punteados y fibras; es el único tejido conductor de las plantas que no poseen crecimiento secundario.

El metafloema tiene elementos cribosos con células acompañantes, además de células parenquimáticas. En las plantas sin crecimiento secundario, es el único floema de los órganos adultos (Gonzalez *et al.*, 2007).

Parénquima

Proteínas protectoras.

Las proteínas protectoras pueden ser divididas en dos grandes grupos basados en sus patrones de expresión, aunque hay una considerable sobreposición entre ellas. El primer grupo de proteínas puede ser descrito como constitutivo o tejido-específico, y su expresión no está relacionada a la infección o daño, aunque pueden estar restringidos a órganos, tejidos o tipos de células específicos. Éstos están particularmente diseminados en semillas y otros tejidos de almacenamiento donde su presencia podría estar confiriendo resistencia al daño o infección en pre- y post-cosecha. Sin embargo, también podrían estar en algunos tejidos vegetativos, en gomas y látex.

Las proteínas protectoras constitutivas/tejido-específicas más ampliamente estudiadas son los inhibidores de enzimas hidrolíticas, principalmente de proteasas y amilasas. Estos inhibidores, los cuales están frecuentemente presentes en altas cantidades, actúan como proteínas de reserva (Richardson, 1991). Los inhibidores de enzimas de plantas están clasificados en familias, basados en la secuencia de aminoácidos, estructura y sus especificidades. En el caso de los inhibidores de proteasas, los mejor estudiados han sido los de serín proteasas como tripsina, quimotripsina y subtilisina. Estos incluyen los inhibidores más ampliamente estudiados como son los Bowman- Birk y Kunitz, los cuales constituyen los principales componentes en semillas y leguminosas como la soya. Sin embargo, también se han caracterizado inhibidores de otra clase mecánica de proteasas, como carboxipeptidasas y cisteín proteasas. Estas últimas llamadas cistatinas, han sido analizadas en mayor detalle en arroz y son de particular interés en relación a la protección contra invertebrados plaga. Los inhibidores de α -amilasa han sido también caracterizados, aunque estos pueden ser altamente específicos para enzimas de una particular fuente (por

Es el tejido representativo del sistema fundamental, constituye el relleno en órganos con tejidos primarios como raíces, tallos, hojas frutos carnosos y semillas. En tallos raíces y peciolos forma la corteza y la medula en hojas es el mesofilo; en frutos es la parte carnosa de ellos; en la semilla es el endospermo. Además, se le encuentra en el xilema y floema primarios y secundarios, así como en la felodermis de la peridermis. Su origen es a partir del meristemo fundamental; en el parénquima del xilema y floema secundario es a partir del cambium vascular; en la felodermis su origen es a partir del felógeno. Los órganos con gran cantidad de parénquima son de consistencia blanda (Gonzales *et al.*, 2007).

Engrosamiento de paredes

La respuesta de defensa empieza localmente, es decir en las células adyacentes a la respuesta hipersensitiva se observa el engrosamiento de las paredes celulares por incorporación de proteínas estructurales o lignina. La lignina también se deposita alrededor de toda la pared celular de la planta, en interacciones incompatibles, favoreciendo la resistencia de la planta.

Después de la infección, la enzima peroxidasa también puede fortalecer la pared celular realizando uniones cruzadas de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Bradley *et al.*, 1992). Todas estas alteraciones en la estructura de la pared celular después de la infección puede contribuir a la resistencia, ya sea deteniendo el ingreso del patógeno directamente o disminuyendo el proceso de penetración, permitiendo que la planta active después los mecanismos de defensa. Se ha propuesto que la polimerización de los precursores de lignina por radicales libres en el espacio intracelular también pueden permitir la

lignificación de estructuras del patógeno. *Hammerschmidt y Kuc, (1982)* demostraron que el micelio de *Colletotrichum lagenarium* y *Cladosporium cucumerinum* se lignifica *in vitro* en presencia de alcohol coniferilo, H₂O₂ y una preparación cruda de peroxidasa de plantas inmunizadas.

La lignificación puede ser una característica constitutiva en algunas especies pero también puede ocurrir como un proceso de refuerzo de los tejidos cuando están sujetos a daño físico. La lignificación también se manifiesta durante la defensa a patógenos. La acumulación de lignina en grandes cantidades puede ocurrir de forma localizada en los tejidos atacados por patógenos. La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica; además, la lignina es resistente a la degradación producida por muchos patógenos (*Nicholson y Hammerschmidt 1992*).

La síntesis de lignina, al igual que la síntesis de ciertas fitoalexinas, se deriva del metabolismo de los fenilpropanoides en donde la enzima PAL juega un importante papel regulador.

Otro tipo de engrosamiento de la pared celular es cuando la celulosa interacciona con otras moléculas de celulosa a través de puentes de hidrogeno para formar la fibrilla elemental, micro y microfibrillas. Las hemicelulosas interaccionan a través de puentes de hidrogeno con la celulosa. Las pectinas forman enlaces covalentes entre ellas. La extensina forma enlace covalente con otras extensinas y con las pectinas. Como resultado de todas estas interacciones tenemos una pared que está formada por una malla de extensina que atrapa a

las fibras de celulosa y todo esto suspendido en un gel hidrofílico de pectinas y hemicelulosa.

Papilas de callosas

Otro mecanismo estructural de defensa es la formación de papilas. La papila es una estructura de resistencia que se produce por modificaciones de las células de la epidermis. Las papilas están compuestas principalmente de calosa (b-1,3-glucano) y se asocian a la resistencia porque evitan la penetración de los hongos (Skalamera *et al.* 1997). Depósitos de calosa en la cara interna de la pared celular de la planta, donde se produce la penetración del hongo, formándose una protuberancia. Está compuesta principalmente por calosa, pero puede presentar otras sustancias como lignina, compuestos fenólicos o sílice.

La calosa es un polímero de 1-3-glucano que es poco habitual. La calosa además de aparecer en las papilas puede depositarse de forma más generalizada por toda la pared, pero sólo en aquellas células que el hongo intenta infectar. Las células con calosa son más resistentes.

Defensa metabólica o bioquímica.

Aun cuando las características estructurales proporcionen a las plantas varios grados de defensa contra el ataque de los patógenos, cada vez se hace más evidente que la resistencia de una planta al ataque de un patógeno no estriba tanto en las barreras estructurales sino en las sustancias que producen sus células antes o después de haber producido la infección. Esto lo apoya el hecho que un determinado patógeno no infectará a ciertas variedades de

planta aunque éstas no presenten o formen algún tipo de barrera estructural. Un caso semejante se presenta en las variedades resistentes, en las que la velocidad de desarrollo de la enfermedad decae, y en el último de los casos se anula por completo, aún en ausencia de defensas estructurales. Además, la mayoría de los patógenos que penetran en forma natural en las plantas no hospedantes o los que son inoculados artificialmente en plantas de ese grupo, no producen infección aun cuando al parecer no exista alguna estructura visible que les impida hacerlo. Todos estos ejemplos sugieren que los mecanismos de defensa son de naturaleza química más que estructural, y que a ellos se debe la resistencia a la infección causada por ciertos patógenos que muestran algunas plantas (Agrios, 2005).

Proteínas PR

Cuando un patógeno de origen fúngico invade el tejido de la planta, algunas proteínas nuevas aparecen y se acumulan en el tejido infectado. Estas proteínas son llamadas proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR), ya que aparecen durante la patogénesis (Vidhyasekaran, 2004, 2007). Estas proteínas no solo son inducidas por el ataque de hongos, sino también en el ataque de virus, bacterias, insectos y nematodos. Algunos reguladores de crecimiento como etileno, ácido indolacético y ácido absicico, inducen la formación de proteínas PR (Grilloet al., 1995; Clarke *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 2005). Los elicitores, toxinas y enzimas de los patógenos inducen la producción de proteínas PR (Halim *et al.*, 2004).

Proteínas PR	Plantas en las que han sido detectadas	Función
PR-1	Arroz, trigo, maíz, tomate, tabaco y perejil.	Participa en el engrosamiento de pared celular.
PR-2	Arroz, trigo, maíz, papa, tomate, tabaco, chile, frijol, caña de azúcar y soya.	β -1,3 Glucanasa
PR-3	Arroz, maíz, tomate, chile y caña de azúcar.	Quitinasa
PR-4	Tabaco y tomate.	Quitinasa
PR-5	Arroz, trigo, avena, sorgo, papa, tomate y tabaco.	Alteración de permeabilidad de la membrana fúngica.
PR-6	Trigo, tomate, papa y tabaco.	Inhibidor de proteasa.
PR-7	Tomate	Endoproteinasa
PR-8	Pepino	Quitinasa
PR-9	Tomate, arroz, tabaco y trigo.	Peroxidasa
PR-10	Perejil, papa, chicharo, frijol, arroz y soya.	Ribonucleasa
PR-11	Tabaco	Quitinasa
PR-12	Arabidopsis y chicharo.	Defensina
PR-13	Trigo	Teonina
PR-14		Proteína transportadora de lípidos.
PR-15	Trigo	Oxalato oxidasa
PR-16	Trigo	Proteína sin actividad oxalato oxidasa
PR-17	Trigo y Tabaco	Peptidasa

Cuadro 1: Clasificación de proteínas PR

ejemplo, algunos tipos de insectos, bacterias, hongos, plantas, mamíferos o aves). En algunos casos, tales proteínas son bifuncionales, inhibiendo tanto proteasas como α -amilasas. Por ejemplo, en semillas de trigo y cebada se encontró un inhibidor de α -amilasa y tripsina de la superfamilia de los cereales (llamados proteínas CM) (García-Olmedo y col., 1992), un inhibidor bifuncional del mismo tipo está presente en ragi (Shivaraj y Pattabiraman, 1981) y en maíz el inhibidor de 12 kDa mostró tener ambas funciones (Blanco-Labra y col., 1995).

Endohidrolasas

Dos de los principales grupos de las proteínas PR, fueron descubiertas en la infección en tabaco por el virus del mosaico del tabaco (VMT), son las β -1,3-glucanasas (grupo 2 de las proteínas PR) y endoquitinasa (grupo 3 de las proteínas PR) (Linthorst y col., 1990). Ya que los b-glucanos y la quitina están presentes en la pared celular de muchos hongos patógenos (Bowles, 1990), no es sorprendente que ambos grupos de endohidrolasas hayan mostrado propiedades antifúngicas. Ambos *tipos de endohidrolasas existen en dos formas: - isoformas extracelulares acídicas (proteínas PR clásicas) y las isoformas vacuolares básicas* (Neuhaus y col., 1991).

Tioninas

Las tioninas fueron primeramente purificadas de la harina del germen de trigo en la década de los 40's y fueron llamadas purotioninas (Balls y col., 1942). Aunque inicialmente se pensó que eran lipoproteínas debido a su presencia en los extractos de éter de petróleo, posteriormente se identificaron en extractos de soluciones salinas. Se han purificado

proteínas relacionadas de otros cereales (cebada, centeno, avena) mostrando que todas son ricas en cisteína (Mr 5000) y residuos básicos (*García-Olmedo y col., 1989*).

Proteínas relacionadas a taumatina

Las proteínas relacionadas a taumatina (PR-5) de tabaco, son inducidas por infección con el VMT (Vigers y col., 1992). Dos isoformas tienen 97% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos, cada una consta de 226 residuos incluyendo el péptido señal de 25 residuos (Payne y col., 1988). Estas proteínas contienen seis cisteínas, las cuales por comparación con taumatina (aproximadamente un 65% de identidad), se predice que forman ocho puentes disulfuro (De Vos *et al.*, 1985).

Fenilalanina amonio liasa (PAL)

Los patógenos que atacan a las plantas al parecer inducen alteraciones en la síntesis de enzimas de ésta, que pueden dar lugar al desarrollo de varios grados de resistencia en torno a los sitios de infección. Una enzima que por lo regular exhibe una mayor actividad o una nueva síntesis, mucho mayor, en los tejidos enfermos es la fenilalanina amonio liasa (PAL), que es una enzima clave en la producción de la molécula básica que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, entre ellos las fitoalexinas y la lignina. La resistencia de las plantas ante un patógeno va a depender de la velocidad y el grado de la síntesis de una o varias enzimas que inducen los patógenos u organismos similares no patogénicos sobre la planta. Este tipo de defensa quizá se encuentra relacionado al producido por las cantidades incrementadas de los compuestos fenólicos comunes, fitoalexinas y otros compuestos, en cuyo caso se requieren otras enzimas para la

síntesis de fitoalexinas, aunque existe la posibilidad de que los dos mecanismos funcionen por separado.

De acuerdo con diversos estudios en otros modelos planta-patógeno, enzimas involucradas en la vía fenilpropanoide, como la fenilalanina amonio liasa (PAL), participan de manera determinante en la generación de compuestos fenólicos y estructuras de defensa y es probable que su regulación coordinada durante el evento de la interacción contra microorganismos patógenos sea clave en la activación de los mecanismos de defensa vegetales. La PAL es la enzima que, al catalizar la primera reacción de la ruta fenilpropanoide, se ha encontrado que puede regular la generación de los diferentes metabolitos obtenidos por esta vía biosintética y ha sido relacionada, por ello, con mecanismos de defensa que se activan en otros modelos (Petersen, 1999).

Fitoalexinas

Las fitoalexinas se definieron originalmente como metabolitos secundarios de bajo peso molecular, con propiedades antimicrobianas y que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos (Paxton 1981). Estos compuestos normalmente se encuentran en niveles basales muy bajos en las plantas sanas pero su acumulación se incrementa dramáticamente después del ataque de un patógeno. Las fitoalexinas se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan con la HR (Hammerschmidt 1999). Entre las fitoalexinas más estudiadas se encuentran aquellas derivadas del metabolismo de los fenil propanoides que tienen como base el aminoácido fenilalanina.

La producción de fitoalexinas se ha correlacionado con la resistencia a patógenos y se asocia con la inducción de una serie de genes que codifican para enzimas específicas responsables de su síntesis.

Entre ellas la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI). La síntesis de *novo* de estas enzimas, como respuesta a la infección se ha demostrado anteriormente (Cuypers et al. 1988). Sin embargo, una evidencia del papel de las fitoalexinas en mecanismos de defensa se obtuvo cuando se demostró la capacidad de ciertos fitopatógenos, como el hongo *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*) de detoxificar las fitoalexinas (VanEtten et al. 1995).

Compuestos fenólicos

Con frecuencia se ha observado que ciertos compuestos fenólicos "comunes" que son tóxicos para los patógenos, se producen y acumulan a un ritmo mucho mayor después de haberse producido una infección en una variedad resistente que en una susceptible. Algunos ejemplos de esos compuestos son el ácido clorogénico, el ácido caféico y escopoletina, etc. Aun cuando alguno de esos compuestos fenólicos comunes llegue a alcanzar concentraciones que pudieran ser tóxicas para el patógeno, debe tenerse en cuenta que algunos de ellos aparecen concurrentemente en los mismos tejidos enfermos y que el efecto tóxico combinado de todos los fenoles fungitóxicos presentes (más que el de cada uno de ellos por separado), es posiblemente el responsable de la inhibición de las infecciones en las variedades resistentes (Agrios, 2005).

Peroxidasas

Las peroxidasas están ampliamente distribuidas entre las plantas superiores, parte de su importancia se debe a que catalizan la oxidación de varios fenoles donadores de electrones en presencia de peróxido de hidrógeno, generando radicales libres que reaccionan entre sí y producen dímeros. La peroxidasa de rábano es una enzima muy efectiva para oxidaciones orgánicas e inorgánicas pero su utilización está limitada a una sola fuente comercial, que tiene un alto costo y en ocasiones tiene limitada capacidad para reconocer nuevos sustratos. Algunas de las funciones fisiológicas de las peroxidasas en las plantas son: su participación en la biosíntesis del etileno, la defensa contra infecciones, en la curación de heridas y en la lignificación de la pared celular (McInnis *et al.*, 2006).

β -1,3-glucanasa

Las β -1,3-glucanasas son proteínas ampliamente distribuidas en plantas implicadas en muchos procesos metabólicos como estrés, infección y procesos de desarrollo. Debido a su capacidad para hidrolizar β -1,3-glucanos, componentes esenciales de la pared celular de hongos y bacterias, han sido designadas como proteínas relacionadas a la patogénesis perteneciente a la familia 2 (PR-2). Las β 1,3-glucanasas desempeñan su función de protección a través de dos mecanismos: 1) Por medio de la hidrólisis del enlace β -1,3/1,6-glucano presente en las paredes celulares de los patógenos. Este hecho hace al patógeno más susceptible a la lisis y posiblemente a otras respuestas de defensa de la planta; y 2) se sugiere que las β -1,3-glucanasas desempeñan un papel defensivo indirecto a través del cual los oligosacáridos de β -1,3/1,6-glucano, que se desprenden de las paredes del patógeno inducen una amplia gama de respuestas de defensa de la planta. A la fecha se han descrito varias β -1,3-glucanasas de plantas como alergénicas, las cuales han sido reconocidas por los anticuerpos tipo de personas con síndrome látex-fruta polen. Estas enzimas también han

sido reconocidas como alérgenos implicados en el asma ocupacional. A nivel de secuencia primaria y pese a provenir de diferentes especies, entre estas proteínas se presenta una alta homología. Así mismo, los epítomos lineales que han sido recientemente reportados para la β -1,3-glucanasas de plátano, están muy conservados (Peumans *et al.*, 2000).

Expresión diferencial de genes

La expresión génica es el proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento. En todos los organismos, inclusive los eucariotas, el contenido del ADN de todas sus células es idéntico. Esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas. Pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células. Hay sólo un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células y son conocidos como "housekeeping genes". El resto de los genes se expresan o no en los diferentes tipos de células, dependiendo de la función de la célula en un tejido particular. Por ejemplo, genes que codifican proteínas responsables del transporte axonal se expresan en neuronas pero no en linfocitos en donde se expresan genes responsables de la respuesta inmune. También existe especificidad temporal, esto quiere decir que los diferentes genes en una célula se encienden o se apagan en diferentes momentos de la vida de un organismo. Además, la regulación de los genes varía según las funciones de éstos (Herr, 2004).

La transmisión de la información genética entre generaciones y la expresión en forma de proteínas de dicha información genética no son suficientes para permitir que el programa de

desarrollo de un organismo se lleve a cabo correctamente. Es necesario, además, asegurar que los genes que constituyen la información genética transmitida se expresen en momentos adecuados bien desde el punto de vista cronológico o espacial (procesos de desarrollo) o bien como respuesta a cambios en las condiciones ambientales en las que se encuentra la célula o el individuo. Por otra parte, las respuestas al ambiente o los procesos de desarrollo no suelen producirse como con secuencia de la activación de un único gen en un momento, sitio o condición determinado, sino que suele ser necesaria la expresión coordinada de un conjunto de ellos para que tenga lugar el efecto. Estos dos hechos hacen que el control de la expresión génica sea central en el proceso de la biología molecular de los seres vivos.

El modelo más coherente de regulación de la expresión génica se conoce con el nombre de Modelo del Operón que explica, como veremos, la expresión coordinada de genes. Por otra parte, veremos a continuación cuál es el proceso por el que llega al material genético la información ambiental o de desarrollo que permita la expresión coordinada; estudiaremos el proceso de transducción de la señal.

Modelo del operón: La expresión de un grupo de secuencias codificantes de diferentes péptidos cuya presencia debe ser coordinada se logra colocando todas las secuencias bajo el control de un mismo promotor.

La transcripción de todas estas secuencias darán lugar a un ARN mensajero de gran tamaño que codifica todos los genes contenidos en el operón (ARN policistrónico) de forma que siempre se podrán traducir coordinadamente las diferentes proteínas del operón. La cantidad de cada una de las proteínas del operón que se produce como consecuencia de la

traducción no siempre es equimolecular porque existen elementos de regulación de la traducción que provocan la separación del ribosoma y el ARNm en ciertos momentos controlando así más finamente la coordinación de la expresión.

La regulación de la expresión genética se da entre el promotor del operón y el inicio del primer gen estructural del fragmento policistrónico existe una secuencia de ADN denominada Operador. A esta secuencia se puede unir una proteína denominada Regulador de forma que cuando se encuentra unido el regulador a la secuencia del operador impide el paso de la ARN polimerasa en su trayecto de transcripción del ADN para sintetizar el ARN policistrónico. Por consiguiente, la regulación de la expresión se logra mediante un impedimento físico de la actividad de la ARN polimerasa causado por la unión de una proteína al ADN.

Existen dos clases de operones según sea su respuesta a las condiciones ambientales: los operones inducibles y los operones represibles.

Operón inducible: es aquél en el que como consecuencia de la presencia de una molécula inductora se produce la expresión de los genes del operón. El ejemplo más clásico es el del Operón de la lactosa que regula la síntesis de las proteínas que permiten el metabolismo de la lactosa por las bacterias.

Cuando una bacteria se encuentra en un ambiente donde puede disponer de lactosa los genes que hacen posible la utilización de este azúcar por la bacteria se inducen. Estos genes, agrupados en el Operón de la lactosa, están constitutivamente reprimidos porque a la región del operador del operón se ha unido una proteína inhibidora que impide el paso de la ARN polimerasa. Cuando hay lactosa en el medio de crecimiento alguna molécula de este

azúcar puede llegar al interior de la célula usando alguno de los sistemas de transporte presentes en la membrana bacteriana para azúcares. Una vez en el interior de la célula, la lactosa puede unirse a la proteína inhibidora unida a la región reguladora del operón de la lactosa de suerte que, cuando la lactosa está unida, la proteína inhibidora se separa de la región operadora permitiendo el paso de la ARN polimerasa y la transcripción de los genes correspondientes.

Cuando desaparece la lactosa del medio la proteína inhibidora queda de nuevo libre de forma que puede volver a unirse al fragmento operador del operón impidiendo, de nuevo, la transcripción de los genes que lo forman.

El resultado de este proceso es que, como respuesta a la presencia de lactosa en el medio, se induce la expresión de los genes que permiten su catabolismo. Este sistema es extremadamente sensible porque la acción de las enzimas que permiten el paso de la lactosa a través de la membrana (transportadoras de lactosa) permite que la concentración intracelular de lactosa sea suficientemente alta hasta el momento en el que la concentración extracelular es ya tan baja que no puede utilizarse el azúcar eficientemente.

Operón represible: en otros casos es necesario que la expresión de ciertos genes se detenga tan pronto como sea metabólicamente posible, porque su actividad no sea necesaria, para lograr una mayor economía de la energía celular. Es el caso, por ejemplo, de los operones de la arginina y del triptófano. Estudiaremos con más detalle el primero de ellos.

Si la cantidad de arginina presente en las proteínas que se encuentran en el medio en que crece una bacteria es suficientemente alta como para satisfacer las necesidades bacterianas de este aminoácido, no es necesario que la bacteria lo sintetice sino que, simplemente, lo

asimila de la dieta. Ahora bien, si la cantidad de arginina exógena no fuera suficiente, las bacterias pueden sintetizarla a partir de otros precursores mediante el concurso de una serie de enzimas codificadas en el operón de la arginina.

De nuevo, nos encontramos con un operón y a su secuencia operadora se une una proteína represora específica. Sin embargo, en este caso la proteína represora se mantiene unida siempre que a ella se encuentre unida, a su vez, una molécula de arginina o de un análogo de arginina. Cuando la concentración celular de arginina desciende por debajo de unos niveles críticos (que vienen determinados por la constante de afinidad de la molécula represora por la arginina o su análogo) el represor se separa de la arginina y queda inactivo separándose, también, de la secuencia operadora y permitiendo la transcripción de los genes que codifican las proteínas de síntesis endógena de arginina.

El efecto final es la expresión de los genes del operón como respuesta a los niveles de arginina presentes en la célula.

Mecanismos de transducción de señal. Se conocen con este nombre los mecanismos que permiten a las células sentir condiciones exteriores (ambientales o señales de desarrollo) y activar como consecuencia de ello la expresión de algunos genes u operones. Los dos ejemplos de operón descritos anteriormente responden a las condiciones ambientales de concentración de lactosa y arginina, respectivamente; sin embargo, no se consideran incluidos dentro de los mecanismos de transducción de señal porque la detección del estado ambiental no se realiza a través de la membrana bacteriana sino que se produce directamente por interacción del inductor con el represor modulando su unión al operador.

En el caso de los sistemas de transducción de seña, un complejo de proteínas de membrana recibe la señal externa. Para ello, este complejo ha de tener una proteína, al menos, dirigida hacia el exterior de la célula de manera que actúe como receptor de la señal. Como consecuencia de la detección de la señal (lo que, en términos bioquímicos suele significar "cuando se ha unido al receptor de membrana la molécula que actúa como inductor") se produce un cambio conformacional en la molécula del receptor; cambio que, a su vez, causa otros en las otras proteínas del complejo de membrana con las que interacciona. Como consecuencia de estos cambios estructurales el complejo de proteínas, por su cara interna, es capaz de modificar químicamente proteínas citoplásmicas activando o inactivando así su función como represores de operones o genes (esto suele ocurrir mediante procesos de fosforilación) o bien sintetiza moléculas que son inductores que regulan la actividad de represores presentes en la célula (estas moléculas inductoras son lo que se suele denominar colectivamente "segundos mensajeros").

Los sistemas de transducción de señal son muy importantes porque de ellos depende gran parte del control de la expresión génica y porque son manipulables genéticamente de forma que podemos utilizarlos para disparar procesos de expresión génica usando señales inductoras diferentes de las que normalmente las controlan en la naturaleza pero que son poco manejables en procesos industriales biotecnológicos (Pisabarro, 2008).

Control de Genes en Eucariotas

En células eucarióticas, la habilidad para expresar las proteínas biológicamente activas en virtud de la regla viene a varios puntos:

Estructura de la Cromatina: La estructura física del ADN, tal como existe compactada en cromatina, pueden afectar a la capacidad de regulador transcripcional de proteínas (lo que se denomina factores de transcripción) y ARN polimerasas para encontrar el acceso a determinados genes y para activar la transcripción de ellos. La presencia de modificaciones de las histonas y CPG de metilación más afectan a la accesibilidad de la cromatina a ARN polimerasas y factores de transcripción.

En un amplio examen de la estructura de la cromatina hay dos formas: heterocromatina y euchromatin que originalmente fueron designados sobre la base de citológico observaciones de la forma oscura las dos regiones fueron teñidos. Heterocromatina es más densamente euchromatin y que se encuentra a menudo cerca de los centrómeros de los cromosomas. Heterocromatina es en general transcriptionally silencio. Euchromatin por otra parte, es poco más embalados y es que activa la transcripción de genes que se encuentran a estar tomando lugar.

Si bien es posible predecir transcriptionally activa de las regiones cromatina sobre la base de ensayos citológicos, la investigación en los últimos decenios han comenzado a definir las bases moleculares para la estructura de la cromatina en el contexto de regulación de la expresión génica. Dos primaria existen mecanismos que modifican la cromatina estructura, y como consecuencia de alteraciones en el efecto de la expresión génica. Estos mecanismos de metilación de citidina residuos en el ADN que se encuentran en la dinucleótido, CG (la mayoría de las veces escrito como un dinucleótido CpG) y la histona modificación.

Al determinar que los residuos C en el ADN son objetivos de metilación se descubrió que más de un 90% de metil-C se encuentra en el dinucleótido, CpG. Esto no quiere decir que todos los CpG dinucleotides contener una metilado C de residuos. Al examinar la estructura

de los genes eucariotas y la identificación de las regiones del CpG dinucleótidos es el caso de que el promotor de las regiones contienen genes 10-20 como muchas veces CpGs en comparación con el resto del genoma. En un sentido general lo que se conoce acerca de metilación del ADN y la transcripción es la condición de que cuando regiones de un gen que puede ser metilado son, el gen se asocia transcriptionally en silencio y cuando la región está en el gen metilado se transcriptionally activa o se puede activar. Al someterse a la diferenciación de las células se ha observado que los genes que se activan transcriptionally exposición una reducción en la metilación estado en relación con el nivel previo a la activación y en virtud de que esta metilación-sigue siendo incluso después de la transcripción cesa. El papel de Metilación del ADN en el control de la actividad transcriptionally demostrado por primera vez por el tratamiento de las células en la cultura con la citidina analógico, 5-azacytidine (5-azaC) que tiene un nitrógeno en la posición 5 del anillo de pirimidina en lugar de uno de carbono y, por tanto, no puede servir como un sustrato para la metilación. Cuando los fibroblastos se cultivadas en la presencia de 5-azaC que diferenciada en Mioblastos. Esto diferenciación ha demostrado ser el resultado de los menores de metilación y la activación de la MyoD gen (un regulador maestro de la diferenciación muscular).

La metilación del ADN es la catalizada por las diferentes ADN methyltransferases (abreviado Dnmt). La función crítica de la metilación del ADN en controlar el desarrollo destinos se demostró en ratones ya sea por inactivar Dnmt3a o Dnmt3b. Pérdida de genes, ya sea causado la muerte poco después del nacimiento. Cuando las células dividen el ADN contiene un capítulo de los padres del ADN y un capítulo de el recién replicado el ADN (la hija del capítulo). Si contiene el ADN metilado cytidines CpG dinucleótidos en el capítulo

hija debe someterse a la metilación en para mantener el patrón de los padres de la metilación. Este "mantenimiento" metilación es la catalizada por Dnmt1 y, por lo tanto, esta enzima se llama el methylase mantenimiento.

La correlación entre la metilación del ADN y la estructura de la cromatina en lo que se refiere a la actividad transcripcional se demuestra por la observación de que hay varias proteínas que se unen a metilado CpGs pero no a unmethylated CpGs. Uno tales proteínas se MeCP2 (metacrilato CP de proteína de unión 2). Cuando se une a MeCP2 metilado CPG dinucleotides la toma de ADN en la cromatina una estructura cerrada y conduce a la represión transcripcional. La capacidad de MeCP2 de obligar a metilado CpGs a su vez es controlada por su estado de fosforilación. Cuando se MeCP2 fosforilados que se une con menos afinidad al ADN y adquiere una mayor apertura cromatina estado. La importancia de MeCP2 la cromatina en la regulación de la estructura y por consiguiente, la transcripción se demuestra por el hecho de que las deficiencias en este proteínas en el resultado síndrome de Rett. El síndrome de Rett es un desarrollo neurológico trastorno que se produce casi exclusivamente en las mujeres se manifiesta como mental retraso, convulsiones, microcefalia, arrestado el desarrollo, y la pérdida de expresión.

Acetilación de histonas es sabido que da lugar a una mayor apertura estructura de la cromatina y modificar estas histonas se encuentran en las regiones de la la cromatina que se transcriptionally activa. Por el contrario, de underacetylation histonas se asocia con el cierre de la cromatina y la inactividad transcripcional. Un correlación directa entre la acetilación de histonas y la actividad transcripcional demostrada cuando se descubrió que los complejos de proteínas, anteriormente conocido por transcripcional ser activadores, se determinó que la histona acetylase actividad. Y como era de esperar, represor

transcripcional complejos eran contener la histona deacetilasa actividad. Vínculo entre la metilación del ADN y silenciamiento transcripcional se ha demostrado que la observación de que las proteínas que se unen a metil CpG dinucleotides puede contratar a deacetylases histonas del ADN. Las proteínas se sabe que interactúan con acetilado lysines en las histonas que juntos conducen a una más estructura de la cromatina abierta. Proteínas que se unen a las histonas contienen acetilado un dominio llamado bromodomain. El bromodomain se compone de un conjunto de cuatro hélices α -y es un dominio de proteínas que participan en las interacciones proteína-en una número de sistemas celulares, además de la histona acetilado vinculante y estructura de la cromatina modificación.

Otra modificación de las histonas sabe que afectan a la estructura es la cromatina metilación. Sin embargo, con la metilación de histonas no hay una correlación directa entre la modificación y un efecto específico sobre la transcripción. La metilación de la histona H4 en R4 (arginina en la posición 4) promueve un abierto la cromatina estructura y, por lo tanto, conduce a la activación transcripcional. Metilación de histona H3 en K4 y K79 (lysines 4 y 79) se ha demostrado que actuar al igual que histona H4 R4 metilación. Sin embargo, la metilación de las histonas H3 en K9 y K27 es que están asociados con genes inactivos transcriptionally. La metilación de histonas proporciona un sitio para la unión de otras proteínas que a su vez conduce a alteración de la estructura de la cromatina a un estado más compactada. Proteínas que se unen lysines a metilado presente en las histonas (así como otras proteínas) contienen un dominio llamado chromodomain. El chromodomain consta de un tramo conservado de 40-50 aminoácidos y se encuentra en muchos proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina complejos. Además, chromodomain las proteínas se encuentran en el RNA-transcripcional inducidos por silenciar (RITS) complejo

implica que los pequeños ARN de interferencia (siRNA) y microRNA (miRNA)-medicamentosos downregulation de transcripción.

Proteínas histonas también puede ser modificado por la adición de pequeñas proteínas ubiquitina. Con respecto a las histonas, uiquitin se encuentra sólo en las histonas H2A y H2B y sólo un pequeño porcentaje de las histonas H2A se encuentra ubiquitinated. Sin embargo, cuando ubiquitinated, H2A está relacionado con la represión de la transcripción. El lugar exacto de efecto contrario se observa cuando la histona H2B es ubiquitinated, lo que lleva a una estimulación de la actividad de genes. La razón por la que ubiquitinated histonas H2B es relacionados con la actividad transcripcional es que esta modificación promueve la metilación de las histonas H3 en K4 y K79, que como se ha indicado anteriormente se asocia con estructura de la cromatina abierta.

Fosforilación de las histonas se produce principalmente en respuesta a las señales de fuera de tales como la estimulación del factor de crecimiento o inductores de estrés, tales como golpes de calor. Fosforilados histonas están localizados a los genes que se convierten en transcriptionally activa como consecuencia de estas señales fuera. La importancia de la histona fosforilación en el control de la expresión génica puede ser demostrado en pacientes Coffin-Lowry, síndrome de. Esta enfermedad se debe a defectos en la RSK2 gen que codifica la histona phosphorylating enzima. Síndrome de Coffin-Lowry es una rara forma de X-mental ligado se caracteriza por retraso malformaciones esqueléticas, retraso del crecimiento, la audición déficit, los trastornos del movimiento paroxístico, y el deterioro cognitivo en las zonas afectadas hombres.

Epigenéticos de Control: Epigénesis se refiere a cambios en el patrón de expresión de genes que no se deben a los cambios en la composición de nucleótidos del genoma. Literalmente "epi" significa "en" por lo tanto, epigenética significa "sobre" el gen en contraposición a "por" el gen.

El término epigenética fue acuñado por Conrad Waddington en 1939 para definir el desarrollo de la genética durante el desarrollo del programa. Además, se acuñó epigenotype el término para definir "el desarrollo total del sistema vías de desarrollo interrelacionados a través de la cual la forma adulta de un organismo se realiza". Es evidente que esta definición abarca una amplia gama de conceptos se ocupan de la genética, la herencia y el desarrollo. Hoy en día el término epigenética se utiliza para definir el mecanismo mediante el cual los cambios en el patrón heredado de la expresión de los genes ocurren en la ausencia de alteraciones o cambios en la composición de un determinado gen. Una interpretación literal es que la epigenética media "Además de los cambios en la secuencia del genoma." La manera más fácil de entender este concepto es pensar en el óvulo fertilizado: en el momento de la fecundación que sola célula es totipotentes, es decir, que divide a la hija en última instancia, diferenciar las células en todas las diferentes células del organismo. La gúnica diferencia entre el diversas células del organismo resultante son las consecuencias de diferencial la expresión de los genes, y no debido a las diferencias en las secuencias de los genes sí mismos. Las pruebas indican que la mayoría de las modificaciones epigenéticas son borrarse durante la gametogénesis y / o después de la fertilización.

Varios tipos diferentes de eventos epigenéticos han sido identificados. Ya que se describe en la sección anterior relativa a la estructura de la cromatina como un medio para control de

la expresión de los genes y el papel de la metilación del ADN en estos estructural cambios, metilación del ADN es probable que sea el más importante evento epigenéticos importante controlar y mantener el patrón de expresión génica durante desarrollo. Otros eventos de modificación de ADN también se conocen a efectos epigenéticos incluidos los fenómenos acetilación, metilación fosforilación, y ubiquitylation sumoylation de las proteínas histonas. Por lo tanto, debe quedar claro que los mismos hechos que afectan a la cromatina estructura puede definirse como eventos epigenéticos. Considerando que, epigénesis desempeña un papel fundamental en la regulación, control y mantenimiento de la expresión de los genes que conduzcan a la diferenciación de muchos estados de las células de un organismo, las recientes pruebas ha identificado un vínculo entre la procesos epigenéticos y la enfermedad. Lo más importante es el vínculo entre epigénesis y el cáncer que se ha sugerido que un factor que contribuye a casi la mitad de todos los cánceres. Una clara demostración se ha realizado entre los cambios en el estado de metilación tumor supresor genes y el desarrollo de muchos tipos de cáncer. Efectos epigenéticos en función del sistema inmune también se han identificados. Además, hay indicios de un vínculo entre la epigenética los procesos y la salud mental.

Iniciación transcripcional: Este es el modo más importante para el control de la expresión de los genes eucariotas (véase a continuación para más detalles). Factores específicos que ejercen el control de incluir la fuerza de los elementos promotor dentro de la secuencias de ADN de un gen, la presencia o ausencia de secuencias potenciador (que aumentan la actividad de la RNA polimerasa en una dado por el promotor vinculante factores de transcripción específicos), y la interacción entre múltiples activador inhibidor de las proteínas y las proteínas.

Transcripción de las diferentes clases de RNAs en eucariotas se lleva a cabo por tres polimerasas diferentes. ARN pol I sintetiza la rRNAs, a excepción de los 5S especies. ARN pol II sintetiza los mRNAs y algunos RNAs pequeños nucleares (ARNsn's) que trabajan en el empalme de ARN. ARN pol III sintetiza los 5S rRNA y el ARNt. La gran mayoría de los RNAs son eucariotas sometido a post-transcripcional de procesamiento.

El más complejo de control observado en eucariotas son los genes que regulan la expresión de ARN pol II-genes transcriben, el ARNm de genes. Casi todos los genes eucariotas mRNA contienen una estructura básica consistente de los exones de codificación y no de codificación de intrones y promotores basal de dos tipos y cualquier número de diferentes ámbitos de regulación transcripcional (véase diagramas de abajo). El promotor basal se denominan elementos CCAAT cajas y cajas de TATA-a causa de su secuencia de motivos. La caja de TATA reside 20 a 30 bases antes de iniciar la transcripción y el sitio es en secuencia similar a la procarióticas Pribnow caja (consenso $TATA^{T/A}A^{T/A}$, donde T/A indica que cualquiera de base puede encontrarse en que posición).

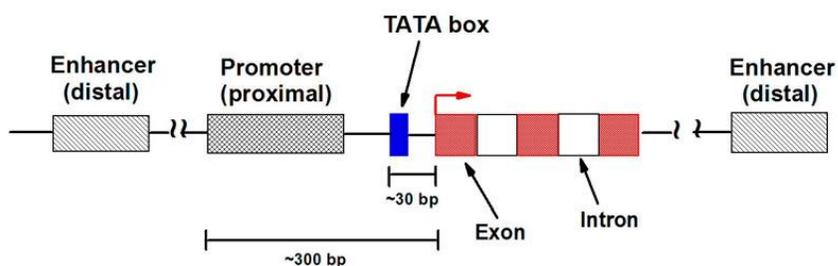


Figura 5: Estructura típica de un ARNm eucariótico.

Numerosas proteínas identificadas como TFIIA, B, C, etc (por transcription factores que regulan ARN pol II), se han observado para interactuar con el TATA-box. La caja CCAAT (consenso GG^T/C CAATCT) reside de 50 a 130 bases río arriba de la transcripción sitio web

inicial. La proteína identificada como C/EBP [por CCAAT-box/Enhancer vinculante ("Binding") Proteínas] se une para CCAAT la caja de elemento.

Hay muchos otros aspectos de la normativa ARNm en secuencias genes, así como, que se unen diversos factores de transcripción (véase el diagrama que figura a continuación). Tesis secuencias reguladoras son predominantemente situadas aguas arriba (5') de la transcripción inicio del sitio, aunque algunos elementos se producen aguas abajo (3') o incluso dentro de los propios genes. El número y el tipo de elementos reguladores de se varía con cada gen mRNA. Diferentes combinaciones de transcripción factores que también pueden ejercer efectos diferenciales de regulación transcripcional a inicio. Los diversos tipos de células cada uno de combinaciones de expresar las características de factores de transcripción, lo que es el principal mecanismo de tipo de células en la especificidad la regulación de la expresión génica mRNA.

Modificación de Procesamiento de Transcripción: mRNAs eucarióticos debe ser limitado y polyadenylated, y los intrones deben ser eliminados con precisión. Varios genes han sido identificado que se someten los tejidos-patrones específicos de splicing alternativo, que generar proteínas biológicamente diferentes del mismo gen.

Transporte de ARN: Un procesado totalmente mRNA debe abandonar el núcleo en para ser traducido a proteína.

Transcripción de Estabilidad: A diferencia de mRNAs procarióticas, cuyas vidas medias son todos en el rango de 1 a 5 minutos, mRNAs eucarióticos puede variar mucho en sus estabilidad. Algunos han inestable transcripciones secuencias (predominantemente, pero

no exclusivamente, en el 3'-no traducido regiones) que son señales de una rápida degradación.

Traslacional Iniciación: Dado que muchos mRNAs tiene múltiples codones metionina, la capacidad de los ribosomas para reconocer y poner en marcha a partir de la síntesis correcta puede codón AUG afectan a la expresión de un gen producto. Varios ejemplos han surgido lo que demuestra que algunas proteínas eucariotas iniciar en no-AUG codones. Este fenómeno se ha conocido que se produzca en *E. coli* durante bastante tiempo, pero sólo recientemente se ha observado en mRNAs eucarióticos.

Pequeños RNAs y el Control de los Niveles de Transcripción: En los últimos años un nuevo modelo de regulación génica ha surgido que implica el control ejercido por los pequeños no codificante RNAs. Este pequeño RNA-mediado de control puede ser ejercido ya sea en el nivel de la traducibilidad de los mRNA, la estabilidad del mRNA oa través de cambios en la estructura de la cromatina.

Post-traslacional Modificación: Común modificaciones incluyen glicosilación, acetilación, acilación grasos, disulfuro de formaciones de bonos, etc

Proteínas de Transporte: Con el fin de que las proteínas a ser biológicamente activas después de la traducción y transformación, que deben ser transportados a su lugar de acción.

Control de la Estabilidad de Proteínas: Muchas proteínas son rápidamente degradadas, mientras que otros son muy estables. Específicas secuencias de aminoácidos en algunas proteínas se ha demostrado para lograr la rápida degradación (King, 2011).

Silenciamiento genético en plantas

El término “silenciamiento genético” se utiliza habitualmente para describir el “apagado” de un determinado gen, y es un mecanismo general que ocurre durante la regulación de la expresión génica. A través de este mecanismo, la maquinaria celular impide la expresión de un gen que debería estar “encendido” en circunstancias normales.

La expresión génica se puede regular tanto a nivel transcripcional como post transcripcional. El Silenciamiento Génico Transcripcional (en inglés, Transcriptional Gene Silencing o TGS) es el resultado de la modificación de las histonas. Esta modificación crea un ambiente de heterocromatina alrededor de un cierto gen, que impide el acceso de la maquinaria transcripcional (factores de transcripción, ARN polimerasas, etc.). El Silenciamiento Génico Post Transcripcional (en inglés, Post-Transcriptional Gene Silencing o PTGS), en cambio, es un mecanismo que implica la degradación de un determinado ARN mensajero. La destrucción de este ARNm impide su normal traducción y consecuentemente no se sintetiza la proteína correspondiente (Baulcome, 2005).

Tanto el silenciamiento transcripcional como el post transcripcional son mecanismos que regulan la expresión de genes endógenos, pero además son empleados por los organismos para protegerse de transposones y virus. Es por eso que se cree que el silenciamiento génico forma parte de un sistema de defensa ancestral que resguarda a algunos organismos de la invasión de ácidos nucleicos infecciosos.

Más allá de las funciones fisiológicas que se le atribuyen al silenciamiento génico, como la defensa antiviral y la regulación de la expresión génica, este fenómeno puede ser utilizado además como herramienta para identificar genes “blanco” para el desarrollo de nuevas drogas, eliminar la función de un gen en particular, y hasta potencialmente

eliminar la expresión de un gen responsable de una cierta enfermedad. También es posible utilizar el silenciamiento génico como una herramienta para generar mejores cultivos y alimentos, como por ejemplo, plantas resistentes a virus, mejoras en la calidad de los aceites, y otras mejoras nutricionales en granos y tubérculos (Baulcome, 2004).

Sustancias Utilizadas para Inducir Resistencia en Plantas

Quitosán

El quitosán es un polisacárido de cadena lineal poco frecuente en la naturaleza y que se obtiene mediante la desacetilación extensiva de la quitina un homopolímero β -1,4 enlazado de la N-acetil-D-glucosamina, presente en el exoesqueleto de los crustáceos, moluscos, en la cutícula de los insectos y como constituyente de las paredes celulares de muchos tipos de hongos. La quitina es el segundo polisacárido en abundancia. La quitina es estructuralmente similar a la celulosa en cuanto a su naturaleza de polisacárido. El método más utilizado para la obtención de quitosán es mediante tratamiento químico que consiste en la desacetilación alcalina de la quitina, y en un medio ácido se produce una fuerte hidrólisis de la cadena de la quitina (Peniche, 2001).

La actividad antimicrobiana del quitosán contra varias bacterias y hongos es bien conocida, y ha sido reportada por numerosos autores. Esta propiedad es debida a la naturaleza policatiónica del quitosán, facilitando su aplicación en una gran variedad de campos, incluyendo bromatología, agricultura, medicina, farmacia y textiles. Han sido propuestos diferentes mecanismos para explicar la inhibición microbiana por el quitosán, pero el mecanismo exacto es desconocido. El más aceptado explica la interacción de la carga positiva del quitosán con la carga negativa en la superficie de las células de muchos hongos

y bacterias, el cual causa alteraciones extensivas en la superficie celular y altera la permeabilidad celular. Esto causa la filtración de sustancias intracelulares, igual que de electrolitos, proteínas, aminoácidos, glucosa y lactato deshidrogenasa. Como resultado el quitosán inhibe el metabolismo normal de los microorganismos y finalmente lleva a la muerte éstas células (Lim y Hudson, 2003).

BHT Benzotiazole

El S-metil benzo [1, 2,3] tiadiazol-7-carbotioato (BTH) suministra protección frente a diversas enfermedades en una amplia gama de cultivos (Colson-Hanks *et al.*, 2000; Colson-Hanks & Deverall, 2000; Maxson-Stein *et al.*, 2002; Agostini *et al.*, 2003).

Son numerosos los estudios realizados en una gran variedad de cultivos que muestran que BTH resulta efectivo frente a distintos patógenos, pero también se sabe que hay que tener en cuenta muchos aspectos que varían en función del tipo de cultivo, el número de tratamientos a efectuar, el momento de aplicación de los mismos, la cantidad de producto en cada aplicación y la combinación con otros productos como pesticidas. Por ejemplo, en cultivos de monocotiledóneas como trigo (Gorlach *et al.*, 1996; Stadnik & Buchenauer, 1999a; Stadnik & Buchenauer, 1999b) se ha demostrado que la aplicación de BTH crea resistencia frente a mildiu si se aplica una sola vez al final de la formación del tallo (Morris *et al.*, 1998), mientras que en cultivos de dicotiledóneas como pimiento y tomate para crear resistencia frente a manchas bacterianas causadas por *Pseudomonas syringae* pv. tomato y *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* deben realizarse aplicaciones cada 7-10 días (Louws *et al.*, 2001). También se han realizado ensayos en otras solanáceas como tomate y tabaco (Csinos *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2003), leguminosas como haba o soja (Dann &

Deverall, 1995; Dann & Deverall, 1996) y frutales como manzanos y perales (Ishii *et al.*, 1999; Maxson-Stein *et al.*, 2002).

Entre los factores positivos relacionados con el empleo de este tipo de compuestos, se podrían destacar que: A) evitan los problemas relacionados con la aparición de resistencias a los patógenos inducidas por los pesticidas clásicos; B) pueden sustituir a los numerosos pesticidas que actualmente son de retirada obligatoria, al no ser compatibles medioambientalmente; C) reducen los riesgos para la salud que pueden presentar los pesticidas químicos; D) pueden ser efectivos contra enfermedades producidas por virus y patógenos de suelo frente a los cuales los tratamientos químicos no son eficaces; E) no hay necesidad de introducir genes foráneos en las plantas, y por tanto, se evita el rechazo social que provocan las plantas transgénicas.

Ácido salicílico

El funcionamiento del ácido salicílico (AS) es relativamente sencillo, es el mensajero interno natural de las plantas. Lo que significa que cuando una planta es atacada por una enfermedad o plaga, ella genera AS para advertirle al resto de la planta que está siendo afectada y que suba sus defensas (compuestos presentados arriba). Teniendo esto en mente, se sabe por qué el AS aplicado externamente tiene el efecto de activador de resistencia. La desventaja del AS es que su vida dentro de la planta es muy corta, siendo inmovilizada en las paredes celulares, por lo cual se vuelve necesaria la aplicación rutinaria durante toda la vida del cultivo para poder mantener altos niveles de resistencia. La ventaja de su fijación rápida es que si se sobre dosifica, el daño no es permanente y se repone rápidamente en 7 a 10 días máximo. El AS es altamente móvil dentro de la planta, por eso puede proteger hasta

partes no cubiertas en la aplicación foliar o aplicarlo por el sistema de riego para ser absorbido por el sistema radicular EDA, 2008.

Los patógenos incompatibles ya sean hongos, virus o bacterias, provocan la acumulación de ácido salicílico (AS) y de ácido benzoico (AB) y sus respectivos glucósidos conjugados, formándose altas concentraciones en la vecindad del sitio de infección. Niveles elevados de AS también pueden inhibir la expresión de genes que son inducidos por heridas bloqueando la biosíntesis de ácido jasmonico (Farmer *et al.*, 1994).

El AS se sintetiza por la vía del metabolismo fenilpropanoide desde ácido cinámico y ácido benzoico. Se acumula intracelularmente en un receptor específico o se une a la enzima catalasa. Normalmente la catalasa protege a la planta contra el estrés oxidativo ejercido por las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, esta actividad de la catalasa es bloqueada por la unión del ácido salicílico (Chen *et al.*, 1993). Así que, alterando la cantidad de ácido salicílico dentro de la célula, se puede regular el nivel de las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno. Si solamente una pequeña cantidad de ácido salicílico está presente en la célula, y poco unido a la catalasa, su actividad permanece alta, manteniendo el nivel de especies reactivas de oxígeno bajo. Cuando los niveles de ácido salicílico son altos y la actividad de la catalasa baja, el nivel de las especies reactivas de oxígeno permanecen altas liberando la síntesis de proteínas-PR. La síntesis de proteínas-PR también puede inducirse artificialmente inyectando peróxido de hidrógeno en las hojas de las plantas.

El estallido oxidativo que sucede después de la infección por el patógeno puede tener su efecto óptimo, cuando aumenta la síntesis del ácido salicílico y la actividad de la catalasa es

baja, permitiendo que la expresión de las proteínas-PR dispare la actividad de las especies reactivas de oxígeno.

RSA también puede ser liberada rociando o inyectando a las plantas ácido salicílico, o por tratamiento con peróxido de hidrógeno, metil-2,6-ácido dicloroisonicotínico (INA), o venzo (1, 2, 3) thiadiazol-7-ácido carbotionico (BTH) (Ward *et al.*, 1991). Estos químicos no funcionan como antibióticos, más bien parecen inducir en plantas la expresión de la misma respuesta de resistencia y el mismo conjunto de genes que cuando son inducidos por un patógeno. Esto sugiere que INA y BTH son activadores de RSA, mientras que el H₂O₂ y el ácido salicílico son metabolitos presentes en la planta que están involucrados directamente en el establecimiento de RSA. Por ejemplo se demostró que una infección por el virus del mosaico del tabaco (TMV) también como el tratamiento con ácido salicílico o INA libera la síntesis del mismo conjunto de 13 proteínas-PR diferentes. Esto demostró que INA es traslocado en un día desde las hojas jóvenes superiores hacia las raíces, liberando la síntesis de quitinasa, es decir una reacción de defensa contra infecciones de hongos y bacterias (Ward *et al.*, 1991).

Ácido jasmónico

Los jasmonatos son fitohormonas lipídicas, derivados oxigenados de los ácidos grasos linoleico y linolénico, principalmente, que actúan como moléculas señalizadoras de la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo. Entre las situaciones de estrés que regulan están las heridas (mecánicas o

bióticas), la exposición a ozono, sequía y el ataque por patógenos y plagas. Entre los procesos de desarrollo en los que participan los jasmonatos están el crecimiento de la raíz, la tuberización, la maduración de frutos, senescencia, desarrollo del polen y enrollamiento de zarcillos (Penninckx *et al.*, 1996; Creelman y Mullet, 1997; McConn *et al.*, 1997; Pieterse *et al.*, 1998; Reymond y Farmer, 1998; Staswick *et al.*, 1998; Overmyer *et al.*, 2000; Berger, 2002; Rao *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002; Farmer *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 2003).

La ruta de biosíntesis de los jasmonatos (ruta de los octadecanoides) ha sido extensamente estudiada y se dispone de mucha información acerca del tipo de enzimas implicados en cada paso y de la localización subcelular de los mismos (Mueller, 1997; Berger, 2002; Turner *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de la importancia de los jasmonatos como moléculas señalizadoras, el conocimiento actual de los mecanismos moleculares de transmisión de señales mediadas por jasmonatos es muy limitado. Los pocos componentes de esta ruta de señalización descritos hasta el momento se han identificado principalmente gracias a escrutinios genéticos buscando plantas que, o bien mostrasen una respuesta constitutiva o aumentada a ácido jasmónico (JA), o bien exhibieran una sensibilidad reducida a JA, a derivados como el metil-jasmónico (MeJA) o a análogos como la coronatina (Turner *et al.*, 2002).

Uso de Extractos Botánicos para el control de plagas en plantas

Los productos naturales de origen vegetal han sido, en las últimas dos décadas, mayormente estudiados en su parte química, con énfasis en los metabolitos secundarios, los

cuales están implicados en el control biológico contra patógenos o plagas, y en ciertos casos, activando procesos de defensa en la planta, brindando una protección preventiva (Kagale *et al.* 2004).

Los metabolitos secundarios, son sustancias de bajo peso molecular, no son comunes en todas las plantas y por el contrario, pueden ser una expresión de la individualidad química de un organismo. Los productos del proceso fundamental de la fotosíntesis proporcionan los intermediarios biosintéticos necesarios para dar lugar a la formación de los metabolitos secundarios, haciéndose evidente la interconexión entre productos del metabolismo primario con el secundario (Gil 2002).

Los compuestos fenólicos sencillos (hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos), son metabolitos secundarios comunes en las plantas con propiedades fungicidas. Las cumarinas clasificadas como antifúngicas y antibacteriana. Los conjugados de fenilpropanoides con aminas, se incorporan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez e impedir la entrada de los patógenos. En cuanto a las fitoalexinas, estas son sintetizadas por las plantas, después de la infección y en actividad inhibitoria de microorganismos patógenos, se han identificado un grupo importante, por ejemplo, la pisatina, la cual es un flavonoide sintetizado por el guisante, *Pisum sativum*, como reacción a la infección por hongos, siendo esta la primera fitoalexina aislada y caracterizada (Gil., 2002).

Por otro lado, aquellas que hacen parte de la respuesta hipersensible, como es el caso de algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros

metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa. Es así, como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas al ataque por patógenos (Sepúlveda *et al.* 2003).

En el caso del patosistema pepino-*Podosphaera xanthii*, causante del mildío polvoriento, al ser tratado con un inductor exógeno, proveniente de las hojas de milsana (*Reynoutria sachalinensis*), se observó rápidamente la síntesis de una fitoalexina, C-glycosidil conocida como cucumarina, la cual se acumula en el sitio de penetración del hongo, jugando un papel importante en el bloqueo, colonización y supervivencia del patógeno. Se reportó que la lignificación de la pared celular y el aumento en actividad de las enzimas quitinasas, peroxidadas y β 1,3 glucanasas (Fofana *et al.* 2005).

En la naturaleza existe una gama muy amplia de plantas que producen una diversidad de metabolitos secundarios tóxicos, tal características les permite a estas plantas actuar como antagonistas de patógenos bióticos y plagas. Su potencial antagonistas lo podemos explotar al rotarlas o asociarlas con los cultivos o al incorporar sus residuos al suelo. Otra forma de aprovechar dicho antagonismo es mediante la preparación de extractos o infusiones a partir de sus tejidos (García y Montes, 1992; Montes *et al.*, 1992, 1993, 1997; Fraire *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 1994; Diaz; 1994; Medrano *et al.*, 1994; Díaz-Plaza, 1996; Verduzco, *et al.*, 1996).

Tagetes erecta (“cempasúchil” o “flor de muerto”) es una de las plantas ampliamente reconocida como poseedora de propiedades fúngicas, nematocidas e insecticidas; sus

propiedades antagonistas se deben a la presencia de compuestos terpenos en sus tejidos. Zavaleta-Mejía y *col.*, en 1997 reportan que el rotar e incorporar los residuos de cempazuchil o al asociarlo con chile o jitomate, se tiene una reducción significativa en el agallamiento radical ocasionado por los nematodos *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita*, en las hortalizas mencionadas. En pepino, Tun *et al.* en el 1997 mencionan haber controlado nematodos fitoparasitos con la incorporación de cempazuchil. Por otro lado, en la asociación cenpazuchil-tomate se produjo una reducción significativa en el daño por el hongo *Alternaria solani* en el follaje y fruto del tomate (Rojas-Martínez *et al.*, 1994; Zavaleta-Mejía y Gómez, 1995).

Crotalaria longirostrata (chipilín) en asociación con tomate o incorporando sus residuos al suelo, se obtuvo una reducción significativa en el agallamiento de raíces inducido por *M. incognita* en tomate (Villar y Zavaleta-Mejía, 1990). Otras plantas con potencial para utilizarse como antagonista de fitopatógenos son las crucíferas (Brassicaceas); por ejemplo, Zavaleta-Mejía *et al.* (1990) señalan que con la incorporación de residuos de col o brócoli al suelo se obtuvieron reducciones significativas en el agallamiento inducido por *M. incognita* en jitomate. En cebolla también se redujo la incidencia y severidad de la pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum* (Zavaleta-Mejía Rojas, 1990; Zavaleta-Mejía *et al.* 1990; Zavaleta-Mejía y Gómez, 1994).

Lippia graveolens.-el aceite esencial de hojas de orégano mexicano presenta fenoles timol y carvacol que son los principales componentes que le confieren poder antibacteriano y antifúngico (Obledo *et al.* 2004).

Cymbopogon citratus.- El aceite esencial obtenido desde hojas de zacate de limón que es rico en citral , myrceno, dipenteno, methylheptenona, ciertos alcoholes, y ácidos volátiles, presenta actividad antifúngica, contra *Mycosphaerella fijiensis* en bioensayos realizados in vitro (Obledo *et al.* 2004).

Hiba arborvitae.- (cedro blanco) inhiben la germinación de esporas de *Botritis cinérea* (Hernandez y Bautista 2007); y el crecimiento micelial *Sclerotiorum* aplicados a diferentes concentraciones (Zapata *et al.*, 2003).

Todos estos antecedentes dan una idea del gran potencial que tiene el uso de plantas antagonistas; sin embargo, para manipular de manera racional y eficaz a estas plantas es de fundamental importancia determinar qué factores y/o condiciones favorecen la máxima expresión del antagonismo, así como los mecanismos responsables del control.

Heliopsis longipes

El género *Heliopsis* pertenece a la tribu *Heliantheae* de la familia Asteraceae. La mencionada tribu comprende cerca de 2,500 especies agrupadas en 189 géneros y está fraccionada en diez subtribus. *Heliopsis*, asociado *Zinnia*, *Philactis*, *Sanvitalia*, *Acmella*, *Podachaenium*, *Squamopappus*, *Spilanthes* y *Salmea*, conforma la subtribu Zinniinae (Bremer 1994), cuyos miembros comparten, en su morfología, la presencia de capítulos solitarios, receptáculos cónicos o hemisféricos, flores liguladas pistiladas, fértiles y persistentes, flores del disco fértiles y aquenios del disco lateralmente comprimidos o angulados. La mayor diferencia que separa las especies de *Heliopsis* de las de otros géneros

es la siguiente combinación de caracteres: la presencia de flores fértiles en el disco, flores liguladas persistentes y fértiles, corolas sésiles y persistentes, aquenios gruesos, 3 a 4-angulares y vilano ausente.

Clasificación Taxonomica

División:..... Magnoliophyta

Clase:..... Magnoliophyta

Orden:..... Asterales

Familia:Asteraceae

Tribu:..... Heliantheae

Género:*Heliopsis*

Especie:..... *longipes*

Heliopsis longipes se encuentra distribuida en México en la Sierra Gorda, en el centro del país en la región de colindancia de los estados de Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro, en este género sólo se han encontrado alcaloides alifáticos y acetilénicos. Otro conjunto lo constituyen las amidas que presentan anillos homo o heterocíclicos. Este tipo de estructuras se observan en forma particularmente diversa en la familia Piperaceae e incluye varios alcaloides (Parmar *et al.*, 1997). Las alcaloides son consideradas compuestos bioactivos, esto es, una pequeña cantidad del compuesto evoca una respuesta notable en las células receptoras.

H. longipes fue la primera especie en la que se determinó la presencia de una alcanida olefínica (Acree *et al.*, 1945). Sin embargo, la planta cuya muestra de raíces fue sometida para su análisis en laboratorio resultó erróneamente identificada como *Erigeron affinis* y así, la amida aislada fue denominada afinina. El descubrimiento de la afinina, un compuesto insecticida, en esta especie despertó interés por su notoria actividad. La afinina es la alcanida mayoritaria en las raíces de esta planta y principal responsable de los efectos biológicos específicos observados, entre los que se pueden considerar la acción de anestésico local, el estímulo organoléptico, así como la actividad insecticida y bactericida. Por mucho tiempo se consideró a la afinina como único componente bioactivo en este tejido, cuyo extracto crudo se ha utilizado para el estudio de sus aplicaciones, mismas que recientemente se han extendido mostrando un potencial agronómico importante en el control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos (Ramírez *et al.*, 2000).

El análisis fotoquímico más detallado de las raíces de *H. longipes* ha revelado la presencia de otros principios bioactivos y de propiedades antimicrobianas de algunas alcanidas individuales (Molia *et al.*, 1999).

Otras alcanidas presentes en *H. longipes* son: N-isobutil-decamida, N-isobutil- 2E-monoen-decamida, N-isobutil-6Z, 8E-dien-decamida, N-isobutil 2E, 6Z, 8E-trien-decamida, N-isobutil 2Z-en-8,10 diin- undecamida, N-(2-metilbutil) 2E, 6Z, 8E triendecamida, N-isobutil 2Z, 4E, dien-8, 10 diin undecamida, N-isobutil 2E-en-8,10 diin undecamida, N-isobutil 2E, 4E dien 8,10 diin undecamida, N-isobutil 2E, 4Z, 8Z, 10E, tetraen-dodecamida, 2E, 6Z, 8E-trien-decanoato de bornilo, N-(2-metilbutil)-2E, 4Z, 8Z, 10E, tetraen-dodecamida (García *et al.*, 2004).

Este producto “afinina” y el extracto crudo de *Heliopsis longipes* se evaluaron como fungicida de dos importantes hongos fitopatógenos que son *Sclerotium cepivorum* y *Sclerotium rolfii*, mostrando actividad inhibitoria sobre estos dos patógenos. Se obtuvo máxima inhibición a concentraciones de afinina de 75ug/ml. La acción de este producto es debida a una sustancia llamada alcanida que es la que se encuentra en mayor cantidad en las raíces de esta planta la cual su efecto de inhibición es hacia el contenido de ergosterol y sobre los ácidos grasos mayoritarios en el micelio del hongo. (Valdez y col. 2000).

ARTICULO 1

**Actividad inhibitoria del extracto de *Heliopsis longipes* sobre *Fusarium oxysporum* f.
*sp lycopersici***

González- Morales Susana*¹, Flores-López María Liliana³, Benavides- Mendoza Adalberto² y Flores-Olivas Alberto¹

1. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Departamento de Parasitología Agrícola. 2. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Departamento de Horticultura. 3. Biorganix Mexicana. Aiera 240 Colonia Parque Industrial, Ramos Arizpe, Coahuila, México. *Autor para correspondencia: aflooli50@gmail.com, aflooli@uaaan.mx

Resumen

Se obtuvieron 17 aislados de *Fusarium sp.* de raíces de tomate con síntomas de marchitez. Nueve aislados fueron identificados como *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici* (FOL). Se determinó la patogenicidad de los aislados, uno de ellos identificado como aislado 10 ocasionó los síntomas más severos. Dicho aislado se seleccionó para evaluar *in vitro* la dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Heliopsis longipes*. Se determinó la concentración de afinina como componente principal del extracto. La dosis letal media estimada fue de 164.2 µg/ml de afinina, y la dosis letal 90 fue de 348.6 µg/ml de afinina.

Palabras clave: Afinina, dosis letal media, tomate.

Abstract

Seventeen isolates of *Fusarium* were obtained from roots of tomato plants with symptoms of wilting. Nine isolates were identified as *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL). A test of pathogenicity was carried out, from which the isolate causing the most severe symptoms was isolate 10. This isolate was selected to conduct an *in vitro* test to determine the minimum inhibitory dose of the ethanolic extract of *Heliopsis longipes*. The minimum inhibitory dose 50 was 164.2 µg/ml of afinnine, the major active component in the extract. The lethal dose 90 was 348.6 µg/ml of afinnine.

Additional keywords: Afinnine, inhibitory minimum dose, tomato.

Introducción

Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (FOL) es el hongo fitopatógeno distribuido en todo el mundo que causa grandes pérdidas en el cultivo de tomate. El hongo sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra y posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo por espacio de 6 años. Afecta al sistema vascular ocasionando marchitez en plantas de tomate (Ward, 1986). Existen tres razas del hongo numeradas del uno al tres, esto obedece al orden cronológico en que fueron descubiertas, y en su propiedad de infectar diferentes hospederos. El manejo de la enfermedad que causa FOL es difícil, y actualmente la alternativa que se ofrece es la siembra de variedades resistentes (Janssen, 2002).

Una alternativa amigable con el medio ambiente para el control de esta enfermedad, es el uso de extractos de plantas. Algunos géneros de la familia *Heliantheae* producen diferentes tipos de alcanidas. Estos compuestos son amidas o esteres hidrofóbicos que contienen ácidos grasos insaturados como parte de su estructura química (Johns *et al.*, 1982). Se ha demostrado que las alcanidas tienen acción biocida, especialmente en algunos insectos, incluso sobre el parásito de humanos denominado *Schistosoma mansoni* (Frischkorm *et al.*, 1978).

H. longipes es miembro de la familia *Heliantheae*, presenta diferentes compuestos tóxicos como la afinina, que pertenece al grupo de las alcanidas (Molina *et al.*, 1995). La afinina es la alcanida mayoritaria en las raíces de esta planta y principal responsable de los efectos biológicos específicos observados, entre los que se pueden considerar la acción de anestésico local, el estímulo organoléptico, así como la actividad insecticida y bactericida; este compuesto tiene acción biocida sobre algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como en algunos hongos de la clase Ascomycetes (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 1996).

El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto crudo etanólico de *H. longipes* sobre un aislado de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* obtenido e identificado de raíces de plantas de tomate con síntomas de marchitez.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de *Fusarium spp.*

Los aislados de *Fusarium* se realizaron a partir de raíces de plantas de tomate enfermas obtenidas en el área de Silao, Guanajuato, México.

El aislamiento se realizó por la técnica de punta de hifa (Montiel *et al.*, 2005).

Identificación de *F. oxysporum f. sp. lycopersici*

Los aislados con características morfológicas macroscópicas semejantes al género *Fusarium*, fueron seleccionados para su identificación a nivel de género, en base a sus características morfológicas como: macroconidias en forma de canoa, micelio, clamidiosporas y esporoquios correspondientes a *Fusarium sp* de acuerdo con las claves de Nelson *et al.*, (1983). Los aislados seleccionados con características del género *Fusarium*, fueron sembrados inicialmente en PDA, cuando estuvo la caja totalmente invadida por el crecimiento, se agregaron 10 ml del líquido crioprotector (glicerol al 10% / leche descremada al 5%) y se raspó el micelio hasta que se desprendiera y se mezclara con el líquido. Posteriormente, se colocó esta mezcla en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles, y se almacenaron a -72°C (Henaó *et al.*, 2006).

Para llevar a cabo la identificación de *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, se realizó la extracción de ADN de las cepas de *Fusarium*, se llevó a cabo utilizando la técnica de Lee *et al.* (2000). Para la identificación de FOL por medio de PCR, se utilizaron los primers CNL12 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') y CNS 1 (5'-GAGACAAGCATATGACTACTG-3') que codifican para un fragmento de la región intergénica ribosomal (IGS) ubicada entre la subunidad pequeña y la subunidad grande. La temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 1 min, seguida de la temperatura de anillamiento de 54°C por 1 min y la temperatura de

extensión a 72°C por 2 min (Hyun *et al.*, 2001). Los productos de PCR obtenidos (2.6 kb) fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%.

Evaluación de patogenicidad

Esta prueba se utilizó para comprobar la reproducibilidad de la enfermedad inoculando las cepas aisladas en plantas de tomate, aplicando los postulados de Koch.

Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersici*) tipo Saladett variedad Río grande. Las semillas se desinfectaron y se sembraron en charolas con una mezcla de turba: perlita a una proporción de 1:1. Las charolas se regaron cada tres días. Cuando las plantas tenían una edad de cinco semanas o cinco a seis hojas verdaderas, fueron inoculadas colocando 4 explantes de 6 mm de diámetro cerca de las raíces, las que fueron cortadas en las puntas con tijeras estériles (Benhamou and Belanger 1998). Se inocularon cuatro repeticiones (plantas) por cada aislado.

Se midió incidencia y severidad utilizando la escala de Diener (Diener and Ausubel 2005). La cual indica las categorías siguientes: 0 planta muerta; 1 las hojas viejas muertas, las jóvenes crecimiento detenido; 2 las hojas viejas cloróticas, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 3 hojas viejas tienen clorosis vascular, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 4 los peciolo de las hojas con crecimiento detenido; 5 no hay síntomas visibles.

Actividad inhibitoria del extracto de *H. longipes*

El extracto de *H. longipes* se elaboró con las raíces secas y molidas de esta planta colectadas en la Sierra Gorda de Guanajuato. Para obtenerlo, se usó una proporción de 1:10, esto es 1 g de raíz macerada por cada 9 ml de solvente, el cual fue etanol al 98%. El extracto se obtuvo al exponer el tejido macerado al solvente a temperatura ambiente durante 30 días. El extracto crudo se filtró con un papel filtro Whatman No. 1 y se concentró en Rotavapor (IKA). La determinación de la concentración de afinina se llevó a cabo por medio de HPLC, donde la afinina se purificó a partir del extracto crudo mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre capas de vidrio 20x20 cm cubiertas con una capa de gel de sílice de aproximadamente 0.5 mm de espesor. Las placas se llevaron a cabo con el sistema de solventes constituidos por una mezcla de hexano:acetato de etilo (2:1 v/v), posteriormente se secaron a temperatura ambiente y se asperjaron con una solución de fluoresceína al 0.02% y se observó bajo luz ultravioleta. La retención relativa de la afinina es de 0.5, dicha banda se colectó y se eluyó con acetato de etilo, el cual posteriormente se evaporó. La fracción se resuspendió en etanol y se analizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), en una columna C18, como fase móvil se utilizó acetonitrilo:agua en un gradiente de 40 a 70%, con un tiempo de corrida de 40 minutos a un flujo de 1 ml/min. El tiempo de retención fue de 23 minutos correspondiente a la afinina. (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000). El extracto fue almacenado en oscuridad a 4°C.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* se utilizaron 5 concentraciones del extracto con base a la cantidad de afinina (75, 150, 300, 600 y 1200 µg/ml), cada concentración se agregó a medio PDA, se colocó un explanta de 6 mm de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* y se incubó a 28°C. El diámetro del micelio se midió cada 24 horas, hasta que el control alcanzó el límite del borde de la caja petri. Se realizaron 10

repeticiones de cada concentración con un diseño completamente al azar. Se determinó la CMI con el programa PROBIT SAS 9.1 y se realizó un ANOVA y prueba de medias en GraphPad 3.0.

RESULTADOS

Identificación de *F. oxysporum f. sp. lycopersici*

Como resultado del aislamiento de *Fusarium* según su morfología macro y microscópica se obtuvieron 17 aislados. Nueve de ellos (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 y 17) fueron identificados como *F. oxysporum f. sp. lycopersici* por medio de amplificación por PCR, usando los primers CNL12 y CNS1 (Figuras 1). El fragmento amplificado por PCR fue de 2.6 kb, este fragmento corresponde a *F. oxysporum f. sp. lycopersici* acorde con lo reportado por Hyun *et al.*, (2001). Aunque Alves-Santos *et al.*, (1999) reporta que existen dos IGS en aislados de *F. oxysporum*, la IGS pequeña (2.55 kb) y la grande (2.6 kb).

Patogenicidad

La incidencia de la enfermedad fue mayor al 75% en la mayoría de los aislados (Tabla 1). La severidad varió de 0-5 con respecto a la escala de Diener. Mostrando una gran variación en virulencia en los diferentes aislados, lo que se manifestó en la severidad de los síntomas. El experimento tuvo un diseño completamente al azar, los resultados se analizaron estadísticamente en Minitab mediante la Prueba de Kruskal-Wallis mostrando diferencia significativa entre tratamientos entre los tratamientos (valor de $p= 0.0002$).

Efecto inhibitorio

Para la prueba *in vitro* de inhibición del extracto de *H. longipes* sobre *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, se seleccionó el aislado 10 (el cual se denominó FOL 10), ya que fue positiva en la identificación por PCR, y fue la cepa que presentó la sintomatología más severa en la prueba de patogenicidad, el valor de severidad fue de 0 (planta muerta).

El extracto de *H. longipes* se concentró un 95% y la cantidad de afinina fue de 5.5 mg/ml. El aislado identificado con el número 10, que fue el que mostró mayor severidad en el daño, se usó para determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *H. longipes* sobre *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. En la Figura 4 se muestran los porcentajes de inhibición de las diferentes concentraciones de afinina en extracto de *H. longipes* sobre FOL. Las dosis de 600 y 1200 µg/ml de afinina presentaron una inhibición del 100%. La dosis letal media (DL₅₀) fue de 164.2 con límites fiduciales de 133.9 -199.9 µg/ml (corresponde al 95% de confiabilidad), y la dosis letal 90 (DL₉₀) fue de 348.6 (límites fiduciales de 273.3- 524.2) µg/ml.

La concentración de 600 µg/ml, presentó un 100% de inhibición al final de la prueba, cuando el testigo absoluto invadió toda la caja petri. Después de 32 días, a la misma temperatura de incubación, se presentó crecimiento de FOL 10, por lo que el porcentaje de inhibición disminuyó a 89%. Los resultados obtenidos nos muestran que el extracto de *H. longipes* se comporta como agente fungistático.

Los resultados de la prueba del efecto inhibitorio con respecto a la cinética de crecimiento radial de FOL 10, muestran que la producción del micelio en presencia de las diferentes concentraciones del extracto de *H. longipes* es menor que el producido en el testigo absoluto (Figura 5).

Otra forma de representar la cinética es considerando el incremento en el número de células en un intervalo corto de tiempo. El incremento del número de células por unidad de tiempo es proporcional al número de células presentes en el cultivo. A la constante de proporcionalidad (μ) se le denomina tasa específica de crecimiento (TEC), que se define como la velocidad específica de crecimiento microbiano, dado por el inverso del tiempo. En la Tabla 2, se muestran las ecuaciones lineales de cada tratamiento obtenidas de la cinética de crecimiento, y la TEC de FOL 10; para las concentraciones de 600 y 1200 $\mu\text{g/ml}$ de afinina (0 día^{-1}) hay una disminución del 100% con respecto al testigo absoluto (0.6775 día^{-1}), y en la de concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ de afinina (0.165 día^{-1}) hay una disminución del 24.3% con respecto al testigo absoluto (0.6775 día^{-1}).

DISCUSIÓN

Actualmente se ha estado estudiado el efecto fungistático de la afinina sobre algunos microorganismos, en el presente trabajo obtuvimos una inhibición del 90% sobre el crecimiento de la cepa de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* con una dosis de 348 $\mu\text{g/ml}$ de afinina, en contraste, Díaz (2006) reporta un 62% de inhibición en el crecimiento de una cepa de *F. oxysporum f.sp. lycopersici* a una dosis de 300 $\mu\text{g/ml}$ de afinina.

Respecto a otros microorganismos, Ramírez-Chávez *et al.*, en el 2000 reporta que se requieren 25 µg/ml de afinina para inhibición del 90% sobre el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* y 28 µg/ml para *Sclerotium cepivorum*; para *Fusarium sp* una inhibición del 38% del crecimiento con 150 µg/ml de afinina, para *Rizoctonia solani* AG-3 un 100% de inhibición con 150 µg/ml de afinina y *Verticillium sp* 45% de inhibición a la misma concentración (Molina *et al.*, 2004).

Esto nos indica que la acción fungistática de la afinina, varía de manera considerable según el microorganismo que se evalúe.

La TEC de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* 10 con las concentraciones 600 y 1200 µg/ml de afinina mostró una disminución del 100% con respecto al testigo absoluto, en comparación con Fimbres *et al.*, en el 2010 que reporta una reducción del 66% en la TEC de *F. verticillioides* en presencia del extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa*. Se considera además que la tasa específica de crecimiento depende únicamente de la concentración de sustrato y presenta inhibición con altas concentraciones del mismo, tal como sucede con muchas sustancias tóxicas a nivel de pared celular, de membrana celular, de sistema de transporte, de replicación de ácidos nucleicos, de síntesis de proteínas, entre otros procesos importantes en el ciclo celular (Vargas *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción de la afinina como fungicida o fungistático todavía se desconoce. Pudiera ser por la inhibición de la actividad de la enzima hidroxidecanoil-deshidratasa (HDDasa), esta enzima inicia la ruta de desaturación de ácidos grasos (ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico) y es inhibida específicamente por el 3-decinoil-N-acetil cisteamina (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000).

Aunque el compuesto mayoritario del extracto de *H. longipes* es la afinina, es posible que participen otros compuestos bioactivos presentes en el extracto crudo. Sobre ello, Ramírez-Chávez *et al.* (2000) reportaron diferencias entre la afinina purificada y el extracto crudo, en cuanto a su capacidad de reducir la acumulación de los ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico y linoleico) en el micelio de *S. rolfsii*. De igual manera, el efecto inhibitorio se puede deber a la presencia de metabolitos secundarios, como los alcaloides y fenoles, producidos por las plantas como defensa ante el ataque microbiano, en este caso los hongos, por lo que han sido nombrados por algunos autores como compuestos antifúngicos (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2000). Una de las ventajas de obtener sustancias tales como la afinina, producidas por biosíntesis de plantas, es que no tienen efectos secundarios conocidos en el ecosistema, dado que pueden ser metabolizados por uno u otro organismo, a diferencia de los fungicidas químicos comúnmente aplicados hasta ahora.

CONCLUSIÓN

Se lograron obtener 9 aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, los cuales mostraron una gran variación en virulencia. Se demostró el efecto inhibitorio del extracto crudo de *H. longipes* sobre FOL 10, mostrando que a concentraciones de 600 y 1200 µg/ml de afinina se presentó una inhibición del 100% y un valor de TEC para estas concentraciones de 0 días⁻¹. Esto nos indica el potencial de inhibición que tiene el extracto de *H. longipes* sobre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* que es un patógeno importante del cultivo tomate.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alves-Santos, F.M., E.P. Benito, A.P. Eslava, and J.M. Diazminguez.1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. Environ.Microbiol.* 3335-3340.

Benhamou Nicole and Belanger Richard (1998). Benzothiadiazole-Mediated Induced Resistance to *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* in Tomato1. *Plant Physiol.* 118: 1203–1212

Díaz Heredia Miguel (2006) Caracterización molecular y alternativas de control de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Sacc.) W.C. Shyder y H.N. Hans del estado de Nayarit. Tesis de Maestría. Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Diener Andrew C. and Ausubel Frederick M (2005). Resistance To *Fusarium Oxysporum* 1, a Dominant Arabidopsis Disease-Resistance Gene, Is Not Race Specific. *Genetics* 171: 305–321

Fiembres F., Plascencia M., Aldana L., Robles R., Cortez M.O. (2010) Efecto de extractos de plantas silvestres en el desarrollo de *Fusarium verticillioides*. VII Congreso del Noroeste y III Nacional de Ciencias alimentarias y Biotecnología.

Frischkorm CG, Frischkorm HE, Carrazzoni E. (1978) Cercaricidal activity of some essential oils of plants from Brazil. *Naturwissensehaften*; 65:480-483.

Henao I., Franco Correa M. and Marin G. (2006). Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas Scientiarum* 11 (2) 51-60.

Hernández Albiter R., Barrera Necha L., Bautista Baños S., and Bravo Luna L. (2007) Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. Y Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología, 25 (2):180-185.

Hyun-Jung Kim, Yong-Keel Choi, y Byung-Re Min (2001) Variation of the Intergenic Spacer (IGS) Region of Ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae specials. The Journal of Microbiology 39 (4): 265-272

Janssen D. (2002). Tomatoes: Possible Causes of Sudden Wilt and Deathfile University of Nebraska <http://lancaster.unl.edu/hort/Articles/2002/TomatoWilt.htm>

Johns T., Graham K, Towers GHN. (1982) Mulluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the Asteraceae. Phytochemistry 21:2737-2738.

Lee, Young-Min, Choi Y.K, y Min B.R. (2000). PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. J. Microbiol. 38: 66-73.

Molina Torres G, Salgado Garciglia R, Ramírez Chavez E. (1995) Presence of the bornyl ester of deca-2E-6Z-8E-trienoic acid in *Heliopsis longipes* J Nat Prod 58:1590-1591.

Molina Torres G, Salgado Garciglia R, Ramírez Chavez E, Del Rio REN. (1996) Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. Biochem Syst Ecol 24:43-47.

Molina Torres Jorge, Salazar Cabrera Carlos Junior, Armenta Salinas Concepción y Ramirez Chavez Enrique (2004) Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alkamides from *Heliopsis longipes* Roots: Affinin and Reduced Amides. J. Agric. Food Chem. 52: 4700-4704.

Montes Belmont R., Cruz Cruz V., Martínez Martínez G., Sandoval Garcia G., García Licona R., Zilch Domínguez S., Bravo Luna L., Bermúdez Torres K., Flores Moctezuma H. and Carvajal Moreno M. (2000) Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo en investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18 (2): 125-131.

Montiel González Lucero, González Flores Francisco, Sánchez García Bertha María, Guzmán Rivera Sergio, Gámez Vázquez Francisco Paúl, Acosta Gallegos Jorge Alberto, Rodríguez Guerra Raúl, Simpson Williamson June, Cabral Enciso Mariandrea and Mendoza Elos Mariano (2005). Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus Vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1) 1-7.

Nelson Paul E., Toussoun T. A. y Marasas W. F. O. (1983) *Fusarium* Species, An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. p

Ramirez-Chavez E., Lucas-Valdez L. Virgen-Calleros G., y Molina-Torres J. (2000) Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*. 34- 002 207-215

Alejandro Vargas, Jaime Moreno, Germán Buitrón (2002). Estrategia de control de tiempo óptimo para un Sbr usando aprendizaje iterativo. Coordinaciones de Automatización y Bioprocesos Instituto de Ingeniería, UNAM.
www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/peru/mextar060.pdf

Ward, E. W. B. (1986) Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to Fungi. *Biology and Molecular Biology of Plant Pathogen Interactions*. Springer-Verlang. Berlin-Herdelberg p. 107-131

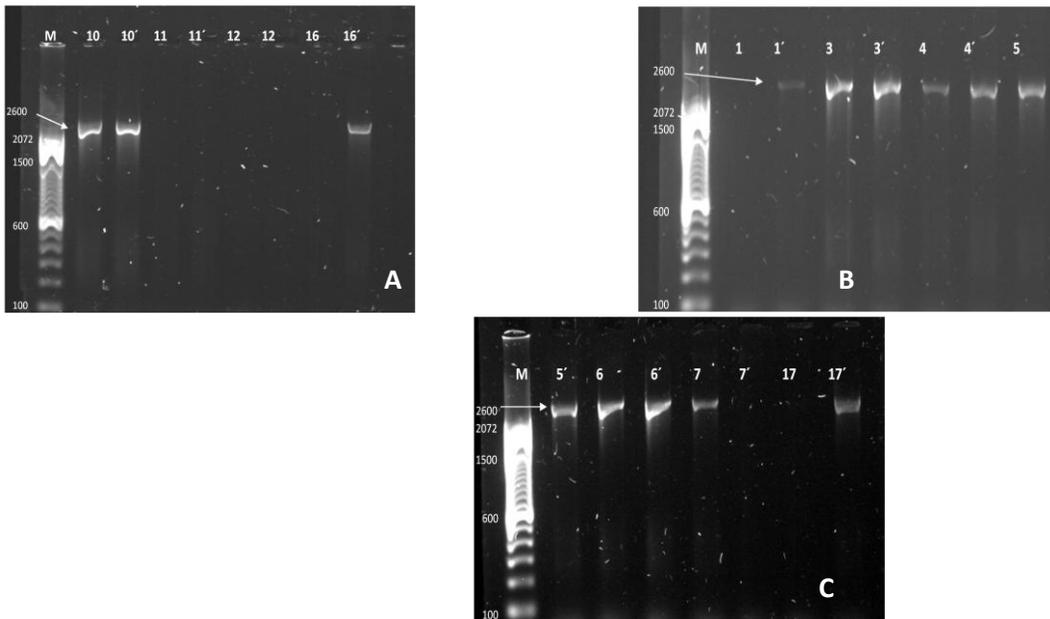


Figura 1: Identificación de *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, mediante PCR utilizando los primers CNL12 y CNS1 en gel de agarosa al 2%. **A.** Carril 1: Marcador molecular, carril 2 y 3: aislado 10 (10' es una repetición de aislado 10), carril 4 y 5: aislado 11 (11' es una repetición de aislado 11), carril 6 y 7: aislado 12 (12' es una repetición de aislado 12), carril 8 y 9: aislado 16 (16' es una repetición de aislado 16). **B.** Carril 1: Marcador molecular, carril 2 y 3: aislado 1 (1' es una repetición de aislado 1), carril 4 y 5: aislado 3 (3' es una repetición de aislado 3), carril 6 y 7: aislado 4, carril 8: aislado 5). **C.** Carril 1: Marcador molecular, carril 2: aislado 5 (5' es una repetición de aislado 5), carril 3 y 4: aislado 6 (6' es una repetición de aislado 6), carril 5 y 6: aislado 7 (7' es una repetición de aislado 7), carril 7 y 8: aislado 17 (17' es una repetición de aislado 17).

AISLADO	SEVERIDAD	INCIDENCIA (%)
Testigo absoluto	5 _a	0 _c
Testigo relativo	5 _a	0 _c
0	3 _b	*100 _a
1	1 _c	100 _a
2	1 _c	*100 _a
3	2 _c	*100 _a
4	4 _b	*75 _b
5	3.5 ^{ab}	*100 _a
6	2.5 _{cb}	*100 _a
7	1.5 _c	*100 _a
8	5 _a	0 _c
9	2 _c	75 _b
10	0 _c	*100 _a
11	5 _a	0 _c
12	1.25 _a	100 _a
13	5 _a	0 _c
14	0.75 _c	100 _a
16	2 _c	100 _a
17	1.25 _c	*100 _a

Tabla 1: Incidencia y severidad de 17 aislados de *F. oxysporum f. sp lycopersici*, en plántulas de tomate.

* Aislamientos que se identificaron como *F. oxysporum f. sp. lycopersici* por métodos moleculares.

Los valores seguidos de literales iguales, no tienen diferencia significativa (prueba de de Mood con un nivel de confianza del 95%, Minitab)

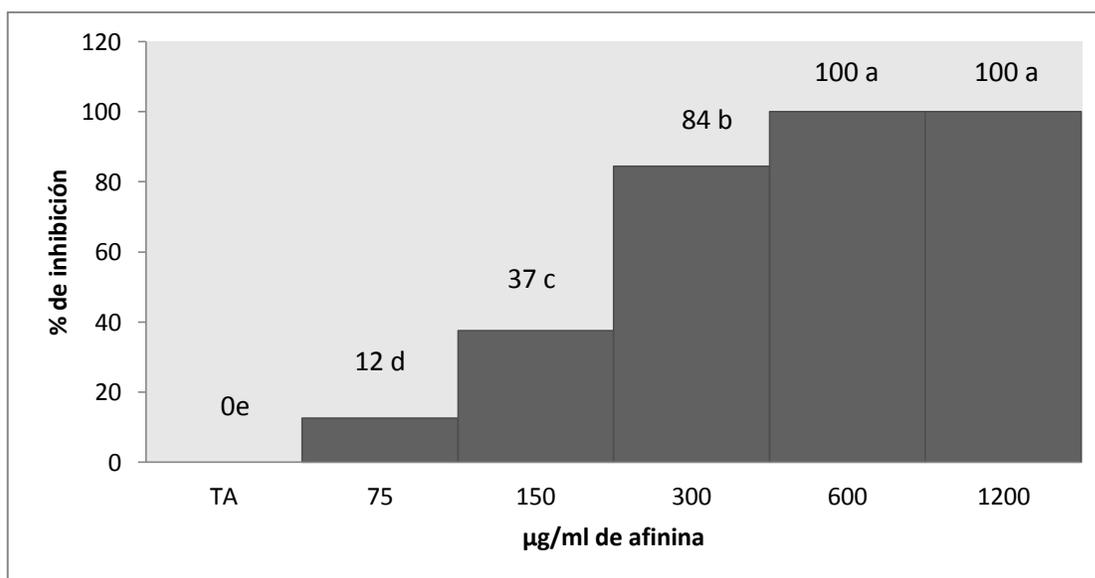


Figura 4: Porcentaje de inhibición del extracto crudo concentrado de *H. longipes* sobre *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.

Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellas (prueba de media por Tukey $\alpha \leq 0.05$, GraphPad 3.0)

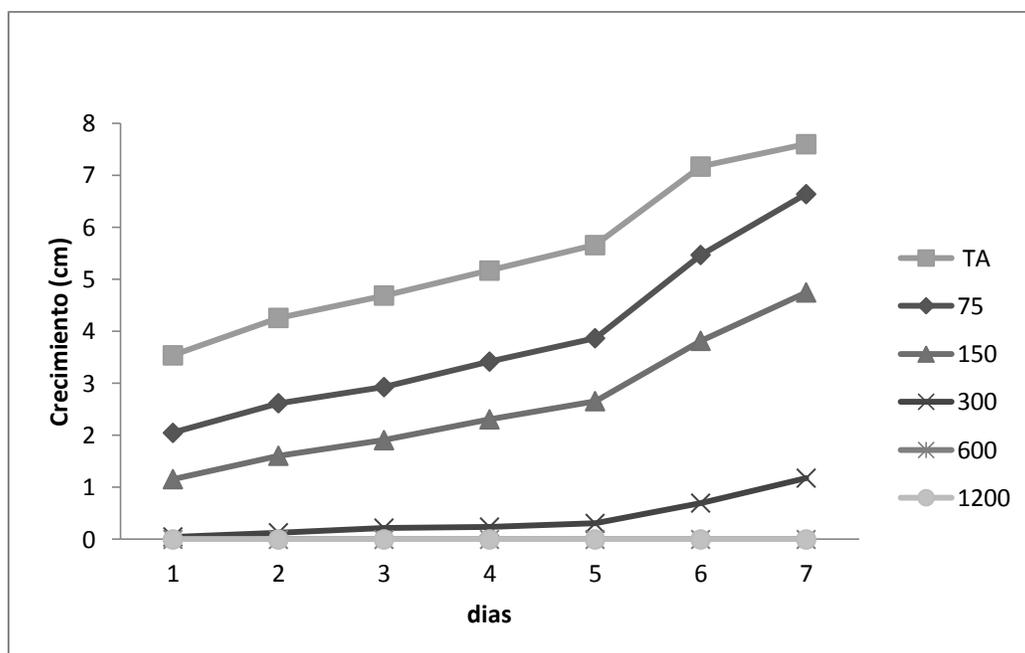


Figura 5: Cinética de crecimiento (diámetro) de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* 10 en medio PDA con las diversas concentraciones de afinina del extracto de *H. longipes*.

TRATAMIENTOS	ECUACION Lineal	Tasa específica de crecimiento
TA	$y=0.6775x+2.7314$	0.6775 día^{-1}
75 ppm	$y=0.7289x+0.9414$	0.72289 día^{-1}
150 ppm	$y=0.5693x+0.3257$	0.5693 día^{-1}
300 ppm	$y=0.165x+0.2557$	0.165 día^{-1}
600 ppm	$y=0$	0 día^{-1}
1200 ppm	$y=0$	0 día^{-1}

Tabla 2: Tasa específica de crecimiento de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* 10 en presencia del extracto etanólico de *H. longipes*.

ARTICULO 2

Respuesta de defensa estructural del extracto de *Heliopsis longipes* sobre el patosistema: tomate – *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.

González- Morales Susana*¹, Pérez-Delgado Hortencia¹, Benavides- Mendoza Adalberto², Rodríguez-Campos Edmundo M.³ y Flores-Olivas Alberto¹

1. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Departamento de Parasitología Agrícola. 2. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Departamento de Horticultura. 3. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Departamento de Ciencias Básicas. *Autor para correspondencia: aflooli50@gmail.com; aflooli@uaaan.mx

Palabras claves: afinina, elicitor, cortex, médula.

RESUMEN

Se estudió el efecto del extracto de *H. longipes* sobre plantas de tomate susceptibles a *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. La severidad de los síntomas se redujo un 70% en las plantas asperjadas con *H. longipes*. En las características agronómicas se presentó un incremento del 56% en altura de planta, 84% en longitud de raíz, 186% en peso seco de hoja, 177% en peso seco de tallo y 502% en peso seco de raíz en las plantas asperjadas con el extracto; de igual manera se presenta un aumento en el área de córtex y disminución de área de médula en tallo y raíz de plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*.

INTRODUCCIÓN

El tomate es uno de los cultivos más importantes desde el punto de vista económico y productivo, y se ha destacado en los últimos años por la incorporación constante de tecnologías para su producción, siendo frecuente el uso de fertilizantes químicos en grandes cantidades (Rabie *et al* 2004). La marchitez vascular producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es la principal enfermedad que causa problemas en el cultivo. Causando la disminución en un 60% del rendimiento, y afecta la calidad del producto. (Jones *et al.*, 1991). Se reconocen tres razas del patógeno (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) que se distinguen por su virulencia en materiales diferenciales de tomate, y que contienen diferentes genes de resistencia (Cai *et al.*, 2003).

En su afán por contrarrestar el ataque de plagas y maximizar la producción, la agricultura moderna es altamente dependiente de insumos y plaguicidas sintéticos. Esto ha traído enormes problemas para la salud animal y humana con un impacto ambiental cada vez creciente. Lo anterior, ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de enfermedades y plagas agrícolas, basados: (1) en el biocontrol empleando bioproductos de origen vegetal, animal o microbial, explorando el potencial presente en los metabolitos secundarios y (2) con los avances de la resistencia sistémica inducida o adquirida (Riveros *et al.* 2004).

Las alcanidas son metabolitos ampliamente distribuidos en diferentes familias de plantas, encontrándose en mayor cantidad en raíces de *Heliopsis longipes* (nombre común Chilcuague), siendo su principal constituyente bioactivo y la molécula responsable de los

principales efectos biológicos, la afinina (Molina y García, 2001). La planta de *H. longipes* ha sido utilizada entre la población como saborizante, anestésico local e insecticida (Little, 1948). Otras actividades biológicas que se han atribuido a *H. longipes* son: actividad antiviral, en el tratamiento de las aftas bucales y de algunas variedades de herpes; actividad fungicida, en el tratamiento de pie de atleta; actividad molusquicida y en el tratamiento de algunos parásitos intestinales.

En ensayos preliminares de los compuestos bioactivos de la raíz se ha observado una importante acción inhibitoria de las alcaloides de *H. longipes* sobre el desarrollo de cultivos *in vitro* de *Escherichia coli*, *Pseudomonas solanacearum*, *Bacillus subtilis* y *Sacharomyces cerevisiae* y algunos fitopatógenos como *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Erwinia carotovora*, *Rizhoctonia solanii*, *Phytophthora infestans*, *Botritis sinerea* y *Verticillum sp* (Molina y García, 2001).

De igual manera se ha demostrado en ensayos *in vitro* se demostró que la afinina promueve el crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, estimulando la aparición de brotes, el crecimiento e incremento en la biomasa de raíces, así como la formación de raíces laterales y elongación de pelos radiculares (Montaño *et al.*, 2006).

METODOLOGÍA

Aislamiento de *Fusarium spp.*

Los aislados de *Fusarium* se realizaron a partir de raíces de plantas de tomate enfermas obtenidas en el área de Silao, Guanajuato, México.

El aislamiento se realizó por la técnica de punta de hifa (Montiel *et al.*, 2005).

Extracto de *H. longipes*

El extracto de *H. longipes* se elaboró con las raíces secas y molidas de esta planta colectadas en la Sierra Gorda de Guanajuato. Para obtenerlo, se usó una proporción de 1:10, esto es 1 g de raíz macerada por cada 9 ml de solvente, el cual fue etanol al 98%. El extracto se obtuvo al exponer el tejido macerado al solvente a temperatura ambiente durante 30 días. El extracto crudo se filtro con un papel filtro Whatman No. 1 y se concentró en Rotavapor (IKA). La determinación de la concentración de afinina se llevó a cabo por medio de HPLC (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000).

Prueba *in vivo*

La prueba *in vivo* se llevó a cabo con plantas de tomate de 5 a 6 hojas verdaderas de la variedad Río Grande, sembradas en charolas de plástico con turba: perlita, a una proporción 1:1. La prueba se dividió en 6 tratamientos: Testigo absoluto (TA), Testigo infestado con FOL (FOL), Plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* (HL), Plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con FOL (HL+FOL), Plantas asperjadas con el producto Control + (C+), Plantas asperjadas con el Control e inoculadas con FOL (C++FOL).

Se aplicó el extracto etanólico de *Heliopsis longipes* a una dosis de 300 ppm de afinina y el Control comercial positivo a una dosis de 250 ml/Ha a las plantas de tomate, por aspersión. Cuatro días después, se inocularon las plantas de los tratamientos FOL, HL+FOL Y C++FOL, utilizando la técnica de inmersión de raíces en una solución de esporas de FOL DE 1×10^6 esporas/ml durante 15 minutos.

Para los ensayos histopatológicos se tomaron muestreos, cada uno con 10 repeticiones por tratamiento, uno a los tres días después de la aplicación del extracto de *H. lonigpes* y otro a los tres días después de la inoculación con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL 10). Veinte días después de la inoculación, se tomaron los datos de incidencia y severidad (Escala de Diener, 2005), así como muestras para medir peso seco de raíz tallo y hojas y altura de raíz y longitud de raíz, utilizando 20 repeticiones por tratamiento.

Escala de Diener: 0 Planta muerta; 1 Las hojas viejas muertas, las jóvenes crecimiento detenido; 2 Las hojas viejas cloróticas, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 3 Hojas viejas tienen clorosis vascular, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 4 Los peciolo de las hojas con crecimiento detenido; 5 No hay síntomas visibles.

Estudio histopatológico

Deshidratación. El tejido de raíces y tallos fue deshidratado con una solución de alcohol etílico al 95% y posteriormente con un solvente cuyo componente principal es el xilol. Alcohol al 50%, 60%, 70%, 85%, 95% + eosina, alcohol absoluto 1 y 2, xilol-alcohol absoluto 3-1, 1-1, 1-3, xilol puro 1, xilol puro 2. El tejido cortado se sumergió por espacio de 2 horas en cada solución anterior.

Inclusión en parafina. Se colocaron los frascos cerrados con el material vegetal en la estufa a 35°C con xilol + parafina por 24 horas. Se cambió la temperatura a 45°C y se agregó más parafina a los frascos con el material vegetal, los frascos se cerraron y se incubaron por 24 horas, posteriormente se cambió la temperatura a 50°C y se hizo un cambio de parafina pura vaciando la parafina con xilol en otro frasco. Se cambió la temperatura a 60°C y se hizo otro cambio de parafina pura incubando por 24 horas. Se prepararon los moldes de

aluminio de 9x12 cm, en donde el tejido y la parafina se solidificaron una vez que los tejidos tratados estuvieron dentro de la parafina con su etiqueta correspondiente.

Seccionamiento (cortes en el micrótopo). Se removi6 cuidadosamente del bloque de parafina un pedazo que contuviera el tejido que se deseaba seccionar, con una navaja de un solo filo, se removi6 la parafina en forma de “v” en los cuatro lados del bloque donde qued6 a la vista la muestra con el tejido.

Se coloc6 la platina con el tejido en el micrótopo. Se regularon las micras en el micrótopo las cuales fueron de 15 micras. La cinta de parafina obtenida con el tejido se mont6 en un portaobjetos utilizando el adhesivo de haupt y fijándolo con calor.

Tinción. Se utiliz6 la doble coloraci6n de safranina-fast green. Posteriormente se secaron las muestras y se montaron con Bálamo de Canadá. Las muestras se analizaron en un microscopio 6ptico (Carl Zeiss) con cámara integrada y con el programa Pixera Wiewfinder Pro, se observaron las muestras con los objetivos de 4x, 10x y 40x. Las mediciones de área total del lumen de xilema, área de córtex, medula y grosor de pared celular se midieron con el programa AxioVision LE Rel. 4.5

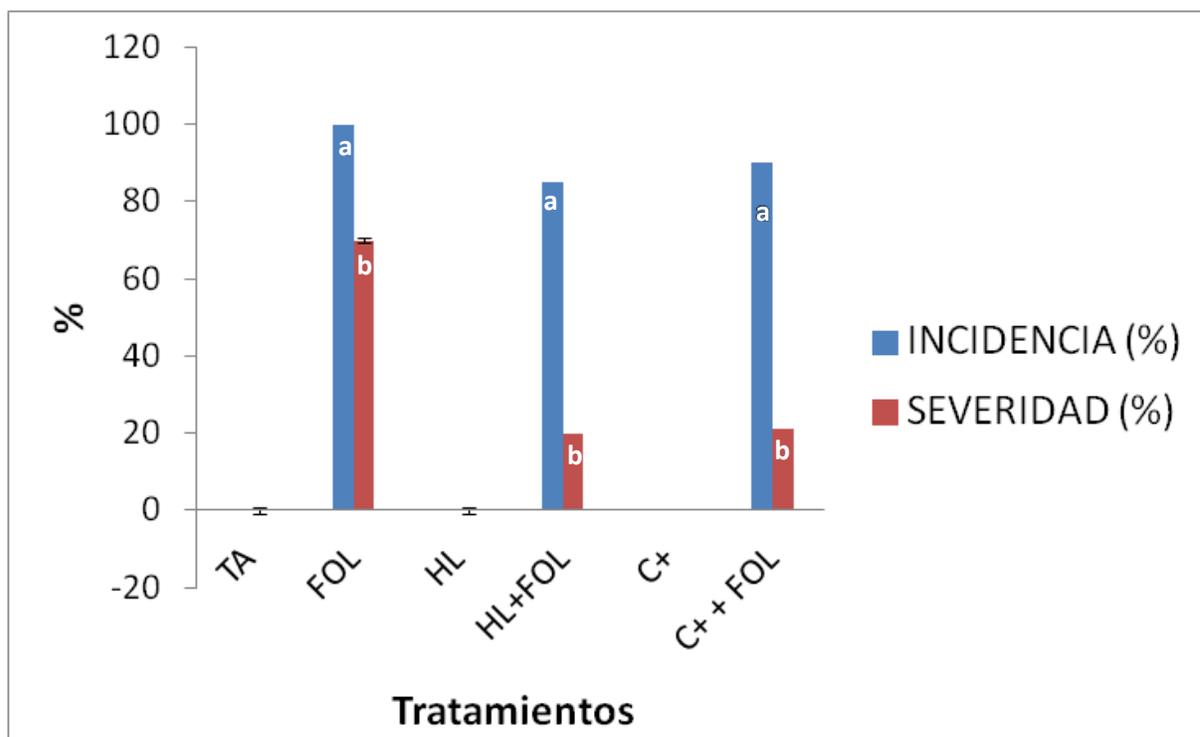
RESULTADOS

Los valores obtenidos de incidencia y severidad (Figura 1), nos indican un efecto positivo en cuanto al control de la enfermedad. Si bien, tanto los tratamientos asperjados con el extracto de *H. longipes*, así como el control positivo no presentaron diferencias significativas en incidencia respecto al testigo infestado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, sí existe una diferencia significativa en el nivel de severidad de síntomas, los cuales disminuyen tanto con la aplicaci6n del extracto, así como con la aplicaci6n del control

positivo, mostrando una disminución del 70 % en ambos tratamientos respecto al testigo infectado.

En general, podemos decir que la mayoría de las plantas de los tratamientos antes mencionados, mostraron síntomas visibles de marchitez por *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, éstos síntomas variaron en cuanto a la severidad de la enfermedad. Este comportamiento es típico de los productos que inducen resistencia en plantas. Ya que en general, la inducción de resistencia no es un método único para el combate de enfermedades y plagas, sino que debe combinarse con otras prácticas de control como la resistencia genética, las prácticas culturales, el control biológico y, a menudo, el uso reducido de plaguicidas (Walling 2001, Vallad y Goodman 2004, Urban y Lebeda 2006).

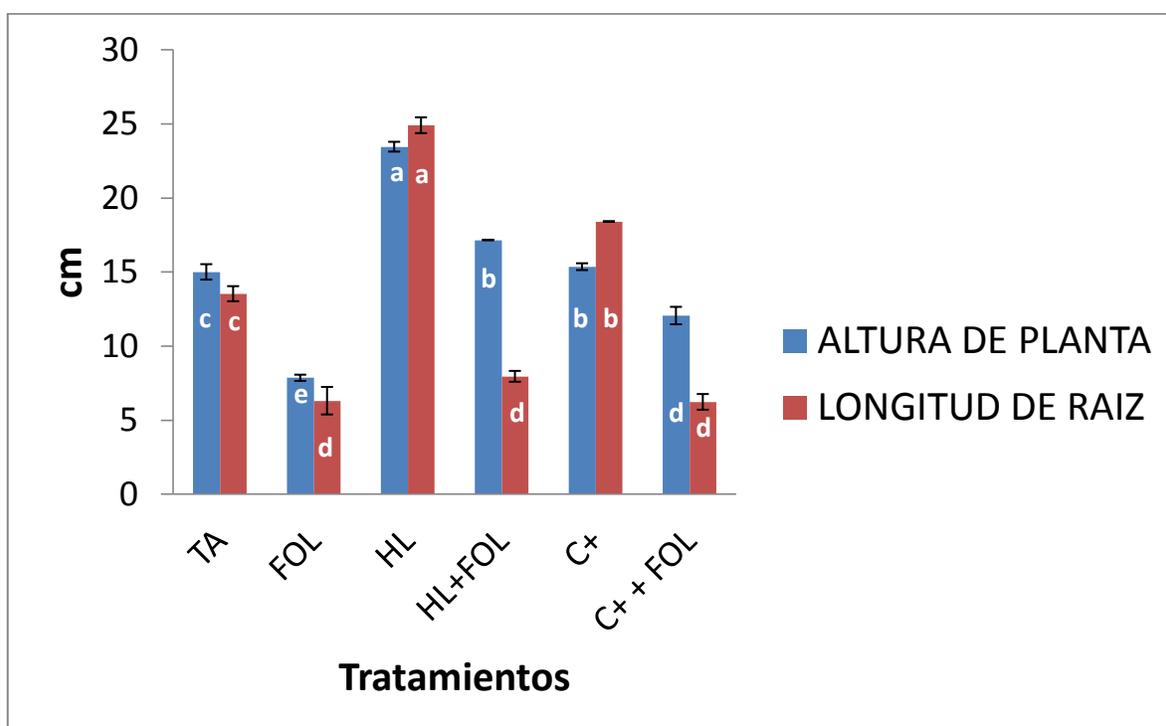
Figura 1: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la incidencia y severidad de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.1).



En la figura 2 se muestran los resultados del efecto de altura de planta y longitud de raíz (características agronómicas), los cuales mostraron que las plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* tuvieron un aumento del 56% en cuanto a la altura de planta, en contraste, con las plantas asperjadas con el control positivo que obtuvieron solo el 5% respecto al testigo absoluto. En la variable de longitud de raíz, las plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* tuvieron un aumento del 84%, en comparación con las plantas asperjadas con el control positivo que obtuvieron un aumento del 36% respecto al testigo absoluto.

Figura 2: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en características agronómicas como altura de planta y longitud de raíz, sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA=

Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.1).



Con respecto al peso seco de hojas, tallo y raíz (figura 3), las plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* presentaron un aumento del 186% en peso seco de hoja, en comparación con las plantas asperjadas que tuvieron un aumento del 18%; en peso seco de tallo, las plantas asperjadas con el extracto tuvieron un aumento del 177%, comparando con un aumento del 3% con las plantas asperjadas con el control positivo; y en peso seco de

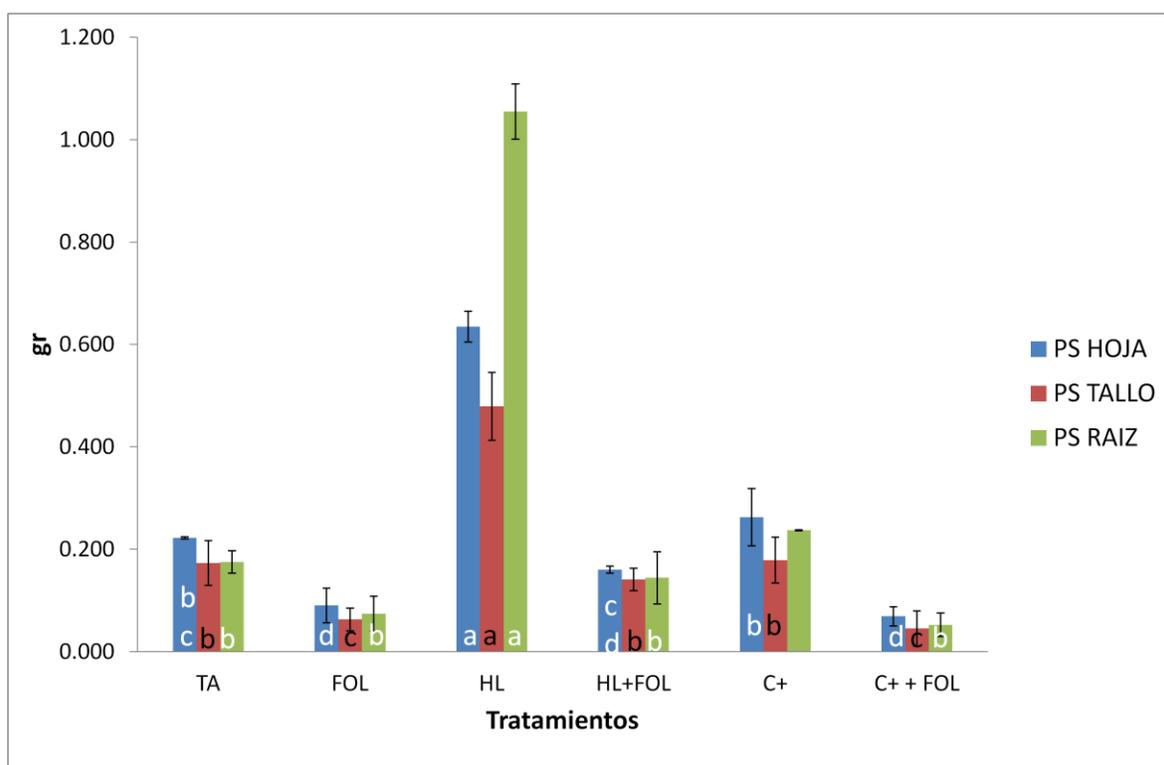
raíz, las plantas asperjadas con el extracto tuvieron un aumento del 502%, comparando con un 35% de las plantas asperjadas con el control positivo.

El efecto de desarrollo de biomasa de hojas, tallo y raíz se atribuye a la acción biológica de las alcaloides presentes en el extracto de *H. longipes*. Ya que Montaña et al. (2006) realizó pruebas *in vitro* donde demostró que la afinina promueve el crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, estimulando la aparición de brotes, el crecimiento e incremento en la biomasa de raíces, así como la formación de raíces laterales y elongación de pelos radiculares.

Por otro lado, Ramírez et al. (2004) indica que la afinina cambia la arquitectura de la raíz, un órgano muy importante para las plantas, ya que participa en el anclaje al suelo y en la absorción de agua y nutrientes minerales. Además, estimula la formación de hojas sobre los pecíolos, los cuales ayudan a definir la colocación de las hojas para evitar que se empalmen y puedan capturar eficientemente la luz requerida en el proceso de la fotosíntesis. Concentraciones mayores del compuesto causan la formación de callos sobre las hojas. Estos efectos indican que la afinina regula diferentes aspectos del desarrollo de la raíz y del follaje y puede ser considerada como fitohormona (López, 2007). Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas son sustancias orgánicas sintetizadas por las plantas que influyen en su crecimiento y desarrollo.

Figura 3: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en características agronómicas como peso seco de hoja, tallo y raíz, sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de

H. longipes e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey, $p>0.05$, SAS 9.1).



Para determinar el impacto en los cambios estructurales en tejidos de raíz y tallo de las plantas de tomate tratadas con el extracto *H. longipes*, se examinaron histológicamente por medio de Microscopia Óptica. En las figuras 4, 5, 6 y 7, se pueden observar las imágenes de raíz y tallo en los dos muestreos (segundo día después de la aplicación del extracto de *H. longipes* y cuarto día después de la inoculación) evaluados para analizar cambios

estructurales, utilizando los objetivos de 4x, 10x y 40x para la observación en el Microscopio óptico.

Figura 4: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en cambios histológicos de muestras de raíz por medio de Microscopía óptica (con objetivos de 4x, 10x y 40x), sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, al segundo día después de la aplicación del extracto de *H. longipes*. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, C+= plantas asperjadas con el control positivo.

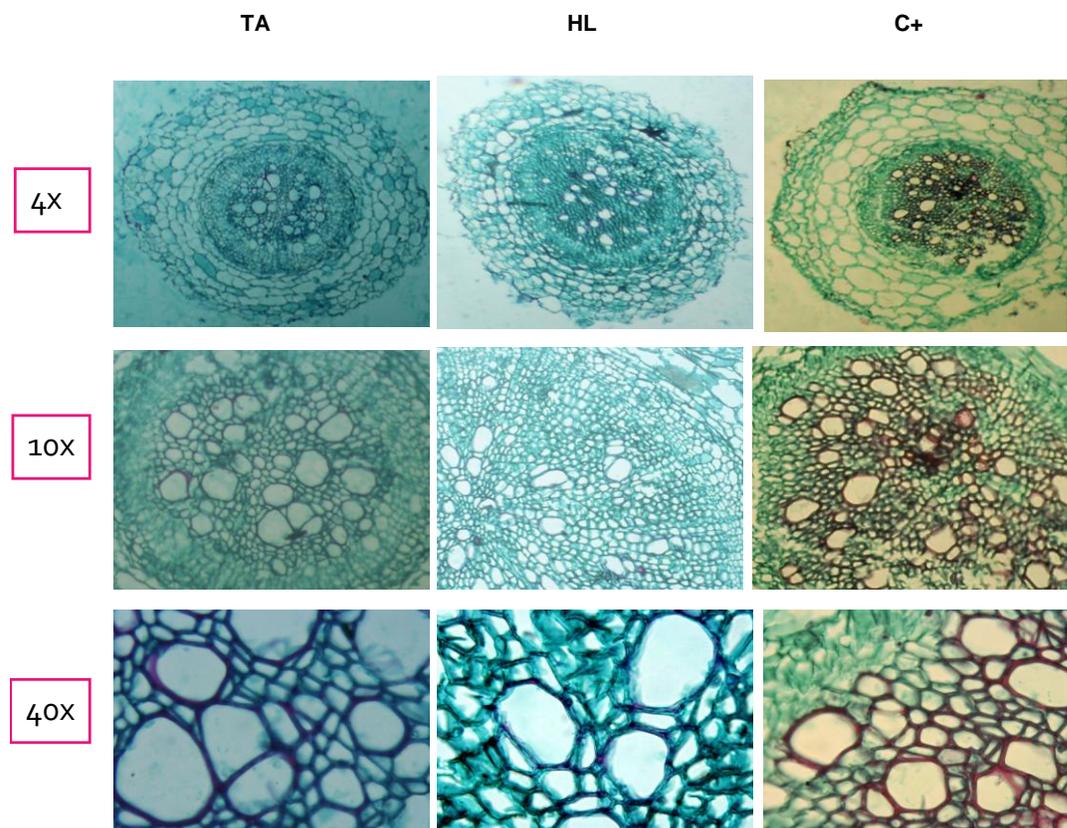


Figura 5: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en cambios histológicos de muestras de tallo por medio de Microscopía óptica (con objetivos de 4x, 10x y 40x), sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, al segundo día después de la aplicación del extracto de *H. longipes*. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, C+= plantas asperjadas con el control positivo.

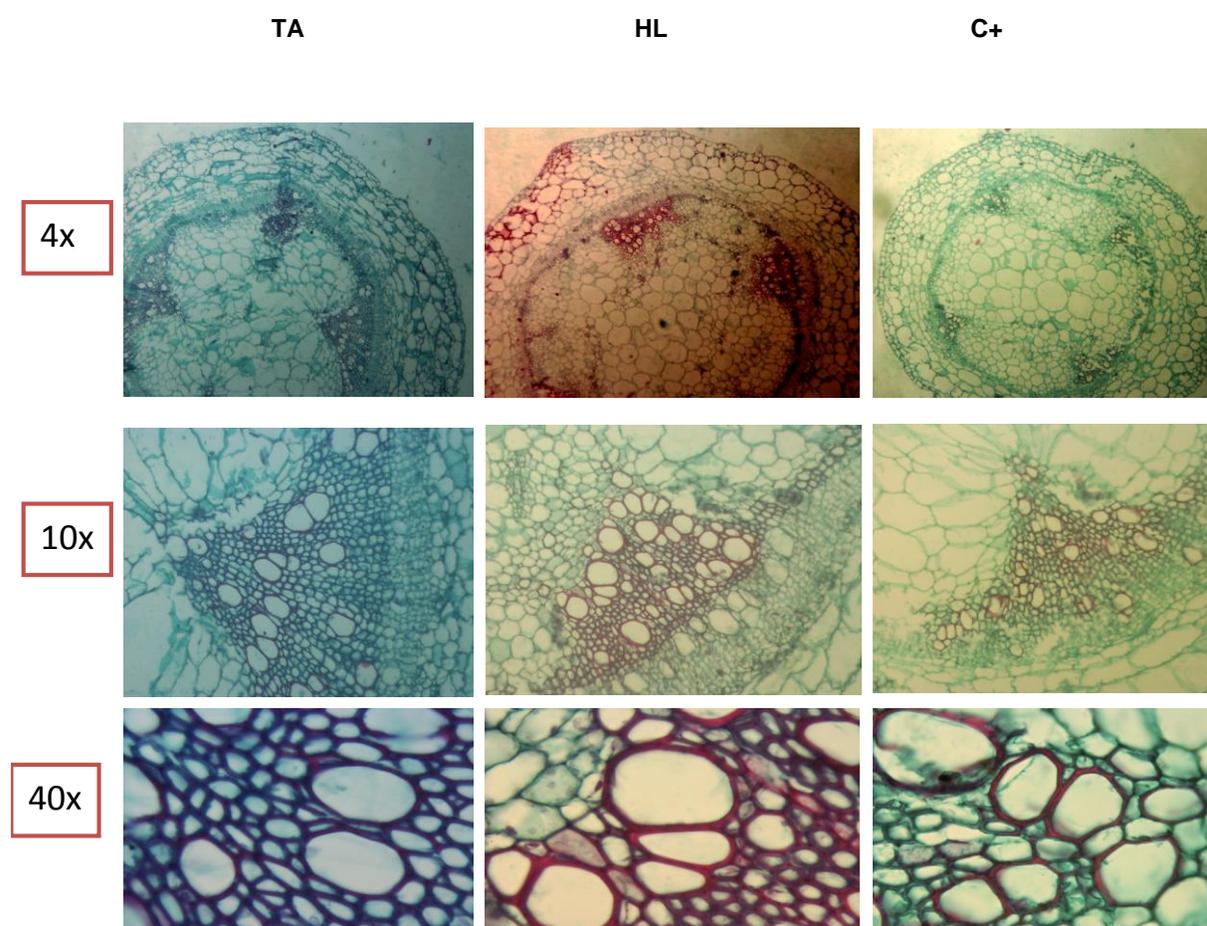


Figura 6: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en cambios histológicos de muestras de raíz por medio de Microscopía óptica (con objetivos de 4x, 10x y 40x), sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, al cuarto día

después de la inoculación con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, C+= plantas asperjadas con el control positivo.

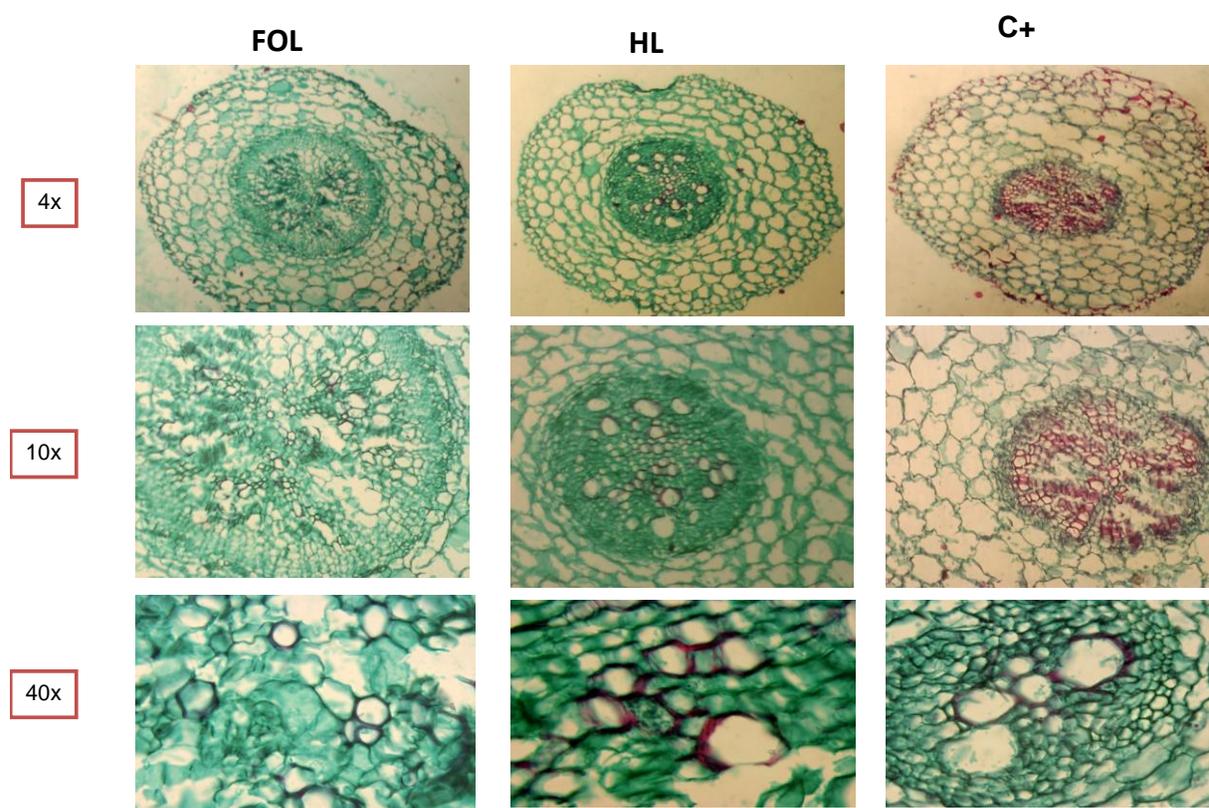
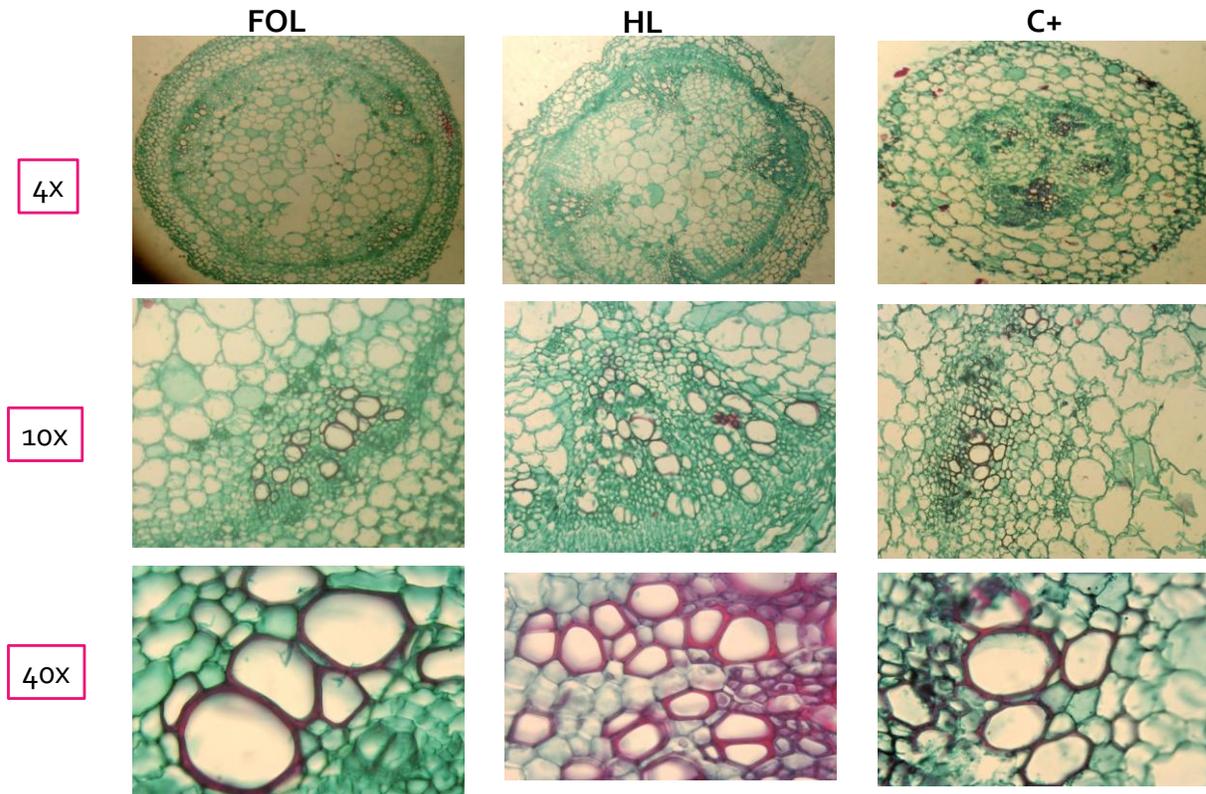


Figura 7: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en cambios histológicos de muestras de tallo por medio de Microscopía óptica (con objetivos de 4x, 10x y 40x), sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, al cuarto día después de la inoculación con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, C+= plantas asperjadas con el control positivo.



Como se muestra en la figura 8, no hubo diferencia significativa entre tratamientos en cuanto al área del lumen y grosor de pared celular del xilema.

Figura 8: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en el área del lumen de muestras de tallo y raíz, sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

TA, H y C+ son muestreos al segundo día después de la aplicación del extracto, TA*, F*, H*, H+FOL*, C+* y C+FOL* son muestreos al cuarto día después de la inoculación. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey, $p>0.05$, SAS 9.1).

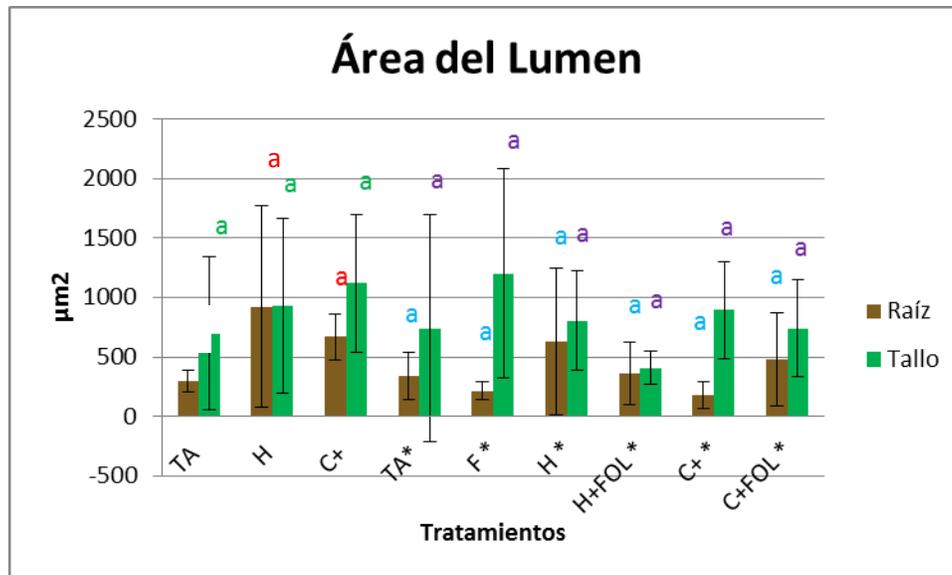
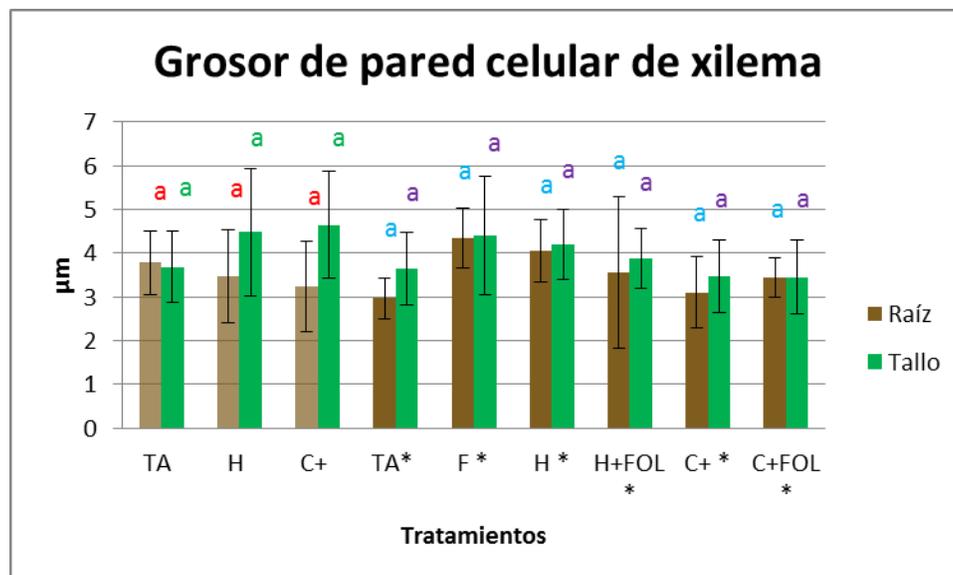


Figura 9: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en el grosor de pared celular del xilema de muestras de tallo y raíz, sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. TA, H y C+ son muestreos al segundo día después de la aplicación del extracto, TA*, F*, H*, H+FOL*, C+* y C+FOL* son muestreos al cuarto

día después de la inoculación. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.1).



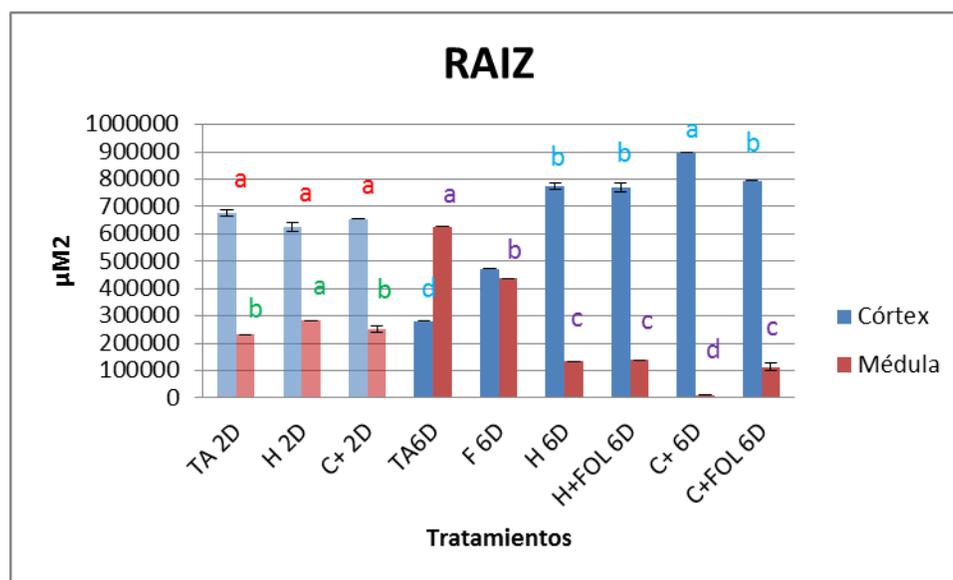
En la corteza (córteX), el sistema fundamental forma una zona bien diferenciada, está situada entre la epidermis y el cilindro vascular o central. El córtex presenta parénquima clorofiliano con grandes espacios intercelulares. La parte periférica presenta colénquima (Dicotiledónea) o esclerénquima (Monocotiledónea) o fibras formando anillos o bandas, la corteza almacena hidratos de carbono complejos como el almidón.

La medula es la masa central parenquimática sin cloroplastos, con abundantes espacios intercelulares. Puede destruirse tempranamente y dejar el tallo hueco en el sector de los entrenudos. El sector de los nudos la conserva. Sus células están especializadas en acumulación de reservas, depósitos de cristales o taninos. En algunas especies, cuando presentan crecimiento secundario, se desarrolla un sector externo de la medula con células más pequeñas y de paredes más gruesas lignificadas.

En la figura 10 se puede observar que en muestras de raíz no hubo diferencia significativa en el aumento de córtex en los tratamientos Testigo absoluto, plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* y plantas asperjadas con el control positivo, obtenidos al segundo día después de la aplicación del extracto de *H. longipes*, en cuanto a la médula se observó diferencia significativa entre plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* con respecto al testigo absoluto y las plantas asperjadas con el control positivo, al segundo día después de la aplicación del extracto de *H. longipes*, siendo las plantas tratadas con el extracto las que mayor área de médula presentaron al segundo día. Al sexto día se registró diferencia significativa en el incremento de córtex respecto al testigo absoluto obteniéndose el mayor incremento con el tratamiento de plantas asperjadas con el control positivo que fue del 318%, y el tratamiento de plantas asperjadas con el extracto con un aumento del 274%. De igual manera, se presentó diferencia significativa en cuanto a disminución del área de la médula, el tratamiento de plantas asperjadas con el control positivo fue el que menor área presentó respecto al testigo absoluto, con una disminución del 98% y el tratamiento de plantas asperjadas con el extracto con una disminución del 79%.

Figura 10: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en el área de córtex y médula grosor de muestras de raíz, sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. *sp. lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. *sp. lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo,

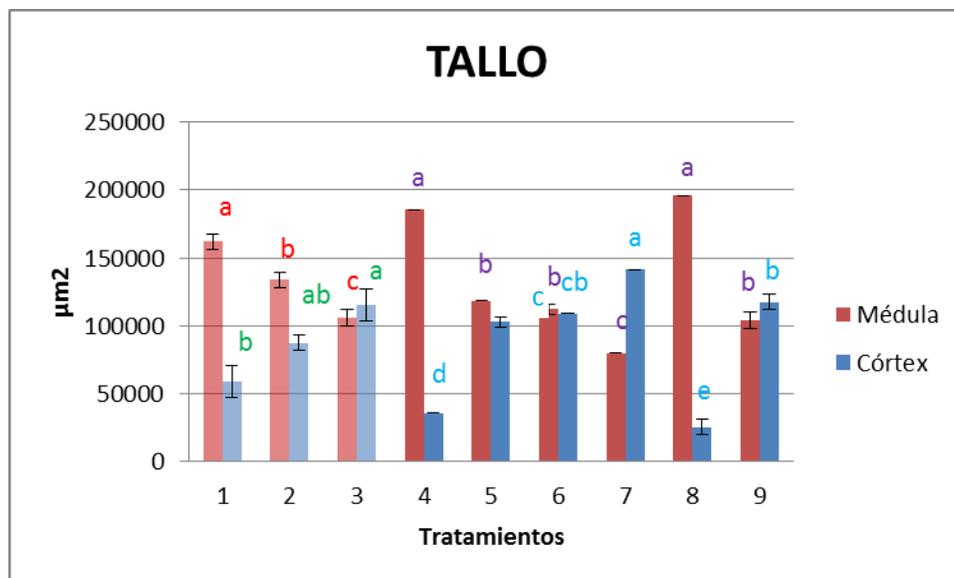
C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. TA, H y C+ 2D son muestreos al segundo día después de la aplicación del extracto, TA, F, H, H+FOL, C+ y C+FOL 6D son muestreos al cuarto día después de la inoculación. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.1).



En la figura 11 se muestra la diferencia que hubo entre tratamientos en muestras de tallo respecto a los cambios que se mostraron en medula y córtex. Se presentó una diferencia significativa en el aumento de córtex en el muestreo del segundo día, el mayor incremento fue con el tratamiento de plantas asperjadas con el control positivo con un incremento del 195%, seguidas de el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* que mostró un incremento del 148% respecto al testigo absoluto, al igual en medula se presentó diferencia significativa entre el el testigo absoluto, las plantas asperjadas con el extracto y las plantas asperjadas con el control positivo al segundo día de aplicación del extracto,

obteniendo menor área de medula con el tratamiento de plantas asperjadas con el control positivo con una disminución del 35%, seguido de las plantas asperjadas con el extracto con una disminución del 18%. Al cuarto día después de la aplicación del extracto de *H. longipes*, se presentó diferencia significativa entre los tratamientos respecto al incremento del córtex siendo el tratamiento HL+FOL el que presentó un incremento del 398% respecto al testigo absoluto. En medula, cuatro días después de la aplicación del extracto se presentó diferencia significativa en los diferentes tratamientos, en el que se registró menor área de igual manera fue en el tratamiento HL+FOL con una disminución del 57% respecto al testigo absoluto.

Figura 11: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en el área de córtex y médula grosor de muestras de tallo, sobre plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. TA, H y C+ 2D son muestreos al segundo día después de la aplicación del extracto, TA, F, H, H+FOL, C+ y C+FOL 6D son muestreos al cuarto día después de la inoculación. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.1).



Los resultados presentados en las muestras procesadas para determinar los cambios estructurales demuestran que en efecto hubo modificaciones en la proporción de córtex y medula tanto en tallo como en raíz, habiendo un cambio significativo en los tratamientos con el extracto de *H. longipes* y el Control positivo.

Yedidia *et al.*, (1998) realizó un estudio en el cual aplicó un hongo de biocontrol *Trichoderma harzianum* para inducir resistencia en pepino. Mediante un análisis de microscopía electrónica observaron que las plantas tratadas con *T. harzianum* reveló la penetración de *T. harzianum* en raíces, restringiendo principalmente a la epidermis y la corteza externa fortaleciendo las células epidérmicas y corticales.

El córtex y la medula forman parte del sistema fundamental de la planta, el incremento del córtex es favorable en la planta debido a que retarda la entrada del patógeno hacia los haces vasculares, ya que son estos los que se ven afectados siendo obstruidos por *F. oxysporum* f. sp *lycopersici*, impidiendo la circulación de agua y nutrientes a través de ellos lo cual trae como consecuencia la marchites vascular de la planta.

CONCLUSIONES

La aplicación de el extracto de *H. longipes* reducen sustancialmente la severidad de síntomas de marchitez en las plántulas de tomate inoculadas con *F. oxyspoum f. sp. lycopersici*. De igual manera, las plantas tratadas con el extracto presentan un incremento en la altura, longitud de raíz y en biomasa total de la planta. El extracto de *H. longipes* provoca también cambios morfológicos sobre el área de la corteza y la médula tanto en tallo como en raíz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cai, G., Gale, I.R., Scheider, R.W., Kistler, H. C., Davis, R. M., Elias, K.S. Miyao, E. M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* F. SP. *Licopersici* at a single site in California. *Phitopatologi* 93: 1014-1022.

Diener Andrew C. y Ausubel Frederick M (2005). Resistance To *Fusarium Oxysporum* 1, a Dominant Arabidopsis Disease-Resistance Gene, Is Not Race Specific. *Genetics* 171: 305–321

Little E.L., (1948). El chilcuague. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 7, 23

López Bucio J. (2007) Alcamidas hacia la nueva era agrícola. Ciencia y desarrollo al conocimiento de tu alcance.

Molina Torres J. y García Chávez A. (2001) Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva vol. 20 Pag. 377-387*

Montaño Lugo I., Guerrero Rangel A., Chávez Ramírez E., Molina Torres J. y Valdés Rodríguez S. E. (2006) Análisis de la expresión diferencial de proteínas de las raíces de plantulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con afinina. Tesis de licenciatura, Unidad de Biotecnología y Bioquímica de plantas, CINVESTAV Campus Guanajuato.

Montiel González Lucero, González Flores Francisco, Sánchez García Bertha María, Guzmán Rivera Sergio, Gámez Vázquez Francisco Paúl, Acosta Gallegos Jorge Alberto, Rodríguez Guerra Raúl, Simpson Williamson June, Cabral Enciso Mariandrea and Mendoza Elos Mariano (2005). Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus Vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1) 17.

Ramírez-Chavez E., Lopez-Bucio J., Herrera-Estrella L., and Molina-Torres J. (2004). Alkamides Isolated from Plants Promote Growth and Alter Root Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, Vol. 134, 1058–1068.

Urban J., Lebeda A. 2006. Fungicide resistance in cucurbit downy mildew—methodological, biological and population aspects. *Ann. Appl. Biol.* 149:63-75.

Vallad G.E., Goodman R.M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44:1920-1934.

Walling L.L. 2001. Induced resistance: from the basic to the applied. *Trends in Plant Science* 6:445-447.

Yedidia I., Benhamou N. and Chet I. (1999) Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Applied And Environmental Microbiology* 63 (3) 1061–1070

ARTICULO 3

Expresion diferencial de genes y metabolitos relacionados a la inducción de defensa relacionada a la aplicación del extracto de *Heliopsis longipes* sobre el patosistema tomate-*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

González- Morales Susana*¹, Pérez-Delgado Hortencia¹, Benavides- Mendoza Adalberto², Rodríguez-Campos Edmundo M.³ y Flores-Olivas Alberto¹

1. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Departamento de Parasitología Agrícola. 2. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Departamento de Horticultura. 3. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Departamento de Ciencias Básicas. *Autor para correspondencia: aflooli50@gmail.com; aflooli@uaaan.mx

Palabras claves: quitinasa, peroxidasa, PAL, glucanasa, acido salicílico, microarreglos.

RESUMEN

Se midió el efecto elicitor del extracto de *H. longipes* sobre plantas de tomate susceptibles a *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. Las enzimas relacionadas a la resistencia analizadas, nos indican que su mayor actividad enzimática se presenta a las 12 horas después de la aplicación del extracto, con incrementos de actividad específica PAL del 591% en hoja y

503% en raíz, actividad específica peroxidasa con incrementos del 120% en raíz, actividad específica quitinasa con incremento del 650% en hoja y 755% en raíz y en actividad específica β -1,3 glucanasa un incremento del 534% en hoja y 612% en raíz, lo anterior respecto al testigo absoluto. En cuanto a cambios en la expresión diferencial de genes, éstos fueron analizados por Microarreglos utilizando un chip de *Arabidopsis thaliana*, obteniendo la sobreexpresión de genes relacionados a la resistencia como PR1 y genes relacionados a la formación de raíces como AUX1.

INTRODUCCIÓN

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*, es una de las enfermedades más importantes que atacan a las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Este hongo es un patógeno facultativo de suelo distribuido mundialmente, causando daños vasculares en variedades de tomate de importancia económica (Michielse et al., 2009). Existen tres razas fisiológicas (1, 2 y 3) identificadas para este hongo. Los cultivares resistentes son hasta el momento la mejor estrategia de control, ya que el patógeno permanece en el suelo por décadas, y el control químico es en ocasiones inefectivo (Reis et al., 2004).

La resistencia de plantas a enfermedades, esta asociada a numerosas respuestas de defensa, activadas por el hospedero después del contacto con el patógeno. Se ha establecido que la invasión a la planta por un determinado microorganismo da lugar a la estimulación de sus defensas mediante la síntesis de compuestos que inducen resistencia, llamados inductores, los cuales son moléculas de origen biótico producidas por la acción de enzimas hidrolasa del patógeno sobre el tejido vegetal o viceversa (Lawrence et al., 1996). La resistencia es

generalmente expresada por una reacción de hipersensibilidad, la cual resulta de células muertas localizadas en el sitio de penetración del patógeno. Otra respuesta de resistencia puede incluir la alteración de estructuras de la planta, la acumulación de especies reactivas de oxígeno, ácido salicílico, óxido nítrico, etileno y ácido jasmónico. También es activada la expresión de genes relacionados con la patogenicidad (PR) y la síntesis de una amplia gama de metabolitos secundarios y moléculas de defensa como las fitoalexinas, defensinas, compuestos fenólicos y flavonoides producidos para atacar directamente al patógeno (Park *et al.*, 2003; Shah, 2003; Ros *et al.*, 2004).

Dentro de estos mecanismos se incluye el incremento en la activación de enzimas, tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cual es clave en la síntesis de metabolitos de defensa importantes, donde se destacan las fitoalexinas (antibióticos vegetales) que constituyen compuestos altamente tóxicos al patógeno (Rodríguez *et al.*, 2006). También se inducen otras enzimas de defensa entre las que se encuentran las β -1,3 glucanasas, quitinasas, peroxidasas, entre otras (Inui *et al.*, 1997). En la actualidad, estos compuestos pueden obtenerse de la pared celular de hongos y plantas. Dentro de estas últimas se pueden citar los oligómeros de glucano, ácido galactruónico y quitosan (Takeshi *et al.*, 2000).

La identificación de los genes del hospedero, involucrados en la respuesta de defensa, es importante para entender los mecanismos de resistencia en plantas hacia fitopatógenos (Thatcher *et al.*, 2005; Desender *et al.*, 2007).

El desarrollo de la tecnología de Microarreglos hace posible hacer posible incorporar información transcripcional en el estudio de genomas comparativos (Horvath *et al.*, 2003).

Por lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo determinar los cambios a nivel de producción de compuestos bioquímicos relacionadas con la inducción de resistencia sistémica y la expresión diferencial de genes.

METODOLOGÍA

Aislamiento de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

La cepa de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* utilizada en el presente trabajo se aisló a partir de raíces de plantas de tomate enfermas obtenidas en el área de Silao, Guanajuato, México (González *et al.*, 2011).

Extracto de *H. longipes*

El extracto de *H. longipes* se elaboró con las raíces secas y molidas de esta planta colectadas en la Sierra Gorda de Guanajuato. Para obtenerlo, se usó una proporción de 1:10, esto es 1 g de raíz macerada por cada 9 ml de solvente, el cual fue etanol al 98%. El extracto se obtuvo al exponer el tejido macerado al solvente a temperatura ambiente durante 30 días. El extracto crudo se filtro con un papel filtro Whatman No. 1 y se concentró en Rotavapor (IKA). La determinación de la concentración de afinina se llevó a cabo por medio de HPLC

Prueba *in vivo*

La prueba *in vivo* se llevó a cabo con plantas de tomate de 5 a 6 hojas verdaderas de la variedad Río Grande, sembradas en charolas de plástico con turba: perlita, a una proporción 1:1. La prueba se dividió en 6 tratamientos: Testigo absoluto (TA), Testigo infestado con FOL (FOL), Plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* (HL), Plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con FOL (HL+FOL), Plantas asperjadas con el Control + (C+), Plantas asperjadas con el Control + e inoculadas con FOL (C+ +FOL).

Se aplicó el extracto etanólico de *Heliopsis longipes* a una dosis de 300 ppm y el Control comercial positivo a una dosis de 250 ml/Ha a las plantas de tomate por aspersión, cuatro días después, se inocularon las plantas de los tratamientos FOL, HL+FOL Y C++FOL, utilizando la técnica de inmersión de raíces en una solución de esporas de FOL DE 1×10^6 esporas/ml durante 15 minutos.

Se tomaron muestreos cada 12 horas después de la aplicación del extracto de *H. longipes* y el Control positivo hasta las 48 horas, posteriormente se tomaron muestreos al tercer día hasta el sexto día. Veinte días después de la inoculación, se tomaron los datos de incidencia y severidad (Escala de Diener, 2005). Escala de Diener: 0 Planta muerta; 1 Las hojas viejas muertas, las jóvenes crecimiento detenido; 2 Las hojas viejas cloróticas, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 3 Hojas viejas tienen clorosis vascular, hojas jóvenes con crecimiento detenido; 4 Los peciolo de las hojas con crecimiento detenido; 5 No hay síntomas visibles.

Extracción de enzimas

El material vegetal utilizado para la extracción de PAL, quitinasa, β - 1,3 glucanasa y peroxidasa fueron hojas y raíces de las plantas de tomate a diferentes tiempos de muestreo (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 y 6 días después de la aplicación del extracto de *H. longipes* y el Control positivo), de las cuales se tomaron 1 g y se congelaron a -78°C y posteriormente se maceraron en un mortero congelado. Se procedió a la extracción con una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 mol L^{-1} pH 5.2 para la determinación de las actividades: β - 1,3 glucanasa y quitinasa, para actividad PAL se utilizó como solución amortiguadora tetraborato de sodio 0.1 mol L^{-1} y ácido bórico 0.1 mol L^{-1} a pH 8.8. Para

actividad peroxidasa se utilizó una solución amortiguadora de fosfato 0.05M a pH 6. Para todas las extracciones se usó 1 g de tejido por cada 2 ml de solución.

Determinación de la actividad PAL

Se tomaron 150 μ l de L-Fenilalanina 1mg/ml (Sigma), se adicionaron 17 μ l de extracto enzimático y se incubó a 40° durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 42 μ l de ácido clorhídrico 5 N. Las muestras se colocaron en baño de hielo y se adicionaron 833 μ l de agua destilada. Los valores de absorbancia se determinaron a una $\lambda=290$ nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la producción de 1 μ g de ácido transcinámico producido por segundo (Rodríguez, *et al.*, 2006). La curva patrón se llevó a cabo con varias concentraciones de ácido Transcinámico.

Actividad quitinasa

Para este ensayo se adicionaron 500 μ l de solución amortiguadora de ácido cítrico 0.1 mol/l y fosfato de sodio 0.1 mol/l a pH 5.2 a 250 μ l de extracto enzimático y se le agregaron 250 μ l de quitina coloidal 0.5%. Se incubaron las muestras a 37°C durante 20 minutos con agitación continua. La reacción se detuvo al calentarla a ebullición por 5 minutos. Se determinó el incremento de azúcares reductores por la técnica de Somogyi-Nelson, se leyó la absorbancia a una $\lambda= 420$ nm. La actividad enzimática se expresó como la producción de 1 μ g/ml de glucosa/segundo (Rodríguez, *et al.*, 2006).

Actividad β -1,3 glucanasa

A 200 μ l de sustrato laminarina 1mg/ml se le agregaron 100 μ l de solución amortiguadoras de acetato de sodio 0.1 mol/l a pH 5.2 y 100 μ l de extracto enzimático, las muestras se

incubaron a 40°C durante 30 minutos. La actividad enzimática se determinó por la medición del nivel de producción de azúcares reductores y se expresó en términos de producción de 1 µg/ml de glucosa por segundo (Rodríguez, *et al.*, 2006).

Actividad peroxidasa

A 20 µl de extracto crudo se le agregaron 50 µl de rojo de fenol 0.2%, 50 µl de solución amortiguadora de citrato de sodio 50 mM a pH 4.2 y 10 µl de peróxido de hidrógeno 1 mM. La reacción se detuvo tres minutos después con 40 µl de hidróxido de sodio 2N. La absorbancia se leyó a una $\lambda = 610$ nm. La actividad peroxidasa se tradujo como la producción de 1 mmol de rojo de fenol oxidado por segundo. Se utilizó el valor del coeficiente de extinción molar del rojo de fenol para calcular la cuantificación de peroxidasa, el cual es de $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Yedidia *et al.* 1999)

Determinación de proteínas totales

La concentración de proteínas se determinó según Bradford (1976). Los fragmentos de hojas y raíces (100 mg) se maceraron a -80°C. La extracción se realizó con solución amortiguadora de tris-HCl (0.01 mol/L a pH 7.0). El 0.1 mL de extracto se mezcló con 1 mL de reactivo de Bradford. Se evaluó la absorbancia a 595 nm. El contenido de proteínas se expresó en mg de proteínas por gr de masa fresca de tejido, La curva patrón fue a base de albúmina de suero bovino (BSA).

Determinación compuestos fenólicos

Se pesaron 10 g del material fresco y posteriormente se congeló a -80°C, se pulverizó cada muestra, y se pusieron a macerar en metanol acuoso al 80% en un frasco ámbar a

temperatura ambiente durante 24 horas en agitación. Se filtró la solución con papel filtro Whatman no. 1. Se evaporó la mayor cantidad del solvente de los extractos calentando a 40°C. El producto de la evaporación se congeló y se guardó hasta su uso.

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se tomaron 500 µl del extracto y se les agregaron 750 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejó reposar la mezcla durante cinco minutos, después de lo cual se agregaron 750 µl de carbonato de sodio al 20 %. Se agitaron fuertemente para luego, dejar reposar durante 90 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 760 nm (Gutierrez *et al*, 2008).

Determinación de ácido salicílico

Las hojas de las plántulas de tomate se colocaron en un mortero de mano y se congelaron con nitrógeno líquido, se maceraron hasta obtener un polvo fino, pesar 50 mg de este polvo, aún congelado, en tubos de 1.5 mL.

Solución de extracción: se realizó una solución con las siguientes proporciones, Metanol 10% conteniendo 1% de ácido acético. Se colocó 1 mL de la solución de extracción en el tubo (conteniendo los 50 mg del macerado congelado), se agitó en vortex por aproximadamente 15 segundos, posteriormente se sometió a ultrasonificación por 10 minutos para lograr una mejor solubilización del ácido salicílico en la solución de extracción.

En seguida se centrifugó a 13,000 rpm por un tiempo de 10 min. Una vez finalizado este proceso el sobrenadante se extrajo y se colocó en un tubo limpio.

Se realizó una re-extracción del pellet de la misma manera. Y el sobrenadante se mezcló con el sobrenadante de la primera extracción. Se filtró la muestra con filtros de .45 µm de poro, y se desgasificó en el ultrasonificador por 5 min. La muestra se inyectó al

cromatógrafo de líquidos Agilent 1120, por medio de microjeringa Agilent, el método conveniente es de fase reversa el cual implica una fase estacionaria no polar, columna C-18, 100 mm de longitud, y una fase móvil menos Hidrófoba que la fase estacionaria, se utilizaran un gradiente de 50% de fase A (agua 94.9:acetonitrilo 5% :ácido fórmico 0.1%) y 50% de fase B (acetonitrilo 94.9%: agua 5%: ácido fórmico 0.1%) a un flujo de 0.6 mL/min por un tiempo de 10 min de corrida (Forcat et al., 2008).

Microarreglos

Impresión de microarreglos. El chip de *Arabidopsis thaliana* fue fabricado en la Unidad de microarreglos de DNA de la UNAM. El chip tenía un arreglo de 29, 950 genes diferentes.

Preparación de sondas e hibridación de los microarreglos. Se utilizaron 10µg de RNA total **s** para la síntesis de cDNA incorporando aminoalil-dUTP usando transcriptasa reversa y una mezcla de dNTP + aa-dUTP. La incorporación del fluoróforo se realiza por una reacción alcalina, acoplando los succimidil esteres Alexa555 y Alexa647. La eficiencia de incorporación se sigue por la absorbencia a 555 nm para Alexa555 y a 650 nm para Alexa647. La misma cantidad de ambos cDNA marcados se utiliza para la hibridización (usando la solución HyBIT2 TeleChem Internacional INC). Los microarreglos hibridizados se incuban 14 h a 42°C, se lavan 3 veces con 1X SCC, 0.05 % SDS a temperatura ambiente.

Adquisición de datos y análisis de las imágenes del microarreglo. Se realizó un barrido del chip, en un lector para microarreglos GenPix 4100, utilizando su propio software GenPIX (Molecular Devices). Las imágenes se capturaron usando una ganancia de 65% PMT y de 70 a 75% de intensidad de láser, a una resolución de 10µm, con una velocidad de barrido de

50%. Para cada punto se calculó el valor medio de la densidad de Alexa555 y Alexa647 y sus valores medios de fondo, con el software ArrayPro (Media Cybernetics).

A continuación se muestran los tratamientos comparados en los chips, donde T es el testigo absoluto analizado al cuarto día de muestreo, F son las plantas inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* 24 horas después de la inoculación, H son las plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, analizadas cuatro días después de su aplicación y HF son las plantas asperjadas con el extracto e inoculadas, analizadas 24 horas después de la inoculación.

Chips	Alexa555		Alexa647
AthV3_03_15	T	vs	F
AthV3_03_16	T	vs	H
AthV3_03_16	T	vs	HF

Análisis de datos. Se realizó con el software libre genArise, desarrollado en la Unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). GenArise realiza con los datos una serie de transformaciones: corrección del fondo, normalización de los datos por lowess, filtrado de intensidad, análisis de duplicados y selección de genes con cambios en su expresión. La meta de genArise es identificar cuales de los valores obtenidos para cada uno de los genes, representan cambios en los niveles de expresión con una significancia estadística. El software identifica genes expresados diferencialmente calculando el z-score intensidad-dependiente. Utilizando un algoritmo de ventana para calcular el promedio y la desviación

estándar dentro de un conjunto de elementos alrededor de cada punto en el chip, donde z mide el número de las desviaciones estándar al punto de referencias del medio.

$$z_i = (R_i - \text{mean}(R)) / \text{sd}(R)$$

Donde z_i corresponde al z-score para cada elemento, R_i es el logaritmo de la relación para cada elemento y $\text{sd}(R)$ es la desviación estándar de esa relación. Con este criterio, aquellos elementos con z-score > 2 desviaciones estándar representa un cambio significativo entre las condiciones que se comparan.

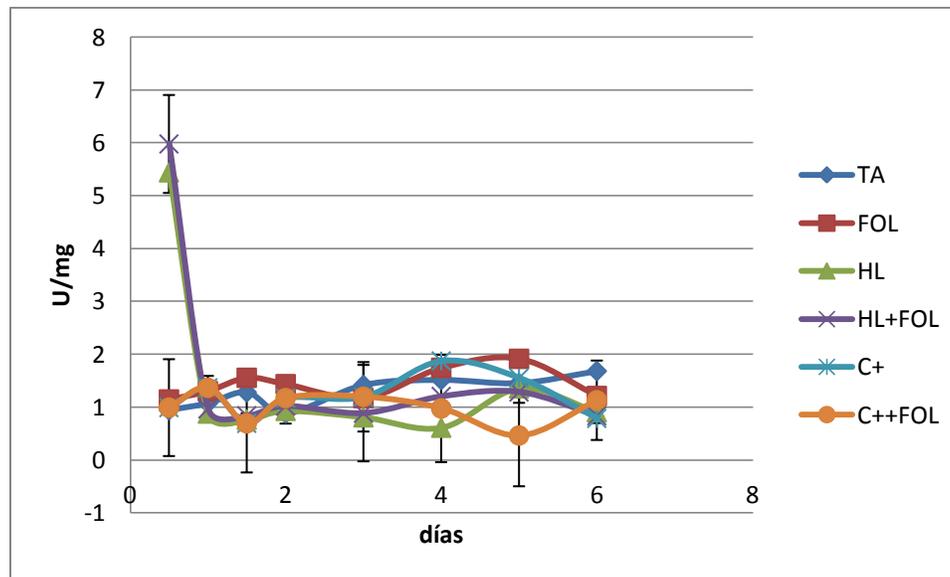
RESULTADOS

Determinación de cambios bioquímicos

En la figura 1 se muestra la actividad específica de la enzima β -1,3-glucanasa en hojas de tomate, dicha enzima es capaz de hidrolizar a los β -1,3-glucanos, componentes esenciales componentes de la pared celular de hongos y bacterias, esta enzima ha sido designada como proteína relacionada a la patogénesis perteneciente a la familia 2 (PR-2). La máxima actividad específica β -1,3- glucanasa en hojas se presentó a las 12 horas en el tratamiento con el extracto de *H. longipes* con un incremento de 534% (5.979 U/mg de proteína) con respecto al testigo absoluto (0.943 U/mg de proteína).

Figura 1: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de actividad específica β -1,3- glucanasa en hojas de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo

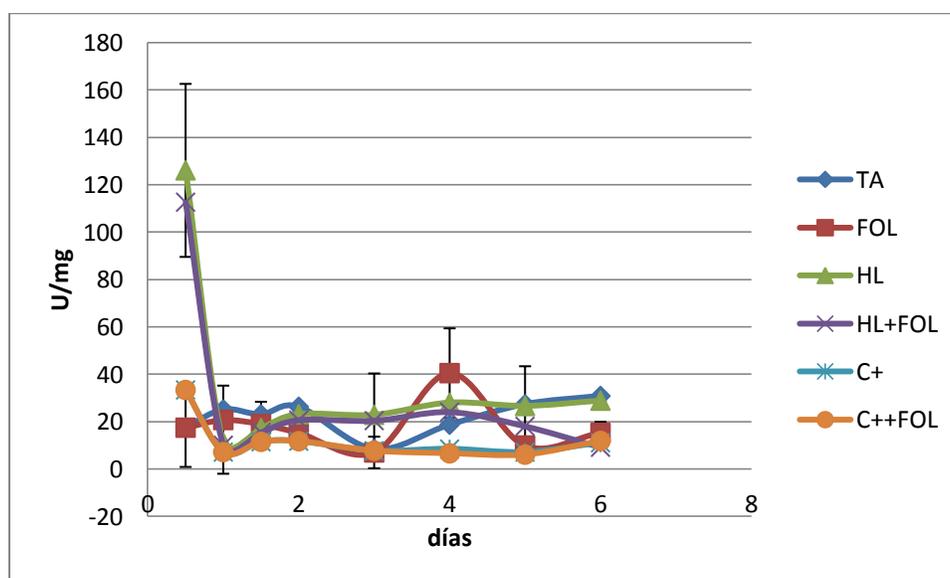
absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.



La actividad específica β -1,3- glucanasa en raíz se presenta en la figura 2, donde a las 12 horas se registró la mayor actividad específica en el tratamiento con el extracto de *H. longipes*, con un incremento de 612% (126.08 U/mg de proteína) con respecto al testigo absoluto (17.70 U/mg de proteína). De igual manera se presentó un incremento en el tratamiento inoculado con FOL, a diferencia del extracto de *H. longipes* dicho incremento se presentó al cuarto día (un día después de haber inoculado) con un aumento de 116% (40.5 U/mg de proteína) respecto al testigo absoluto (18.72 U/mg de proteína). Estos resultados pueden compararse los datos de Ardila *et al.*, (2005). Realizaron un experimento en el cual estudiaron la inducción diferencial de Polifenoxidasa y β -1,3- glucanasa en

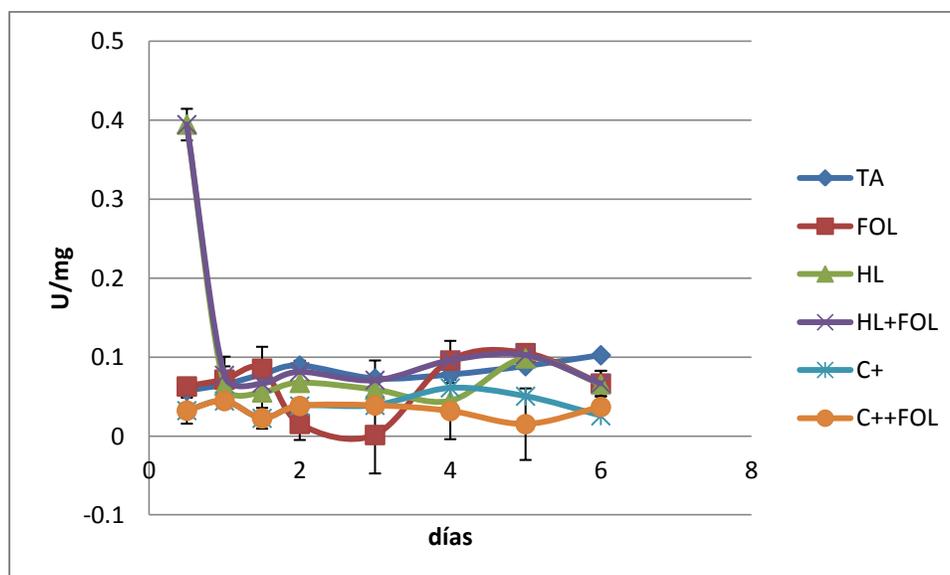
plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. Obtuvieron como resultados que la actividad específica β -1,3- glucanasa durante la infección con *F. oxysporum f. sp. dianthi* se presentó a las 12 y 24 horas post-inoculación, con un aumento a las 12 h de 4.95% y a las 24 h de 7.16%.

Figura 2: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de actividad específica β -1,3- glucanasa en raíz de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.



La actividad específica de la enzima Fenilalanina amonio liasa (PAL) en hoja se muestra en la figura 3. En relación con los compuestos bioquímicos relacionados con la inducción de defensa en las plantas, esta enzima es clave en la producción de la molécula básica (cinamato) que se utiliza para la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos. La máxima actividad PAL en hojas se presentó a las 12 horas en el tratamiento con el extracto de *H. longipes* con un incremento de 591% (0.394 U/mg de proteína) con respecto al testigo absoluto (0.057 U/mg de proteína).

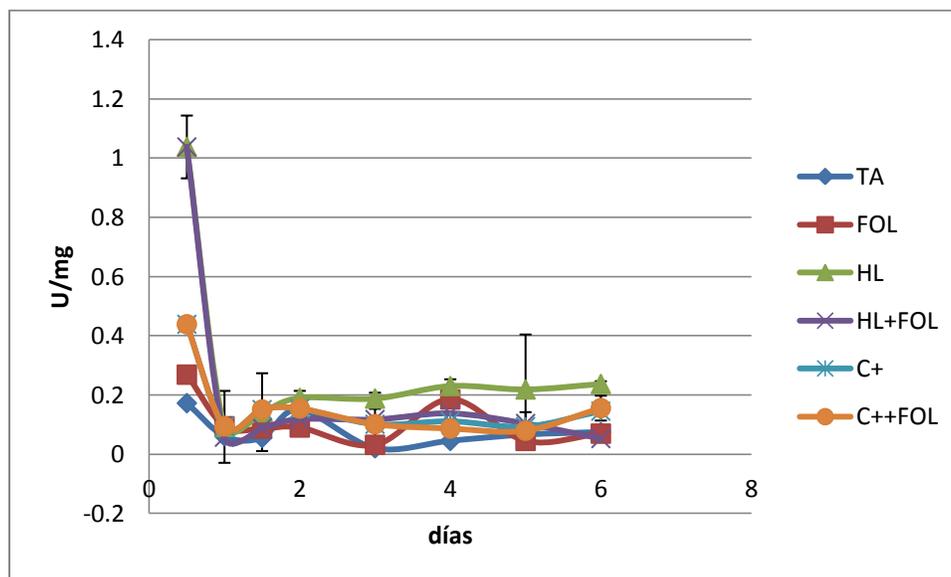
Figura 3: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de actividad específica de fenilalanina amonio en hojas de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



La máxima actividad PAL en raíz (figura 4) se presentó a las 12 horas en el tratamiento con el extracto de *H. longipes*, con un incremento de 503% (1.038 U/mg de proteína) con respecto al testigo absoluto (0.172 U/mg de proteína). Rodríguez *et al.*, (2006) evaluaron el efecto del quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz, contra *Phycularia grisea sacc.* Donde obtuvo como resultado un incremento de 308% de la enzima fenilalanina amino liasa (PAL) y se presentó a las 72 horas, después de la inoculación fúngica.

Figura 4: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de actividad específica fenilalanina amonioliasa en raíz de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el

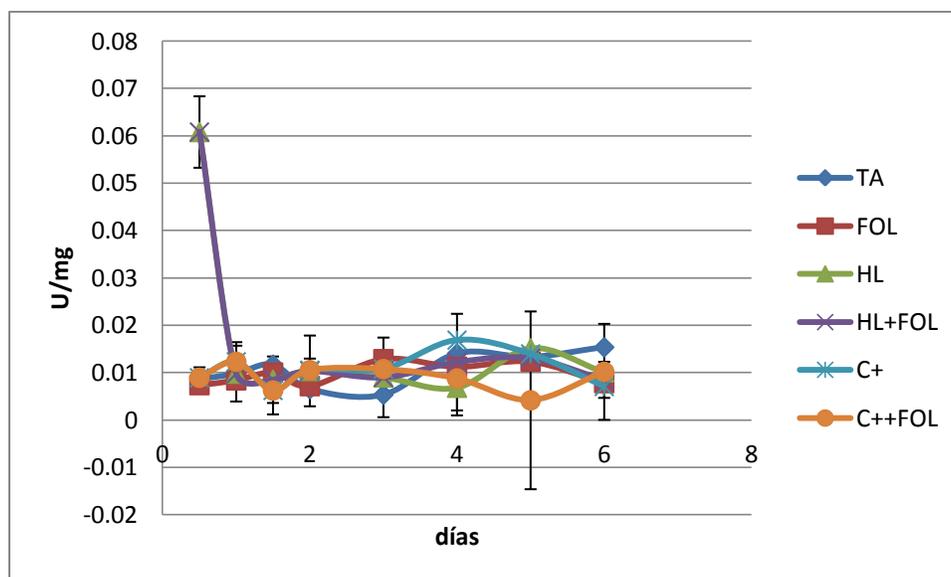
control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.



La actividad específica de la enzima quitinasa se muestra en la figura 5. Esta es una enzima que degrada la quitina, un polisacárido de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) con enlaces β (1, 4), sobre los cuales actúan hidrolizándolos. En las plantas, actúan en la defensa y el desarrollo. La máxima actividad quitinasa en hoja se presentó a las 12 horas en el tratamiento con el extracto de *H. longipes*, mostrando un incremento de 650% (0.060 U/mg de proteína) con respecto al testigo absoluto (0.008 U/mg de proteína).

Figura 5: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de actividad específica quitinasa en hojas de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto

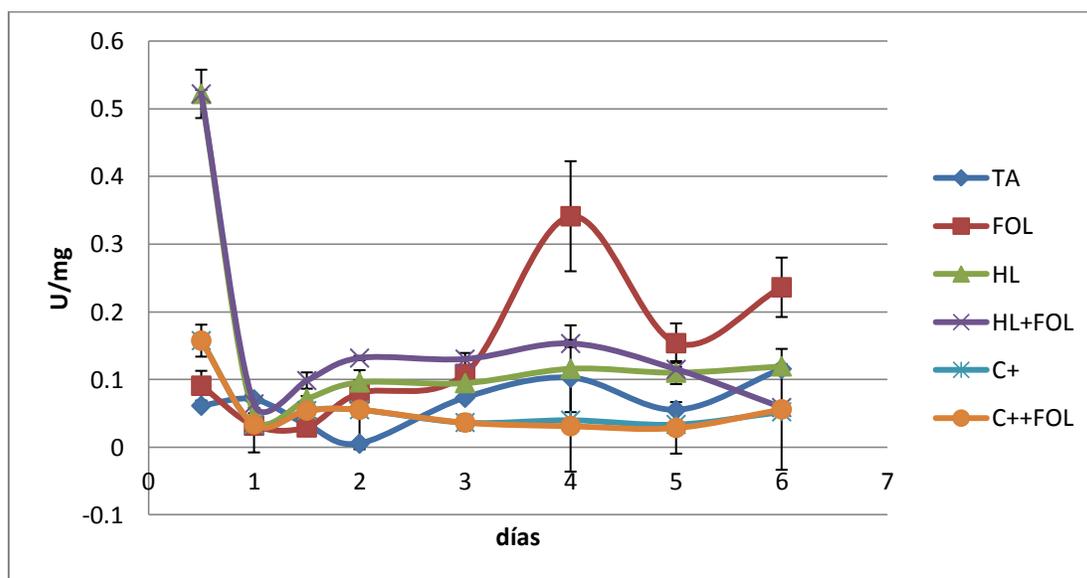
de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.



La máxima actividad quitinasa en raíz (figura 6) se presentó a las 12 horas en el tratamiento con el extracto de *H. longipes*, mostrando un incremento de 755% (0.522 U/mg de proteína) con respecto al testigo absoluto (0.061U/mg de proteína). De igual manera se presentó un incremento en el tratamiento inoculado con FOL, a diferencia del extracto de *H. longipes* dicho incremento se presentó al cuarto día (un día después de haber inoculado) con un aumento de 234% (0.341 U/mg de proteína) respecto al testigo absoluto (0.102 U/mg de proteína). Yedidia *et al.*, (1999) realizaron un experimento en plantas de pepino (*Cucumis sativus L.*) Infectando las plantas con el agente de biocontrol *Trichoderma harzianum*. En el cual obtuvo como resultado, que la máxima actividad enzimática fue a las

72 horas en hoja y raíz alcanzando un aumento en raíz de 6.4 y en hoja 3.2 veces más en comparación con plantas no tratadas.

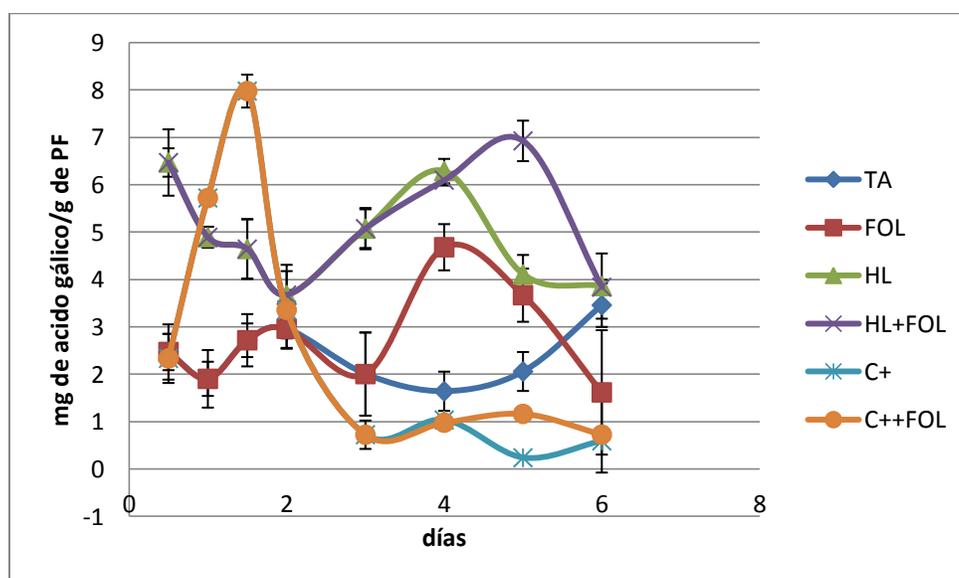
Figura 6: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de actividad específica quitinasa en raíz de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



En la figura 7 se muestra la producción de compuestos fenólicos, estos tienen diversos roles en las plantas: muchos son productos de defensa ante herbívoros y patógenos, otros proveen soporte mecánico a la planta. La máxima producción de fenoles totales en hojas fue con el

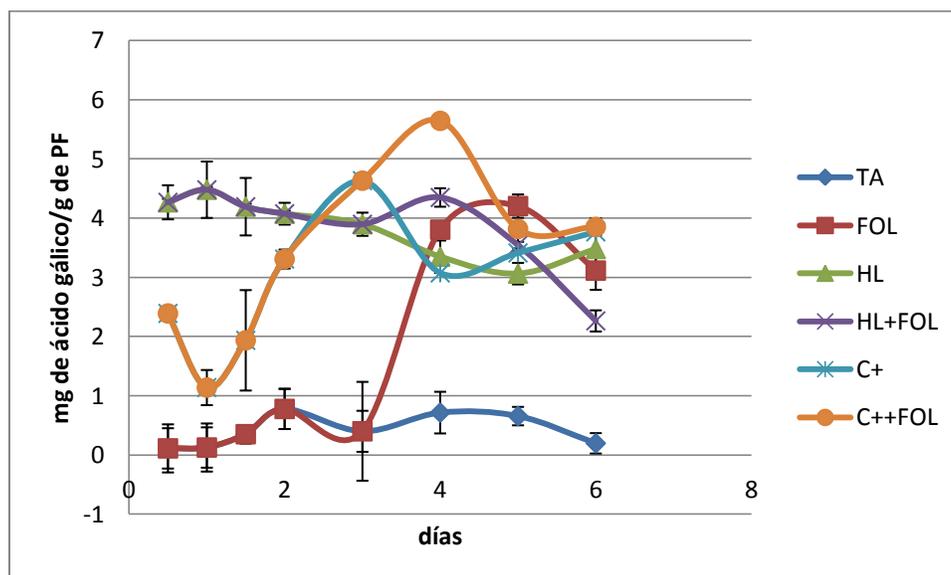
tratamiento C++FOL a las 36 horas, con un aumento de 193% (7.978 mg de ácido gálico/g de PF), respecto al testigo absoluto (2.719 mg de ácido gálico/g de PF). De igual manera se presentó un incremento en el tratamiento inoculado con HL+ FOL, a diferencia de C++FOL dicho incremento se presentó al quinto día con un aumento de 210% (6.926 mg de ácido gálico/g de PF) respecto al testigo absoluto (2.059 mg de ácido gálico/g de PF).

Figura 7: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de producción de compuestos fenólicos en hojas de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



La máxima expresión de fenoles totales en raíz (figura 8) fue con el tratamiento C++FOL al cuarto día, con un aumento de 687% (5.642 mg de ácido gálico/g de PF), respecto al testigo absoluto (0.716 mg de ácido gálico/g de PF).

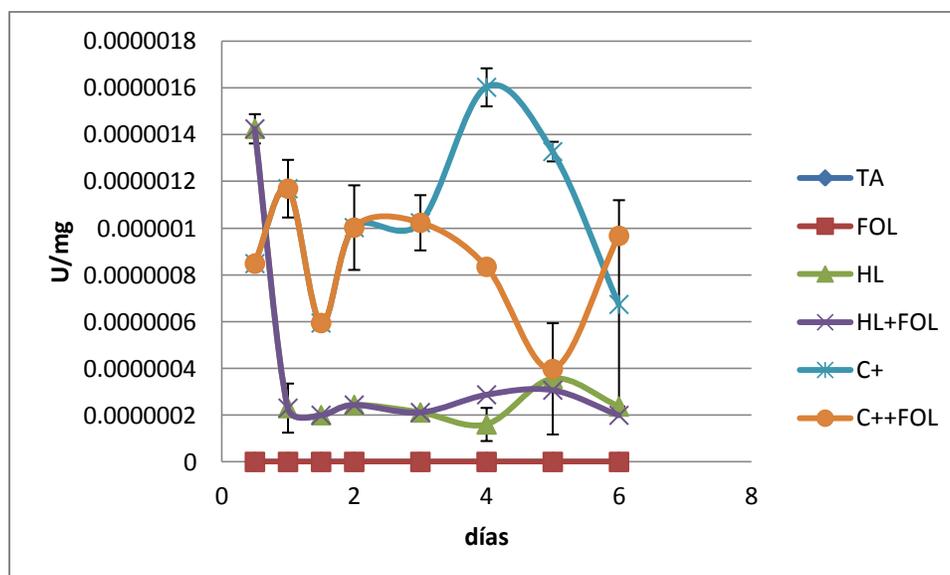
Figura 8: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de producción de compuestos fenólicos en raíz de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



Estos resultados obtenidos pueden compararse con los obtenidos por Gonzales, (2010), quien realizó un estudio para observar el comportamiento de fenoles totales en plantas de tomate inoculando *Fusarium f. sp. lycopersici*. Los resultados obtenidos fueron que en hojas y raíz se presentó un alto incremento de 16% en raíz y de 62.9% en hoja al séptimo día de la infección con *F. f. sp. lycopersici*.

En la figura 9 se muestra la actividad específica de la enzima peroxidasa esta enzima pertenece a un grupo de enzimas que oxidan sustratos a expensas del peróxido de hidrógeno. En las plantas desempeñan un papel catalítico en el proceso de lignificación del xilema, expresándose también en la epidermis de los órganos aéreos. La máxima actividad peroxidasa en hoja fue al cuarto día, con el C+ con $1.60309E-06$ U/mg de proteína, cabe mencionar que en el testigo absoluto no se registró actividad peroxidasa.

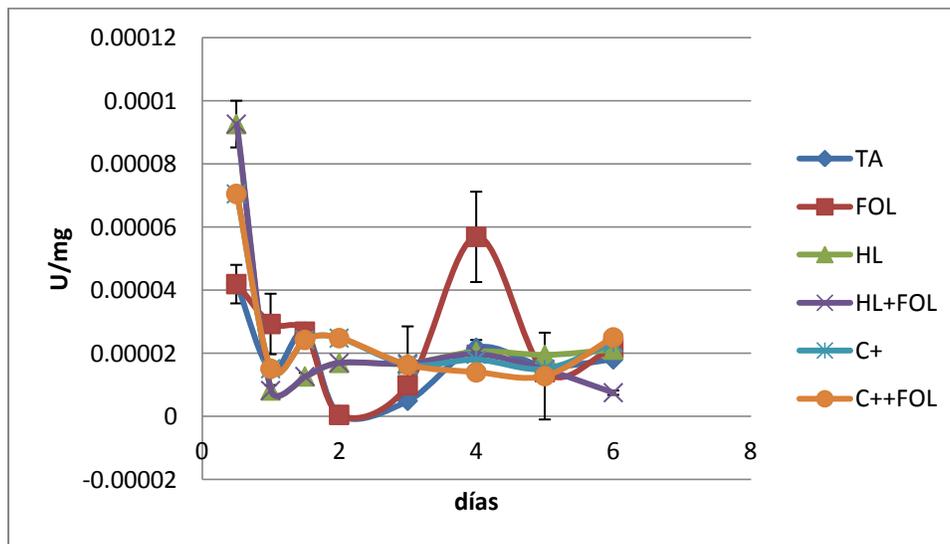
Figura 9: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de actividad peroxidasa en hojas de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.



La máxima actividad peroxidasa en raíz (figura 10) fue con el extracto de *H. longipes* a las 12 horas, con un aumento del 120% (9.266 U/mg de proteína) respecto al testigo absoluto (4.196 U/mg de proteína). De igual manera se presentó un incremento en el tratamiento inoculado con FOL, a diferencia de *H. longipes* dicho incremento se presentó al cuarto día con un aumento de 160% (5.694 U/mg de proteína) respecto al testigo absoluto (2.183 U/mg de proteína).

Figura 10: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de actividad peroxidasa en raíz de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F.*

oxysporum f. sp. lycopersici, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.



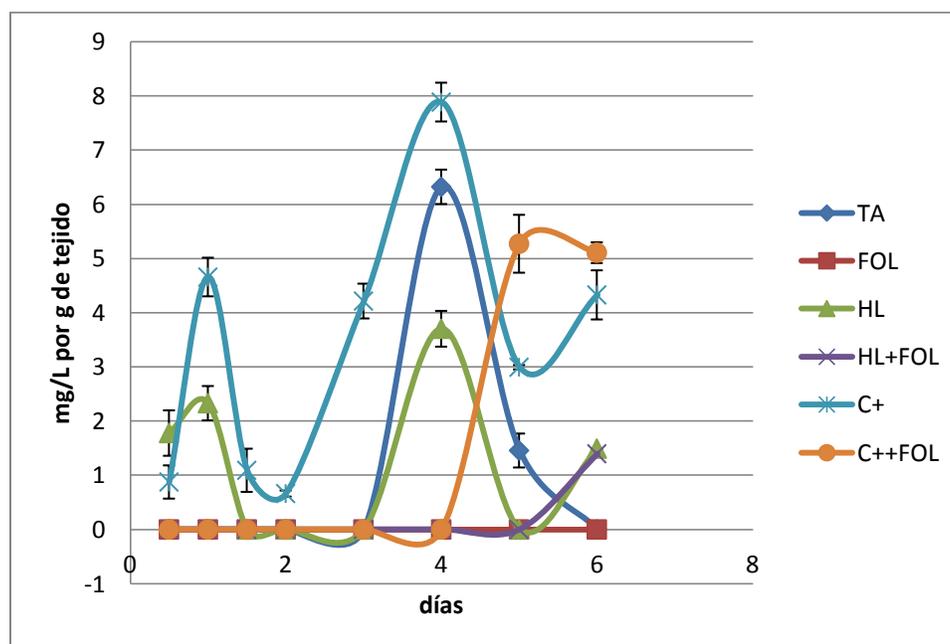
Michel L., 1987, realizó análisis bioquímicos que revelaron que la inoculación con *Trichoderma* obtuvo mayor actividad peroxidasa dentro de las 48 y 72 h, respectivamente. Estos resultados fueron observados tanto para las raíces y las hojas de las plántulas tratadas, proporcionando evidencia de que *T. harzianum* puede inducir la activación de mecanismos de resistencia en plantas de pepino.

En la figura 11 se presenta el efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la producción de ácido salicílico en hojas de plántulas de tomate. El ácido salicílico es una hormona fenólica producida en plantas sometidas a estrés, ha sido reconocido como una de las señales claves que gatilla la activación de genes de defensa.

En el tratamiento de las plantas asperjadas con el control positivo, se registró el mayor nivel de ácido salicílico al cuarto día después de la aplicación del extracto de *H. longipes* y el

control positivo, presentando un incremento del 24% con respecto al testigo absoluto. Aunque se detectó en poca cantidad, las plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* presentaron niveles de 2.33 mg/L por gr de tejido a las 24 horas de haber asperjado el extracto.

Figura 11: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de producción de ácido salicílico en hojas de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

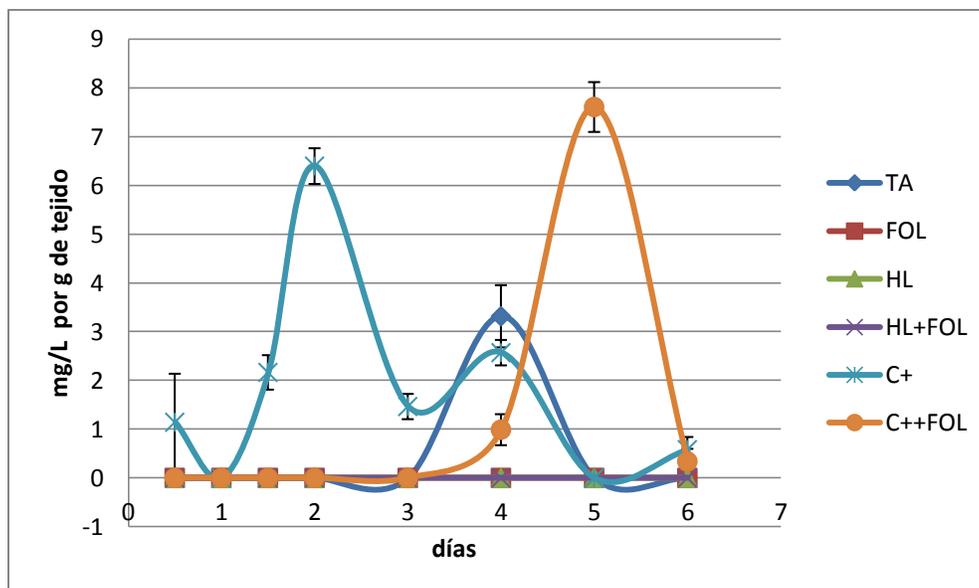


En la figura 12 se puede observar el efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la producción de ácido salicílico en la raíz de plántulas de tomate, donde no se detectó ácido salicílico en los tratamientos de las plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, en el tratamiento con plantas asperjadas con el control positivo, se registró el mayor nivel de ácido salicílico al segundo día después de la aplicación del control positivo a las plantas, posteriormente en el tratamiento con las plantas asperjadas con el control positivo e inoculado con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se presentó el mayor nivel de ácido salicílico a las 24 horas después de la inculación.

Cabe mencionar que se detectó presencia de ácido salicílico en el testigo absoluto al cuarto día de muestreo, dicho comportamiento se puede asociar a un posible estrés abiótico que sufrieron las plantas en ese tiempo.

Rasmussen, *et al.*, (2004) realizó un trabajo donde infectaron plantas de pepino con *Pseudomonas syringae*, y obtuvieron la mayor concentración de ácido salicílico a las 12 hrs en hojas.

Figura 12: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la cinética de producción de ácido salicílico en raíz de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: TA= Testigo absoluto, FOL= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, HL=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, HL+FOL= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, C+= plantas asperjadas con el control positivo, C++FOL= plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.



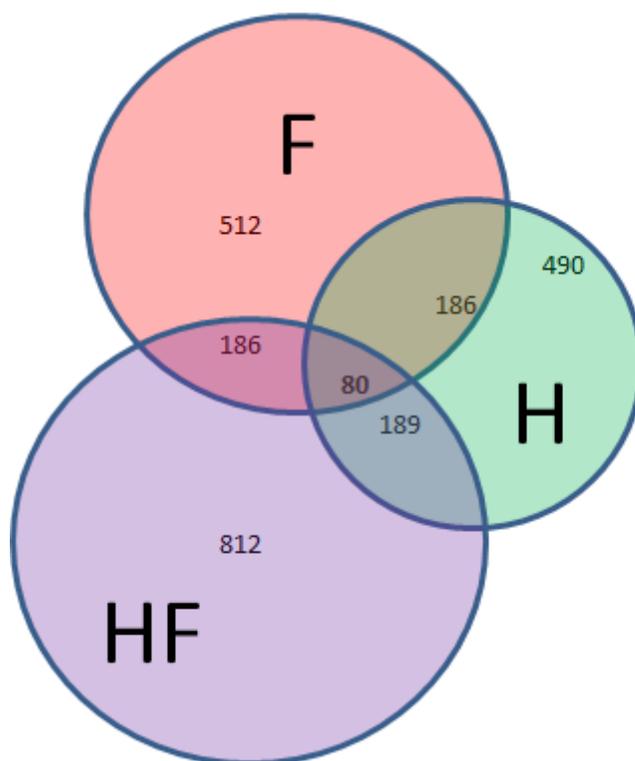
Cambios en la expresión diferencial de genes

Para medir la expresión diferencial de genes se utilizó la técnica de Microarreglos, aunque se utilizó un chip con el modelo biológico heterólogo de *Arabidopsis thaliana* con un total de 29,950 genes. Dicho modelo ha sido ampliamente estudiado, siendo la primera planta cuyo genoma se secuenció en su totalidad (Mozo *et al.*, 1999). Con el uso de este modelo heterólogo se obtuvieron gran cantidad de genes con expresión diferencial al testigo absoluto (plantas de tomate).

Para medir la sobreexpresión y la represión de genes, se utilizó un valor de z score mayor a 2 (sobreexpresados) y menor a 2 (reprimidos), este criterio se eligió para darle mayor validez estadística a los resultados. Para englobar los resultados de genes expresados y reprimidos, se utilizó un diagrama de Venn (figuras 13 y 14). Donde se aprecia que hubo un total de 512 genes sobreexpresados en el tratamiento con plantas inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* a las 24 horas después de la inoculación, lo que equivale al 1.7% del total de genes analizados respecto al testigo absoluto. En el tratamiento de plantas

asperjadas con el extracto de *H. longipes* analizadas 4 días después de la aplicación del extracto de *H. longipes*, se sobreexpresaron un total de 490 genes, lo que equivale al 1.6% en comparación con el testigo absoluto. Y por último en el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* analizadas 24 horas después de la inoculación, se obtuvo la mayor cantidad de genes sobreexpresados (comparando con los dos tratamientos anteriores), con un total de 812 genes, equivalentes al 2.7% del total de genes.

Figura 13: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la sobreexpresión diferencial de genes en hojas de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: F= testigo infectado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación) , H=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* (analizado cuatro días después de la asperción del extracto), HF= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación).

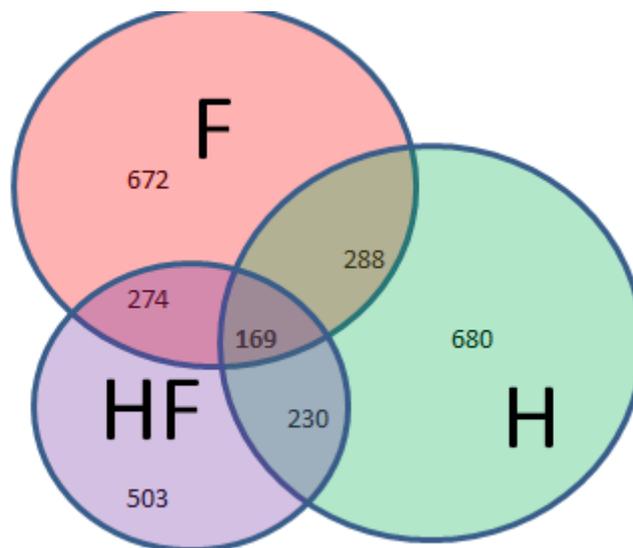


En la figura 14 se presenta la represión diferencial de genes, donde en el tratamiento con plantas inoculadas se encontraron 672 genes, equivalente al 2.2% del total de genes analizados. De igual manera, en el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* se encontraron 680 genes reprimidos, lo que equivale al 2.3 del total de genes. El tratamiento que menos genes reprimidos presento fue el de las plantas asperjadas con el extracto e inoculadas, presentando 503 genes, lo que representa el 1.7% del total de genes analizados.

En general para el tratamiento de plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, se encontraron mayor número de genes reprimidos que genes sobreexpresados, para el

tratamiento inoculado y asperjado con el extracto de *H. longipes*, se presentó el efecto contrario, es decir, mayor número de genes sobreexpresados que genes reprimidos.

Figura 14: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la represión diferencial de genes en hojas de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: F= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación) , H=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* (analizado cuatro días después de la asperción del extracto), HF= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación).

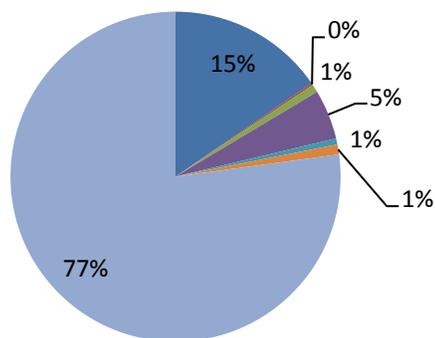


En cuanto a las categorías funcionales a nivel celular de los genes analizados (figura 15), el tratamiento con plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* presentó diferencias en los genes asociados al metabolismo, con un total de 15% de los genes sobreexpresados,

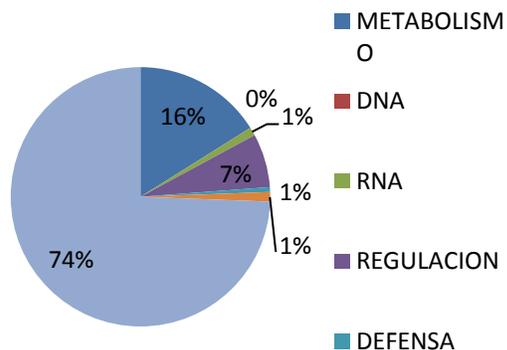
en el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto, se registró un incremento, ya que el 20% de los genes asociados al metabolismo se sobreexpresaron, y en el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto e inoculadas presentó el 18% de genes asociados a metabolismo sobreexpresados. En genes reprimidos, de igual manera los genes asociados al metabolismo fueron los que presentaron mayores diferencias, donde el tratamiento con plantas inoculadas presentó un 16%, el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto un 22% y el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto e inoculadas un 14% de los genes analizados.

Figura 15: Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la sobreexpresión y represión diferencial de genes respecto a sus categorías funcionales, en hojas de plántulas de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en condiciones controladas. Tratamientos: F= testigo infectado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación) , H=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* (analizado cuatro días después de la asperción del extracto), HF= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación).

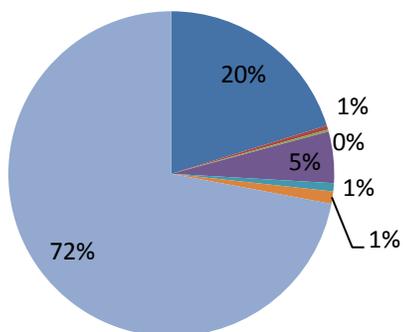
F-sobreexpresados



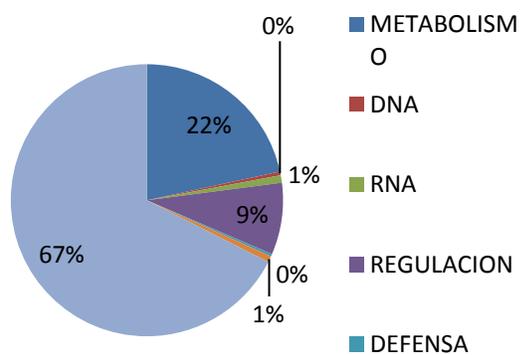
F-reprimidos



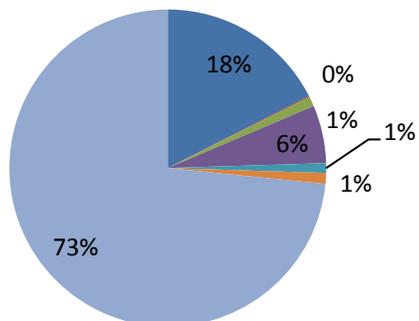
H-sobreexpresados



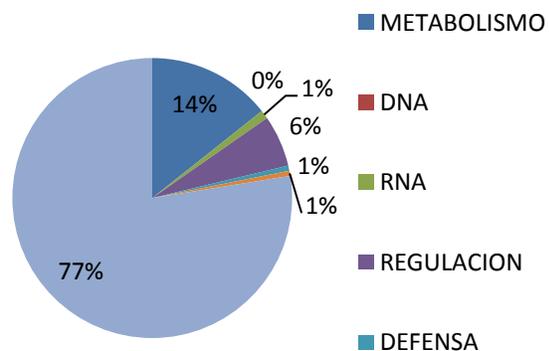
H-reprimidos



HF-sobreexpresados



HF-reprimidos



En la tabla 1 se muestran los genes sobreexpresados y su función, relacionados con la inducción de defensa en plantas. Donde en el tratamiento con plantas inoculadas, la mayoría de los genes sobreexpresados están asociados a las protein cinasas, asociadas a la transducción de señales vía cinasas, las cuales generalmente actúan activando y desactivando factores de trascipción (Weston, 2002). Oliveira et al., (2008), encontraron una sobreproducción de una serin/treonin cinasa, en plantas de tomate asperjadas con ácido salicílico e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.

En cuanto al tratamiento con plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes*, se sobreexpresó el gen AUX1 relacionado a la producción de raíces laterales, que aunque no tiene importancia en la inducción de resistencia, es de gran importancia, ya que se comprueba de alguna manera los resultados obtenidos en la medición de algunas características agronómicas como la longitud de raíz, y el peso seco de raíz, en donde dicho tratamiento presento resultados mu y por encima de los demás tratamientos en cuanto a la longitud y peso seco de raíz. De igual manera en el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto, se detectó la presencia del gen PR1, el cual esta ampliamente ligado a la inducción de resistencia, además de ser un marcador dependiente de la ruta de ácido salicílico. Los genes PR-1 son los genes de mayor expresión dentro de la clasificación de genes PR, ya que las proteínas PR-1 representan entre el 1 y el 2% de las proteínas totales de la hoja (Riva et al., 2010).

Oliveira et al., (2008), encontraron sobreproducción en el gen PR-10, en plantas de tomate asperjadas con ácido salicílico e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.

En el tratamiento con plantas asperjadas con el extracto e inoculadas, se sobreexpresó el gen RPS4, relacionado directamente con la inducción de defensa en plantas, actuando en el

splicing alternativo de genes de resistencia (R), permitiendo obtener un ARN-m maduro libre de intrones (Brett *et al.*, 2001).

Tabla 1: Genes sobreexpresados en las plantas de tomate, asociados a la inducción de resistencia en plantas. Tratamientos: F= testigo infectado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación) , H=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* (analizado cuatro días después de la asperción del extracto), HF= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación).

GEN	DESCRIPCIÓN	SOBREEXPRESION EN TRATAMIENTO	ID DEL GEN
SAUR	Enlazador de cadmodulina, responde al estímulo de auxinas.	F, H, HF	832204
AHP	Proteínas histidin fosfotransferasas (AHPs). Su función es ser reguladores positivos de la señalización de citocininas.	F, HF	822593
CDPK1	Codifica para una proteína cinasa dependiente de Ca ⁺ , su expresión genética es inducida por deshidratación o alta salinidad.	F, H, HF	838470
FRK1	Actúa como receptor de una proteína cinasa, se relaciona con la señalización temprana de respuesta de defensa	F, HF	<u>816436</u>
AUX1	Desarrollo de raíces laterales.	H, HF	818390
PR1	La expresión de este gen es inducida en respuesta a patógenos. La expresión es respuesta al estímulo de AS.	H	815949
CaMCML	Enlazador de ion Ca ⁺ .	H, HF	837108
RPS4	Relacionado directamente con la inducción de defensa en plantas.	HF	834561
GID2	Receptor de giberelina, regula la germinación de semillas.	HF	828522

ABF	Codifica para una proteín cinasa para llevar el proceso de autofosforilación.	HF	822566
-----	---	----	--------

Los genes reprimidos asociados a la inducción de resistencia, se muestran en la tabla 2. Donde en los tres tratamientos se reprimen genes relacionadas a las cinasas y sus vías de transducción de señales. Las cuales son un conjunto de procesos o etapas que ocurren de forma concatenada por el una célula convierte una determinada señal o estímulo exterior, en otra señal o respuesta específica.

Tabla 2: Genes reprimidos en las plantas de tomate, asociados a la inducción de resistencia en plantas. Tratamientos: F= testigo infectado con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación) , H=plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* (analizado cuatro días después de la asperción del extracto), HF= plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (analizado a las 24 horas después de la inoculación).

GEN	DESCRIPCIÓN	REPRESION EN TRATAMIENTO	ID DEL GEN
AUX1	Desarrollo de raíces laterales.	F	818390
B-ARR	Regulador de la via de señalizacion de citocininas.	F	841342
SnRK2	Codifica para una proteín cinasa, su actividad es regulada por presencia de sales o estrés osmico.	F, HF	842385
BAK1	Receptor de proteín cinasas rico en leucinas	F	829480
CNGCs	Enlazador de camodulina, actua en la homeostasis de la planta.	F, HF	831339
GH3	Codifica para una enzima que conjuga aminoacidos a 4 benzoatos sustituidos. El ácido salicilico puede reducir la concentración de eta enzima <i>in vitro</i> y actuar como un inhibidor competitivo.	H	831173

MKK4/5	Codifica para una map cinasa activada por mitógeno, actua directamente en la respueta de defensa.	H, HF	84159 1
--------	---	-------	------------

CONCLUSIONES

El extracto de *H. longipes* tiene potencial como elicitor de plantas de tomate variedad Río grande susceptible a *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, ya que induce la producción de enzimas (PAL, peroxidasa, quitinasa y β -1,3 glucanasa) y metabolitos secundarios (compuestos fenólicos) relacionados a la resistencia en plantas, en las primeras horas de aplicación del extracto. Además se comprobó la sobreexpresión de genes relacionados a la defensa en plantas, así como genes relacionadas con la formación de raíces.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brett David; Heike Pospisil; Valcárcel Juan; Jens Reich; Peer Bork (2001). Alternative splicing and genome complexity. *Nature Genetics* 30: 29-30.

Desender, S.; Andrivon, D.; Val, F. Activation of defence reactions in *Solanaceae*: where is the specificity? *Cellular Microbiology*, v.9, p.21-30, 2007.

Forcat S., Bennett M., Mansfield J. and Grant M. (2008) A rapid and robust method for simultaneously measuring change in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress, *Plant Methods*, 4-16

- Horvath DE, Schaffer R, Wisman E. 2003. Identification of genes induced in emerging tillers of wild oat (*Avena fatua*) using Arabidopsis microarrays. *Weed Science* 51, 503–508.
- Inui H., Yamaguchi Y., and Hirano S. (1997) Inductor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharidase for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *BioScience Biotechnology and Biochemistry* 61:975-978.
- Lawrence C., Joosten M., Tuzuns S. (1996) Differential induction of pathogenesis-related in tomato by *Alternaria solani* and the association of basic chitinase isozyme with resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48:361-366.
- Michielse Caroline B, Van Wijk Ringo, Reijnen Linda, Cornelissen Ben JC and Rep Martijn (2009) Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis *Genome Biology*, 10:R4
- Mozo Teresa, Dewar Ken, Dunn Pat. Ecker Joseph R, Fischer Sabine, Kloska Sebastian, Hans Lehrach, Marra Marco, Martienssen Robert, Meier-Ewert Sebastian & Altmann Thomas (1999). A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature Genetics* 22, 271 – 275
- Oliveira Jordão do Amaral Daniel, Magalhães de Andrade Lima Marleide, Vilela Resende Luciane and Vanusa da Silva Márcia (2008). Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.43, n.8, p.1017-1023

Park, Y.S.; Min, H.J.; Ryang, S.H.; Oh, K.J.; Cha, J.S.; Kim, H.Y.; Cho, T.J. Characterization of salicylic acid-induced genes in *Chinese cabbage*. *Plant Cell Reports*, 21, p.1027-1034, 2003.

Reis, A.; Giordano, L.B.; Lopes, C.A.; Boiteux, L.S. (2004) Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.4, p.495-502.

Rodríguez A., Ramírez M., Cárdenas R., Falcón A., Bautista S. (2006). Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza Sativa L.*) contra *Pyricularia grisea* sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24, 1; 1-7.

Riva Romera F., Proaño K. (2010). Análisis de la expresión del Gen PR-1 mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT -PCK) en tomate (*Solanum Lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*. Tesis de la Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí

Ros, B.; Tummler, F.; Wenzel, G. Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. *Molecular Plant Pathology*, v.5, p.191-201, 2004.

Shah, J. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, v.6, p.365-371, 2003.

Takeshi Y., Ito Y. and Shibuya N. (2000) Oligosaccharide inductors and their receptors for plant defense responses. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 12:113-112.

Thatcher, L.F.; Anderson, J.P.; Singh, K.B. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology*, v.32, p.1-19, 2005.

Weston, la Dirección General de Lambright, RJ Davis (2002). "Transducción de señales. MAP quinasa de señalización especificidad". *Ciencia* 296 (5577): 2345-7.

CONCLUSIONES GENERALES

- 1) El extracto crudo de *H. longipes* logró controlar los síntomas provocados por FOL en plantas de tomate en un 70%. Adicionalmente se obtuvieron incrementos del 56% en altura de planta y 84% en longitud de raíz.
- 2) Con la aplicación del extracto de *H. longipes* se logró observar mediante Microscopía Óptica un cambio importante en la relación de córtex y médula tanto en tallo como en raíz.
- 3) Se determinó la actividad específica de enzimas relacionadas a la resistencia en plantas como PAL, peroxidasa, quitinasa y β -1,3 glucanasa se registró a la 12 horas después de la aplicación del extracto de *H. longipes*, con incremento superiores a 120% en todas las enzimas. En la producción de metabolitos secundarios, la mayor concentración de fenoles totales se determinó al quinto día después de la aplicación del extracto de *H. longipes* con un incremento del 210% en hoja. El ácido salicílico no fue posible cuantificarlo en raíz, pero en muestras de hoja se detectó su máxima concentración al cuarto día después de la aplicación del extracto.
- 4) Por medio de la técnica de Microarreglos, se logró identificar los genes con expresión diferencial. Donde se encontró la sobreexpresión de genes relacionados a la resistencia (PR1) y genes relacionados a la formación de raíces (AUX1).

LITERATURA CITADA

- Aida Tania Rodríguez Pedroso, Miguel Angel Ramírez Arrebato, Regla María Cardenas Travieso, Alejandra Falcon Rodríguez y Silvia Bautista Baños (2006). Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 24 (1) 1-7.
- Acencio-Alvarez, A.; A. López; F. Borrego; S. Rodríguez; A. Flores; F. Jiménez; A. Gómez 2008. Marchitez Vascular del jitomate: Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de fitopatología 26 (2): 114-120.
- Agrios, George; 2002. Fitopatología. Segunda edición. Limusa. Grupo Noriega Editores. Mexico.425-431 pp.
- AgostinI, J. P., BUSHONG, P. M., and TIMMER, L. W. (2003). Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of scab, melanose, and *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant Disease*, 87, 69-74.
- AisT, J.R. 1976. Papillae and related wound plugs of plant cells. Annual Review Phytopathology 14: 145-63.
- Angulo, M.J.H. 1996. Efecto de razas de *fusarium oxisporum* *F. sp. lycopersici* en materiales silvestres de tomate. Tesis de licenciatura en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán. Sinaloa, Mexico.39 p.
- Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology 30:603-635.

- Aranda, S. y L. Fucikovsky. 1996. Evaluación del efecto de *Bacillus subtilis* en la producción del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14: 166.
- Ardila , H. Blanca L. 2005. Polipenoloxidasa y β - 1,3 glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección de fusarium oxysporum f. sp. dianthi RAZA 2. Departamento de química, facultad de ciencias, universidad N. de Colombia. Bogotá.
- Beckman, C. H. 1987. The Nature of the Wilt Diseases of Plants. The American phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA.80 p.
- Báez Valdez Emma Paulina, Carrillo Fasio José Armando, Báez Sañudo Manuel, García Estrada Raymundo, Valdez Torres José Benigno y Contreras Martínez Rosalba.2010. Resistant Rootstocks Utilization for *Fusarium* Control (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen race 3) in Tomato *Lycopersicon esculentum* Mill) under Shade Conditions. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Coordinación Culiacán, Sinaloa. .*Revista Mexicana de Fitopatología*, 114/Volumen 28, Número 2.
- Baladrim, M. 1996. Comercial Utilization of Plant-Derived Saponins: An Overview of Medicinal, Pharmaceutical and Industrial Applications in Saponins used in Traditional and Modern Medicine, eidted by G. R. Waller and K. Yamasaki. Plenum Press. NY USA and London England.
- Balls A. K., Hale W.S. and Harris T. H. (1942). A Crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal chemistry* 19, 279-288.
- Barrera J.A Gomez S. 1995. Determinación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* de clavel en ocho fichas del grupo de Chía localizadas en la Sabana de Bogotá Ingeniero Agrónomo Universidad Nacional de Colombia. Facultad de

- Agronomía. Bogotá, Colombia. 57 pp. Berger, S. Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta*. 2002, 214, 497-504.
- Baulcombe D. (2005) RNA silencing. *Trends Biochem Sci*; 30(6):290-3.
- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants.. *Nature*. 16; 43:356-63. Review.
- Beauverie J. 1901 Essais immunization des vegetaux contre les maladies cryptogamiques. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances del Academie des Sciences, Paris* 133: 107-110.
- Bowles D.J. (1990). Defence-related proteins in higher plant. *Annual Review of Biochemistry* 59,873-907.
- Blanco-Labra A., Chagolla-López A., Martínez-Gallardo N.and Valdés-Rodríguez S. (1995). Further characterization of the 12 kDa protease/alpha amylase inhibitor present in maize seeds. *Journal of Food Biochemistry* 19, 27-41.
- Bradley, D. J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C. J. 1992. Elicitor-induced and wound-induced anduced oxidative cross-linking of a proline-rich plnt cell wall protein-a novel, rapid defense *Cell* 70: 21-30
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bremer, K. 1994. *Asteraceae: cladistics & classification*. Timber Press. Portland. 752 pp.
- C. A. Clark, C. Chen, N. Ward-Rainey, and G. S. Pettis (1998) Diversity Within *Streptomyces ipomoeae* Based on Inhibitory Interactions, rep-PCR, and Plasmid Profiles. *The American Phytopathological Society*. 88 (11) 1179-1186.

- Cai, G., Gale, I.R., Scheider, R.W., Kistler, H. C., Davis, R. M., Elias, K.S. Miyao, E. M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* F. SP. *Licopersici* at a single site in California. *Phitopatologi* 93: 1014-1022.
- Calistru, C., McLean, M. and Berjak, P. 1997. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *Mycopathologia* 139:115-121.
- Collinge D. B., Kragh K. M., Mikkelsen J. D., Nielsen K. K., Rasmussen U. and Vad K. (1994). Plant chitinases. *The plant Journal* 3, 31-40.
- Campos-A., J.E., M. del S. Vazquez-M. y R. Rodriguez-G. 1994. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento de *Rhizobium solani*, en laboratorio. pp. 47. *In: Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología*. Cuernavaca, Morelos, México.
- Cárdenas, 2000. Eficacia en el control químico de *Fusarium Oxysporum* y *phytophthora capsici* en los cultivos de tomate, chile y sandía. Tesis de Maestría de la facultad de Agronomía, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, Mexico. 156 p.
- Carrillo F., J.A., J. Cruz O. y J. Ley F. 1991. Búsqueda de microorganismos antagonistas a *Alternaria carthami* Chow, causante del tizón foliar del cártamo. Pp.181. *In: Memorias del XVIII Congreso Nacional de Fitopatología*. Puebla, Puebla, México.
- Carver, T. L.W.; Zeyen, R. J.; Bushnell, W.R.; Robbins, M. P. 1994. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D. C.) *Physiology Molecular Plant Pathology* 44: 261-72.

- Casarrubias, U. y G. Frías A. 1992. Evaluación de eficacia de *Bacillus subtilis* Para el control de la marchitez del chile en condiciones de invernadero. pp. 165. *In: Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Castillo F, Moreno C, Jaimes y, Cotes A, Restrepo S. Gene expression of tomato plants treated with *Trichoderma koningii*. CD-ROM de Memorias (Presentaciones orales) 6LABS; 2007.
- Castrejón S., A. y R.M. González I. 1994. Posibilidad de control biológico de *Puccinia striiformis* f. sp. *hordi* en cebada, bajo condiciones de campo. pp. 33. *In: Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología*. Cuernavaca, Morelos, México.
- Colson-hanks, E. S. and Deverall, B. J. (2000). Effect of 2,6 dichloroisonicotinic acid, its formulation materials and benzothiadiazole on systemic resistance to alternaria leaf spot in cotton. *Plant Pathology*, 49, 171-178.
- Corion, G., F. Ruiz-Belin y R. Alarcon-Mora. 1992. Control biológico de la roya del cafeto por *Verticillium lecanii* en México. pp. 194. *In: M. Romero F. y A. Gómez B. (eds.). Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Vi Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología*, Torremolinos, España.
- Castro A . A.E., E. Zavaleta-Mejía, I Cid del Prado V. y V. Zamudio G. 1990a. Rotación e incorporación de *Tapetes erecta* L. para el manejo de *Meloidogyne incognita* (Kofold y White) Chitwood en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Tecamachalco, Puebla. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8:173-180.
- Che, I. 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant. Creelman, R.A., Mullet, J.E. Oligosaccharins, brassinolides,

- jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* . 1997, 9, 1211- 1223.
- Csinos, A. S., pappu, H. R., Mcpherson, R. M., and Stephenson, M. G. (2001). Management of Tomato spotted wilt virus in flue-cured tobacco with acibenzolar-S-methyl and imidacloprid. *Plant Disease*, 85, 292-296.
- Dann, E. K. and Deverall, B. J. (1995). Effectiveness of systemic resistance in bean against foliar and soilborne pathogens as induced by biological and chemical means. *Plant Pathology*, 44, 458-466.
- Dann, E. K. and Deverall, B. J. (1996). 2,6-dichloro-isonicotinic acid (INA) induces resistance in green beans to the rust pathogen, *Uromyces appendiculatus*, under field conditions. *Australasian Plant Pathology*, 25, 199-204.
- De Vos A. M., Hatada M., vander Wel H., Krabbendam H., Peerdeman A. F. and Kim S. H., (1985). Theedimensional structure of thaumatin I, an intensely sweet protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 82,1406.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., Turner, J.G. COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J* . 2002, 32, 457-466.
- Diener Andrew C. y Ausubel Frederick M (2005). Resistance To *Fusarium Oxysporum* 1, a Dominant *Arabidopsis* Disease-Resistance Gene, Is Not Race Specific. *Genetics* 171: 305–321
- Dora Marina Gutiérrez Avella, Christopher Alberto Ortiz García, Arturo Mendoza Cisneros.(2008) Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas

para Alimentación Animal. Simposio de Metrología 2008 Santiago de Querétaro, México, 22 al 24 de Octubre SM2008-M220-1108-1

Echavarría, P.H., Castro, A. 2002. Influence of different densities on the yield and quality of greenhouse-grown cucumber grafted on Shintoza (*Cucurbita maxima*. x *Cucurbita moschata*). In: Nishimura, S; H. Ezura: t. Matsuda, and a. Tazuke (eds.) Proq Of the 2nd International Symposium on Cucurbits. Tsukuba, Japan. Acta Hort. 588:63-67.

EDA.2008. El uso del ácido salicílico y fosfonatos (fosfitos) para activacion del sistema de resistencia adquirida de la planta. Entrenamiento y Desarrollo de Agricultores. Cuenta del Desafío del Milenio de Honduras. Mexico D. F. Pp 1-2.

E. Perez, Yakelin Rdriguez, Maria de los A. Hernandez y Blanca M. de la Noval. (2003) dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacion de HMA-Tomate (Lycopersicom Mill) var. Amalia. Induccion de PR2, PR3 y Fenilalanina Amoniolisa en raíces de tomate. (INCA) La Habaa Cuba.

FAO.2002. Agroinformacion-El cultivo del tomate. 3 parte. Plagas y enfermedades del tomate. Países y producción. Factores climáticos y suelo.

[Htt://www.infoagro.com/hortalizas/tomate2.htm](http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate2.htm)

FAO.2002. Agroinformacion – el cultivo del tomate. 1parte. El origen del tomate. Taxonomía y morfología. Países y producción. Factores climáticos y suelo.

FAO, 2003. Manejo Integrado de Enfermedades. Pag 54 y 55.

FAOSTAT (En linea) Organizacion de las Naciones Unidas para Agricultura y Alimentacion (Consultado en Noviembre 2008). Disponible en internet:

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefol.aspx?Page ID=567>.

- Farmer, E.E., Almeras, E., Krishnamurthy, V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003, 6, 372-378.
- Farmer, E.E.; Ryan, C. A. 1990. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:77137716.
- Flores, j.; Ojeda-Bustamante, W.; López, i.; Rojano, a.; Salazar, I.2007.requerimientos de riego para tomate de invernadero. *TERRA latinoamericana*, 25:127-134.
- Garcia-Olmedo F. Carmona M.J., Lopez Fando J.J., Fernandez J. A., CASTAGNARO A., Molina A., Hernandez-Lucas C. and Carbonero p. (1992). Characterization and analysis of thionin genes. *In Plant Gene Research Series: Genes Involved in Plant Defense (T.Bollerand F. Meins. eds) pp.283-302. Springer- Verlag Wien.*
- Garcia –Olmedo F. Rodriguez-Palenzuela P., Hernandez-Lucas C., Carmona M.J., Lopez-Fando J., Fernandez J.A. and Carbonero P. (1989). The thionins a protein, family that includes purothionin, Visco toxins and crambis. *Ox ford Surveys of plant Molecular and cell Biology* 6, 31-60.
- Garduño Pizaña Claudia, 2009. Evaluación de polvos y extractos vegetales sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* e identificación de compuestos volátiles. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos. Pag. 56.
- García-Chávez A., Ramírez Chávez E., Molina-Torres J. 2004. El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana* 69: 115-131.
- Gil, P. 2002. *Productos naturas*. Universidad Pública de Navarra. España. 260 p.
- Gómez –Cruz M.A., R. Schwentesius, and L. Gómez-Tovar. 2006. *AGRICULTURA orgánica de México*. Chapingo, México: CUESTAAM.

- Gomez R., O., E. Zavaleta-Mejía, C.F. Viesca G. y O. Ortiz. 1992. Asociación de *Tagetes erecta* e incorporación de sus residuos, posible alternativa para el manejo de algunos problemas fitopatológicos en jitomate (*Lycopersicon esculentum*). pp. 201 In: M. Romero F. y A. Gómez B. (eds.). Memorias VI Congreso Latinoamericano de Fitopatología. VI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología Torremolinos, España.
- González, G.R 1974. Estudio sobre marchitez del tomate causado por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, en el valle de Culiacán, Sinaloa. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Chapingo, Edo. México.
- Gonzalez, E., A.; Cedillo P. E. y Diaz. G.L. 2007. Morfología y Anatomía de las Plantas con Flores. Ed. UACH. Edición. 1^{ra}. Texcoco. Mexico. Pp 59, 68, 70, 72, 75, 93 y 119.
- Gonzales Pablo, 2006. Enfermedades del Tomate. Facultad de Agronomía. Montevideo URUGUAY.
http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html.
- Gonzales Luis. A, 2010. Uso de injertos y contenido de fenoles solubles totales en genotipos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) resistentes y susceptibles a *F. oxysporum f. sp. lycopersici*
- Gordon T.R Martyn R. D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Phytopathology 35: 111-128 pp.
- Gorlach, J., Volrath, S., Knaufbeiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, **8**, 629-643.

- Haglund, W.A.; Kraft, J. M2001. *Fusarium wilts*...En: Kraft, J.M.; Pflieger, F.L (ed.). Compendium of Pea Diseases and Pests. The American Phytopathological Society Press.St.Paul, Minnesota. USA. 14-16-84pp.
- Halim VA, Bess A., Schoel D., Rosahl X. (2006) The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defense. *Plant Biol* 8: 307-313
- Hammerschmidt. 1.999 b. *Fitoalexinas: ¿qué hemos aprendido después de 60 años: Revisión Anual de Fitopatología* 37 285 -306.
- Henao I., Franco Correa M. and Marin G. (2006). Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas Scientiarum* 11 (2) 51-60.
- Herr AJ, Baulcombe DC.(2004) RNA silencing pathways in plants. *Quant Biol.* 69:363-70.
- Hernández, J; Rodriguez, D; Sanabria, M; Blanco, G; Sanabria, N. 2006. Efecto del extracto etanólico de *Heliotropium indicum* L., *Lippia origanoides* K.H.B.K. y *Phyllanthus niruri* L. En hijos de "Platano Harton" (*Musa AAB*) en el control de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en Yaracuy, Venezuela. XVII Reuniao Internacional de Associacao para a Cooperacao nas Pesquisas sobre Banano no Caribe na America Tropical. ACORBAT. Joinville, Santa Catalina, Brasil. 565-568 p.
- Hernandez. A, Bautista. S, Velásquez. M, 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícola. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Abril – junio, Año vol. 30, numero 002. Sociedad Mexicana de filogenética, Chapingo México.

- Hutcheson S.W., 1998. Currents concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36: 59-90.
- Hyun-Jung Kim, Yong-Keel Choi, y Byung-Re Min (2001) Variation of the Intergenic Spacer (IGS) Region of Ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae specials. *The Journal of Microbiology* 39 (4): 265-272
- Ishii, H., Tomita, Y., Horio, T., Narusaka, Y., Nakazawa, Y., Nishimura, K., and Iwamoto, S. (1999). Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 77-85.
- Jiménez, D.F., 2003. Enfermedades del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)
Ed. Limusa. México, D.F. 102 p.
- Kagale, S.; Marimuthu, T.; Thayumanavan, B.; Nandakuman, R. and Samiyappan, R. 2004. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65. 91-100 p.
- King, Michael (2011) <http://themedicalbiochemistrypage.org/spanish/gene-regulation-sp.html#euk>
- Kombrink, Schmelzer E. 2001. *La respuesta hipersensible y su papel en la resistencia a las enfermedades sistémicas y locales. European Journal of Plant Pathology* 107 69 - 78.
- Kuc. 1995. Fitoalexinas, el metabolismo de la tensión, y resistencia a enfermedades en las plantas: Examen anual de Fitopatología 33 275 -297.
- Kuc, J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 7-12.
- Lewis, J.H. y G.C. Papavizas.1991. Biocontrol of plant diseases: The approach for tomorrow. *Crop Protection* 10:95-105.

- Lim, S. H. and Hudson, S. M. 2003. Review of Chitosan and Its Derivatives as Antimicrobial Agents and their Uses as Textile Chemicals, *J. Macromol. Sci. C43* (2), 223–269.
- Linthorst H.J.M., Melchers L.S., Mayer A., Van Rockel J. S.C., Carne lissen B. J .C. and Bol J.F.(1990). Analysis of gene families encoding acidic and basic B-1,3-glucanases of tobacco. *Proce dings of the National Academy of Sciences (USA)* 87,8756-8760.
- López B., S. y A. Gonzalez M. 1990. Control biológico de *Phymatotrichum omnivorum* (Schear) Duggar con *Bacillus subtilis*. pp. 105. *In: Memorias del XVII Congreso Nacional de Fitopatología*. Culiacán, Sinaloa, México.
- Louws, F. J., Wilson, M., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Jones, J. B., Shoemaker, P. B., Sahin, F., and Miller, S. A. (2001). Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, **85**, 481-488.
- Mauch-mani, B.; Slusarenko, A. J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonialyase in the resistance of Arabidopsis to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 203-12.
- Maxson-Stein, K., HE, S. Y., Hammerschmidt, R., and Jones, A. L. (2002). Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis related protein genes. *Plant Disease*, **86**, 785-790.
- Mendoza, C. Z. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. 1º edición. Universidad autónoma Chapingo, México, 85 p.
- Mendoza, Z.C. 1993. Diagnóstico de Enfermedades Fungosas. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de parasitología Agrícola. Chapingo. Edo. De México. 111 p.

- Michereff, S.J., Da-Silveira, N.S.S., Reis, A. and Mariano, R.L.R 1995. Greenhouse screening of *Trichoderma* isolates for control of *Curvularia* leaf spot of yam. *Mycopathologia* 130:103-108.
- MisaghI, I.J 1982. Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions. New York, Plenum Press. 230 p.
- MoffaT, A. S. 1992 Improving plant disease resistance. *Science* 257: 482-438.
- Mojica Marian V., Sandoval Coronado C.F., Pereyra Alférez B., Morales Ramos L.H., Gonzales Aguilar N.A. Hernández Luna C.E. Alvarado Gómez O.G. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Revista Internacional de botánica experimental* Argentina. FYTON ISSN 0031 9457, 78: 105-110.
- Molina-Torres, J., A. García-Chávez y E. Ramírez-Chávez. 1999. Antimicrobial properties of natural alkaloids traditionally used in Mesoamerica: capsaicin and capsin. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 241-248.
- Montiel González Lucero, González Flores Francisco, Sánchez García Bertha María, Guzmán Rivera Sergio, Gámez Vázquez Francisco Paúl, Acosta Gallegos Jorge Alberto, Rodríguez Guerra Raúl, Simpson Williamson June, Cabral Enciso Mariandrea and Mendoza Elos Mariano (2005). Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus Vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1) 17.
- Moreno C, COTES AM. Survival in the phylloplane of *Trichoderma koningii* and biocontrol activity against tomato foliar pathogens. *IOBC/WPRS Bull.* 2007;30:557-561.

- MORRIS, S. W., VERNOOIJ, B., TITATARN, S., STARRETT, M., THOMAS, S., WILTSE, C. C., FREDERIKSEN, R. A., BHANDHUFALCK, A., HULBERT, S., and UKNES, S. (1998). Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 643-658.
- MORSCHBACHER, B.; NOLL, U.; GORRICHON, L.; REISENER, H. 1990. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to wheat stem rust. *Plant Physiology* 93: 465-70.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., Browse, J. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, 94, 5473- 5477.
- McInnis, S.M., Emery, D.C., Porter, R., Desikan, R., Hancock, J.T. y Hiscock, S.J. (2006). The role of stigma peroxidases in flowering plants insights from further characterization of a stigma-specific peroxidases (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *J. Exp.Bot.* 8, 1835-1846.
- Navarrete L., J. y G. Virgen C. 1994. Antagonismo in vitro de *Bacillus subtilis* a *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp. pp. 43. Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Cuernavaca, Morelos, México.
- Nelson, P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *F.oxysporum*. M.E. Mace, AA. Bell and C.H. Beckman (Eds.). Fungal wilt diseases of plants. Academic Press. New York. 51-80pp.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas. W.F.O. (1983) *Fusarium* Species: an illustrated manual for identificaction. Pennsylvania State University Press, Estados Unidos de America. 191 p.

- Nelson, E.B.1991. Current limits to biological control of fungal phytopathogens. In: D.K. Arora, B. Rai, K. G. Mukerji and G.R. Knudsen (eds.). Handbook of Applied Mycology. Vol.I: Soil and Plants. Marcel Dekker.New York, USA. pp. 327-335.
- Neuhaus J. M., Sticher L., Meins F. and Boller T. (1991). A short C- terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of Chitinases to the plant vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 88, 10362-10366.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 1992; 30:369–389.
- Oblado E. N; A.S. Hernández-Rosales; M.L. López-Orué. 2004. Extractos vegetales, una opción en el control de la Sigatoka negra. XVI Reunión Internacional. ACORBAT. Oaxaca, México. 184 p.
- Ohr, H.D., Sims, J., Grech N. M., Becker J. O., Mejr M. 1996. Methyl iodide, an oz alternative to methyl bromide as a soil fumigant. *Plant Disease*, 80(7):731-735.
- O'Neill, T.M ., Niv, A., Elad, Y. and Shtienberg, D. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Plant Pathology* 102:635-643.
- Overmyer, K., Tuominen, H., Kettunen, R., Betz, C., Langebartels, C., Sandermann, H., Jr., Kangasjarvi, J. Ozone-sensitive Arabidopsis *rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell* . 2000, 12, 1849-1862.

- Owens-Grillo, J.K., Hoffman, K., Hutchinson, K.A., Yem, A.W., Deibel, M.R., Jr, Handschumacher, R.E. and Pratt, W.B. (1995) The cyclosporin A-binding immunophilin Cyp-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, 270, 20479–20484.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23:23-54.
- Parmar, V. S., S. C. Jain, K. S. Bisht, R. Jain, P. Taneja, A. Jha, O. D. Tyagi, A. K. Prasad, J. Wengel, C.E. Olsen y P.M. Bool 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46: 597-673.
- Payne G., Middlestaedf W., Williams S., Desai N., Carnes M. and Ryds J. (1988). Isolation and nucleotide sequence of a novel Cdna clone encoding the mayor form of Phathogenesis-related protein R. *Plant Molecular Biology* 11, 232.
- Peniche, C.; W. Argüelles, A. Gallardo, C. Elvira, J. San Román. 2001. Quitosano: un Polisacárido Natural Biodegradables y Biocompatibles con Aplicaciones en Biotecnología y Biomedicina, *Rev. de Plásticos Modernos*, Vol. 81: 535.
- Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.-P., Manners, J.M., Broekaert, W.F. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*. 1996, 8, 2309_ 2323

- Peralta I.E., Knapp S.K. y Spooner D.M.2005. New species of wild tomatoes (solanum section Lycopersicon: Solanaceae) *from northern Peru Systematic Botany* 30 (2):424-434.
- Perez-DE-LUQUE, A., JORRIN, J. V., and RUBIALES, D. (2004). Crenate broomrape control in pea by foliar application of benzothiadiazole (BTH). *Phytoparasitica*, 32, 21-29.
- Petersen, M., Strack, D., and Matern, U. 1999. Biosynthesis of phenylpropanoid and related compounds. pp. 151-221. In: M. Wink (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews. Vol. 4.* Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374 p.
- Peumans WJ, Barre A, Derycke V, Rouge P, Wenling Z, May GD, Delcour JA, Van Leuven F, Van Damme EJM. Purification, characterization and structure analysis of an abundant β -1,3-glucanase from banana fruit. *Eur J Biochem* 2000; 267: 1188-1195.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 1998, 10, 1571-1580.
- Pieterse, CMJ; Van Loon,LC. 1999.Salicylic acid-independent plant defence pathways.*Trends in Plant Science* 4:52-58.
- Pisabarro Antonio (2008). Microbiología general.
<http://www.unavarra.es/genmic/introduccion.htm>

- P. Vidhyasekaran. (2007) Handbook of Molecular Technologies in Crop Disease Management. CRC Press; 1 edition.
- Ramírez-Chávez, E., L. Lucas-Valdez, G. Virgen-Calleros y J. Molina-Torres. 2000. Actividad fungicida de afinina y extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* sobre dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia* 34: 207-217.
- Ramírez, V.J. 1998. Enfermedades de la raíz en tomate. Pp. 29-49. En : O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 225 p.
- Rao, M.V., Lee, H.I., Davis, K.R. Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J.* 2002, 32, 447-456.
- Reymond, P., Farmer, E.E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1998, 1, 404-411.
- Richardson M. (1991). Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods I Plant Biochemistry* 5,259-305.
- Rodriguez, G. A. 2006. Injerto y composta para la producción intensiva de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en condiciones de suelo y cultivo sin suelo en invernadero. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Mexico. Pp. 3-23.
- Roiger, D.J., Jeffers, S.N. and Caldwell, R.W. 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 23:353-359.
- Rojo, E., Solano, R., Sanchez-Serrano, J.J. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation* . 2003, 22, 82-98.

- RIDE, J. P. 1980. The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiology Plant Pathology* 16: 187-96.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant cell* 8:1809-1819.
- Rodriguez –Navarro, J.A., E. Zavaleta-Mejia y R. Alatorre-Rosas 1996. Epidemiología y manejo de la roya blanca (*Puccinia horiana* P. Henn.) del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.). *Fitopatología* 31:122-132.
- Rodriguez Dorian A. y Montilla José O. 2002. Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 63 p. 4 6 - 5 0.
- Rojas-Martínez. R.I., E. Zavaleta-Mejía y O. Gomez R. 1994. Efecto de la asociación cempasúchil-jitomate en el daño producido por *Alternaria solani* en jitomate. pp. 25. *In: Memorias XXI Congreso Nacional de Fitopatología*. Cuernavaca, Morelos, México.
- Ruess W., Mueller K, Knauf-Beiter. 1996. Plant activator CGA-245704: An innovative approach for disease control in cereals and tobacco. Pages 53-60 in *Brighton Crop protection conference-Pests and diseases*.
- SAGARPA. 2005., Análisis Agropecuario del Tomate. Boletín Informativo. Culiacán, Sinaloa, México. 9 p.
- Salazar G., M., G. Virgen C., G.L. Angulano, R. Hernandez D., R. Jiménez y V. Olalde P. 1994. Inhibición in vitro de *Fusarium* sp. con bacterias antagónicas de la rizosfera. Pp. 44. *In: Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología*. Cuernavaca, Morelos, México.

- Samaniego, J. 1991. La actividad microbiana en pajas de trigo inoculado con *Trichoderma* sp. y suelos complementados con glucosa y su relación con la variabilidad de los esclerosios de *Phymatotrichum omnivorum*. pp. 180. In: Memorias del XVIII Congreso Nacional de Fitopatología. Puebla, Puebla, México.
- Sánchez, C.M.A. 1998. Enfermedades causadas por hongos en tomate. Pp.17-28. En: O.J. Cruz, R. García E. y A. Carrillo F. (eds.). Enfermedades de las Hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. 225 p.
- Serrano, A. R., DEL CASTILLO, J. L., NOVO, J. J., OCANA, A. F., and RODRIGUEZ, M. V. G. (2007). Chitinase and peroxidase activities in sunflower hypocotyls: effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halstedii*. *Biologia Plantarum*, 51, 149-152.
- Sumerell A B Leslie F J Backhouse D., Bryden L Wayne, Burgess W. L. 2002 *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium . Second printing. The American Phytopathological Society. St Paul Minnesota, USA. 15-23pp.
- Stainer, R. AND M. Doudoroff, M. 1977 Microbiologia. Editorial. Aguilar S. A. Barcelona España. 467 p.m.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., Lehman, C.C. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* ar susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare* . *Plant J* . 1998, 15, 747-754.
- Stadnik, M. J. and BUCHENAUER, H. (1999a). Effects of benzothiadiazole, kinetin and urea on the severity of powdery mildew and yield of winter wheat. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, 106, 476-489.
- Stadnik, M. J. and Buchenauer, H. (1999b). Control of wheat diseases by a benzothiadiazole-derivative and modern fungicides. *Zeitschrift für*

- Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, 106, 466-475.
- Stefanova, N.M. 1997. Control de enfermedades fúngicas del suelo con biopreparados de *Trichoderma harzianum*. Curso Internacional de Sanidad Vegetal. MINAG. Pp. 1-8.
- Sha, J.; KLESSIG, D. F. 1996 identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related? B 1, 3-glucanase gene, PR-2d. *Plant Journal*. 10: 1089-1101.
- Shivaraj B. and Pattabiraman T. N. (1981). Natural Plant enzyme inhibitors. Characterization of an unusual alpha-amylase/trypsin inhibitors from ragi (*Ekeusine coracana*, Geart). *Biochemical Journal* 193, 29-36.
- Skalamera, D; Jibodh, S; Heath, MC. 1997. Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). *New Phytologist* 136:511-524.
- Tello, J.C., Lacasa, A. 1988 Evolucion racial de producciones *Fusarium oxysporum* f, sp.*licopersici*. Boletín de Sanidad Vegeta 1-Plagas 14: 335-341.
- Torres-Barragán, A., E. Zavaleta-Mejía, M.C. González Chávez. Y R. Ferrera-Cerrato 1996. The use of arbuscular mycorrhizae to control onion White rot (*Sclerotium cepivorum* Berck.) under field conditions. *Micorrhiza* 6:253-257.
- Tovar A., R. y H. Gaona. 1993. Efecto de *Glumus* sp (MV-A) sobre la pudrición de la raíz por *Phytophthora* en naranjo. pp. 56. In: Memorias del XX Congreso Nacional de Fitopatología. Zacatecas, México.
- Tum, J., A. Navarrete, J. Quiroz y M. Soria. 1997. Forma y dosis de cempasúchil (*Tagetes patula* L.) aplicado al suelo como nematocida en pepino (*Cucumis sativus* L.). pp. 84.

- In: Memorias del XXIV Congreso Nacional de Fitopatología. Cd. Obregón Sonora, México.*
- Turner, J.G., Ellis, C., Devoto, A. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*. 2002, 14, S153- 164.
- Upadhyay, R.S. y B. Rai. 1998. Biological agents in plant pathology. Pp. 15-36. *In: K. Mukersji y K.L. Grag (eds.). "Biocontrol of plant diseases" Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fl.*
- Valland, G. E.; GOODMAN, R. M. 2004. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.
- Valdez, L. L, Ramírez, Ch. E, Virgen, C. G y Molina, T. J. 2000. Actividad Fungicida de Afinina y Extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* sobre dos especies de *Sclerotium*. www.ira.Cinvestat.mx/bio3-doc7.htm
- Valenzuela –Ureta, J.G., Lawn, D. A., Heisey. R.F., Zamudio, G. V. 1996. First report of *Fusarium* Wilt race 3, Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Licopersici*, of tomato in Mexico *Plant Disease* 80:105.
- Vance, C.P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18: 259-88.
- Van, Haeff, J. N. 1995. Manuales de tomates para educación agropecuaria. Área: producción vegetal. 2º Edición. Editorial Trillas. México, D.F. pp.16.
- Van Loon y Van Kammen. 1970. Electroforesis de poliacrilamida disco de la hoja de proteínas solubles de *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' y 'Samsun NN' II. Los cambios en la constitución de la proteína después de la infección con el virus del mosaico del tabaco. *Virología* 40 199 -211.

- Vermis, W. Nicholson R.L. 2006. Phenolic Compound Biochemistry. Edit. Springer. West Lafayette, Estados Unidos de Norte America, 267 p.
- Vicenzo. L. Lattanzio, V., Cardinali, A. 2006. Role of Phenolics intterestance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Research Singpost. Kerolda India.
- Vigers A.J., Wiedemann S., Roberts W.K., Legrand M., Selitrenikoff C.P. and Fritig B. (1992). Thaumatin like pathogenesis-related proteinsare antifungal. *Plant Science* 83,155,161.l
- Villar E., M.J. y E. Zavaleta-Mejía. 1990. Efecto de *Crotalaria longirostrata* Hook y Arnott sobre nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp). *Revista Mexicana de Fitopatología* 8:38-41.
- Virgen C., G. y J. López N. 1992. Una bacteria atagonica a *Rhizoctonia solani* *in vitro*. pp. 165. *In: Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Saltillo, Coahuila, México.
- Virgen C., G. y J. García C. 1990. Resultados preliminares sobre control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* con *Bacillus subtilis* en sandía, bajo condiciones de campo. pp. 106.
- Virgen –Calleros, G., V. Olalde-Portugal and R. rocha R. 1996. Biological and chemical control of *Rhizoctonia solani* on potato in Guanajuato, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14: 180.
- Walters D., Newton A., Lyon Gary (2007) *Induced resistance for plant defence*. Blackwell Publishing.

- Ward, E. R.; Uknes, S. J.; Williams, S. C.; Dincher, S. S.; Wiederhold, D. L.; Alexander, D. C.; Ahl goy, P.; Metraux, J.P.; Ryals, A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094.
- www.siap.sagarpa.gob.mx Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP,SIACON, Anuario Agrícola por Municipio SAGARPA 2005.
- Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Tomate.
- Wells, H.D., Bell, D.K. and Jaworski, C.A. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62:442-447.
- Yáñez J., M.A. 1997. Manejo de la marchitez (*Phytophthora capsici* Leo), agallamiento radical (*Nacobbus aberrans* Thorne y Allen) y virosis del chile (*Capsicum annum* L.). Tesis de Maestria. Colegio de Posgraduados, Montecillo, México.
- Yedidia I., Benhamou N. and Chet I. (1999) Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Applied And Environmental Microbiology* 63 (3) 1061–1070
- Zapata. R. SABABRIA. M, RODRIGUEZ.D. 2003. Reducción del desarrollo de hongos fitopatogenos con extracto de cardón lefaria. *Interciencia*, mayo, año/vol. 28, número 005, Caracas Venezuela. Pp. 302 – 306.
- Zavaleta –Mejía, E. 1994. Control biológico de fitopatogenos. Pp 115-125. *In:* R. Alatorre R. y A.W. Guzmán F. (eds.). *Memóales V Curso de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México.
- Zavaleta-Mejia, E. y R.I.Rojas M. y M. Zavaleta M. 1990 Effect of volatiles emanated from brassicaceous (cruciferous) residues on some soil-borne pathogens. pp. 118-123. *In:*

- Report on the Workshop on Chemical Interactions Between Organisms, Santiago, Chile. International Foundation for Science-IFS, Stockholm, Sweden.
- Zavaleta-Mejia, E. y R.I. Rojas M. 1990. The effects of *Brassica* crop residues on *Sclerotium cepivorum* berk. Pp. 185-192. In: Proceedings of the Fourth International Workshop on *Allium* White Rot. A. Entwistle R. Y P. MATTUSCH (EDS.). Neustandt-Mussbach, Federal Republic of Germany.
- Zavaleta-Mejia, E. y R.I.Rojas M. 1989. Antagonismo de *Serratia marcescens* Bizio (Enterobacteriaceae) sobre *Fusarium oxysporum* Schlect, f.sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyd. y Hans. Revista Mexica de Fitopatología 7:113-118.
- Zavaleta-Mejia, E. y D.L. Ochoa M. 1992. Efecto de diferentes formas de asociación jitomate-cempasúchil en la producción de jitomate e infección por *Nacobbus aberrans*. pp. 140. In: Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Saltillo, Coahuila, México.
- Zavaleta-Mejia, E. y O. Gomez R. 1994. Efecto de la combinación de varias estrategias de control en la producción de varias estrategias de control en la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*) de la cebolla. pp. 30. In: Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Cuernavaca, Morelos, México.
- Zavaleta-Mejia, E. y O. Gomez R. 1995. Effect of *Tagetes erecta* L. – tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) intercropping on some tomato pests. Fitopatología 30:35-46.
- Zhu, X., CAO, J., WANG, Q., and JIANG, W. (2008). Postharvest infiltration of BTH reduces infection of mango fruits (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) by

Colletotrichum gloeosporioides and enhances resistance inducing compounds. *Journal of Phytopathology*, 156, 68-74.

Zhu, Y. J., FERREIRA, S., FITCH, M. M. M., and MOORE, P. H. (2002). Benzothiadiazole (BTH) activates systemic acquired resistance (SAR) responses in papaya to reduce disease symptoms of seedlings inoculated with *Phytophthora palmivora*. *Proceedings of the International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits, Vols 1 and 2*, 475-481.

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