

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Evaluación de la Respuesta de Defensa en Plantas de Tomate Tratadas Con Un
Producto a Base de Extractos Naturales

Por:

ALEXANDER SANDOVAL MENDOZA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Febrero, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Evaluación de la Respuesta de Defensa en Plantas de Tomate Tratadas con Un
Producto a Base de Extractos Naturales

Por:

ALEXANDER SANDOVAL MENDOZA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada

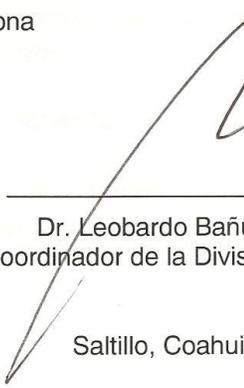
Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor Principal



Dra. Susana Solís Gaona
Coasesor



Dra. Susana Gonzales Morales
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Febrero, 2014

DEDICATORIA

A tí madre: CLARISELA MENDOZA GONZÁLEZ.

Por darme la vida, cariño y amor, con tu paciencia y cuidado que en los momentos difíciles siempre encontramos una sonrisa y salimos adelante, tú siempre me apoyaste en mi decisión de estudiar, gracias por tus oraciones, por darme tu bendición siempre, que de tu lado partía que fueron momentos difíciles para mí pero que hoy tienen su recompensa. Te amo mamá.

A tí padre: OCTAVIO SANDOVAL RUIZ.

Por todo tú amor, cariño, paciencia y de tus sabios consejos que me ayudaron a desarrollarme y formarme como un hombre de bien, también por ser un gran impulso para lograr mis sueños, el apoyo incondicional que siempre he tenido de usted a cada paso que doy en la vida y en mis decisiones. Te agradezco porque sé que siempre has querido lo mejor para mí... Te quiero mucho. Que dios los cuide, proteja y bendiga por siempre.

A mí hermano: OCTAVIO SANDOVAL MENDOZA.

Por brindarme su apoyo incondicionalmente siempre que lo necesito, por darme la confianza de seguir adelante con mi sueño, que hoy he cumplido con satisfacción, gracias por el amor y cariño, los llevo en mi mente y mi corazón.

A MIS TÍOS Y PADRINOS.

Para todos ellos que me dieron su apoyo incondicional, pues siempre me colmaron de grandes cosas como la del respeto hacia las demás personas.

A MIS ABUELOS.

David Sandoval (+), Caridad Ruíz (+), Antonio Mendoza y María Magdalena González. Porque ellos siempre enseñaron las buenas acciones en la familia y sé que hasta donde ellos estén les da satisfacción el que haya terminado mi carrera.

A MIS AMIGOS.

Elmer, Alexander, Mariano, Pedro, Luis A., Luis A. R., Eray, Juan Carlos, Alonso, Wilber, Diego, Isaac, Iset, Dora Anabel, Antonia, Felicitas, Yesica, Miriam, Selene Nelí Tera. Gracias a todos ellos por los buenos momentos de convivencia y apoyarme en las buenas y en las malas, y aunque no todos estuvieron en la universidad conmigo siempre me llenaron de alegría y buenos consejos que fueron de provecho para mí.

Señor protege a toda mi familia y mis amistades en donde quiera que estén...Gracias!!

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por darnos la vida y formar parte de su divina creación, Por darme la capacidad, sabiduría y paciencia para terminar mis estudios, gracias por darme la mano cuando más lo necesito y proveerme de salud y mentalidad en este largo caminar, hoy por tí he terminado otra etapa importante de mi vida; Gracias Dios, por enseñarme y guiarme por el buen camino con todo su Amor, Luz, Paz y sus Bendiciones.

A MI ALMA TERRA MATER.

Mi universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, que me cobijó durante todo este tiempo, gracias por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de tener el privilegio de ser otro aprendiz más que hizo historia en tu regazo.

A LA DRA. SUSANA GONZÁLEZ MORALES.

Estoy muy agradecido de todo corazón con usted que me ha apoyado y por darme la oportunidad de realizar este trabajo, de su dedicación y tiempo que ha invertido para que saliera muy bien. Y mis respetos y admiración por la ética y el amor que le tiene a su trabajo. De nuevo, mil gracias.

A LA DRA. SUSANA SOLÍS GAONA.

Por su conocimiento y tiempo aportado para la realización de esta investigación por la dedicación y tiempo que ha invertido, y por qué en ella encontré una gran enseñanza.

AL DR. ADALBERTO BENAVIDES MENDOZA.

Por brindarme su apoyo durante la realización de esta investigación.

AL M.C. JOSÉ OMAR CÁRDENAS PALOMO.

Por su generosidad, su incondicional apoyo y la gran confianza que me demostró en mi estancia en la empresa Palau Bioquím, porque en él encontré una gran enseñanza, un excelente amigo, gracias por todo.

ING. JUAN MAYO.

Por brindarme su amistad y confianza, por apoyarme en este trabajo realizado y compartir sus ideas y experiencia.

A LA ING. MARÍA CONCEPCIÓN SANTIAGO GARCÍA

Por sus sugerencias y comentarios constructivos que me sirvieron de mucho para este trabajo de investigación.

A MIS SINODALE.

DRA. SUSANA GONZÁLEZ MORALES

DRA. SUSANA SOLIS GAONA

DR. VALENTÍN ROBLEDO TORRES

Les agradezco por darme la oportunidad y el tiempo que me han dedicado para revisar este trabajo, de sus valiosos consejos que fortalecen mis conocimientos y enriquece al mismo tiempo mi trabajo de tesis. Del amor y ética al trabajo que desarrollan en la universidad y fuera de ella para transmitir sus conocimientos a cada uno de nosotros, para la formación personal y académico.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vii
INDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
HIPÓTESIS	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Origen e Historia del Tomate.....	5
Clasificación taxonómica del tomate	6
Importancia del tomate a nivel mundial.....	6
Importancia del tomate a nivel nacional.....	6
Principales estados productores	7
Morfología del tomate	8
Requerimientos climáticos	9
Principales plagas y enfermedades del tomate	10
Mecanismos de resistencia de plantas hacia enfermedades	11
Resistencia en plantas	11
Resistencia sistémica inducida y Resistencia sistémica adquirida.....	13
Ácido salicílico.....	15
Ácido jasmónico.....	16
Moléculas activadoras que inducen resistencia.....	17
Benzothiadiazole BHT	17
Quitosán	19
Acibenzolar s metil (ASM)	19
Metabolitos antioxidantes	21
Antioxidantes enzimáticos	22

Glutación peroxidasa (GPx).....	22
Superóxido Dismutasa(SOD).....	23
Catalasa	24
MATERIALES Y METODOS	26
Ubicación del experimento.....	26
Diseño experimental.....	26
Aplicación de tratamientos.....	27
Muestreo.....	27
Análisis de actividad enzimática relacionada a inducción de resistencia.....	27
Extracción de catalasa	27
Actividad enzimática Superoxido dismutasa	28
Determinación de proteínas totales	29
Actividad enzimática glutación peroxidasa	29
Extracción de ARN	30
Método de Trizol.....	30
Cuantificación de ARN	30
Calidad del ARN.....	31
Síntesis de c-ADN.....	33
Primera reacción.....	33
Segunda reacción	33
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	34
Electroforesis horizontal de agarosa	35
Análisis semi-cuantitativo	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
Actividad enzimática.....	37
Actividad catalasa especifica	37
Actividad superóxido dismutasa	40
Actividad glutación peroxidasa.....	43
Expresión cualitativa de genes	46
Expresión semi-cuantitativa de genes	55
CONCLUSIONES	59
LITERATURA CITADA.....	60

INDICE DE CUADROS

Tabla 1: Descripción del procesamiento de valores para la cuantificación del ARN.	31
Tabla 2: Descripción de los cálculos para la muestra ARN en electroforesis desnaturizante (Calidad de ARN).	32
Tabla 3: Descripción de los iniciadores utilizados en este estudio.	35
Tabla 4: Valores obtenidos en la cuantificación de ARN por espectrofotometría.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Actividad catalasa específica de plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 Y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración).....	38
Figura 2: Actividad catalasa específica de plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 Y ASM a diferentes dosis (segundo muestreo a 54 ddt en etapa de inicio de floración)	39
Figura 3: Actividad catalasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos).....	40
Figura 4: Actividad superóxido dismutasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración)	41
Figura 5: Actividad superóxido dismutasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (segundo muestreo a 54 ddt en etapa de inicio de fructificación).....	42
Figura 6: Actividad superóxido dismutasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos).....	43

Figura 7: Actividad glutatión peroxidasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración).	44
Figura 8: Actividad glutatión peroxidasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (segundo muestreo a 54 ddt en etapa de inicio de fructificación)...	45
Figura 9: Actividad glutatión peroxidasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos).....	46
Figura 10: Electroforesis desnaturalizante con gel de agarosa al 1.3%	48
Figura 11: Amplificación del gen SAR por PCR de las muestras obtenidas en los tres muestreos a una temperatura de anillamiento de 60°C	49
Figura 12: Amplificación del gen SIR por PCR de las muestras obtenidas en los tres muestreos a una temperatura de anillamiento de 60°C	51
Figura 13: Amplificación del gen AT por PCR de las muestras obtenidas en los tres muestreos a una temperatura de anillamiento de 60°C	52
Figura 14: Amplificación del gen endógeno G3F por PCR de las muestras obtenidas en los tres muestreos a una temperatura de anillamiento de 60°C	54
Figura 15: Expresión semi-cuantitativa del gen SAR, en las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración, segundo a 54 ddt en etapa de llenado de fructificación y tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos).	56
Figura 16: Expresión semi-cuantitativa del gen SIR, en las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración, segundo a 54 ddt en etapa de llenado de fructificación y tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos).	57
Figura 17: Expresión semi-cuantitativa del gen SAR, en las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (primero, segundo y tercer muestreo).	58

RESUMEN

Este trabajo se realizó con el propósito de evaluar el efecto de los productos ALSMX-080 y ASM en inducción de respuesta de defensa de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* Var. Río Grande) bajo invernadero, se realizaron cuatro aplicaciones vía foliar del producto a base de extractos vegetales ALSMX-080 a concentraciones de 0.5, 1, y 1.5 ml/L y del elicitor comercial ASM a 0.05, 0.075, 0.1 g/L, además de tener un tratamiento como Testigo. Para medir el efecto de las aplicaciones de tratamientos en plantas de tomate en tres fechas de muestreo durante floración y fructificación, fueron evaluadas; la actividad de las enzimas relacionadas con inducción de resistencia (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa) en plantas, así como la expresión de tres genes relacionados a inducción de resistencia mediante RT-PCR. Los resultados obtenidos muestran que las aplicaciones de los elicitors ALSMX-080 y ASM tienen efecto en sobreexpresión de al menos alguno de los genes bajo estudio así como en incremento de la actividad enzimática.

Palabras clave: tomate, inductores de tolerancia, catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de hortalizas contribuye en forma importante con la economía de México. En la actualidad se siembran 512,000 ha de este grupo hortícola con una producción de 8 millones de toneladas, de las cuales se exportan 600 mil toneladas anuales aproximadamente y tienen su destino principal a Estados Unidos y Canadá (SIAP, 2000).

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia comercial en el mundo, y está priorizado entre las hortalizas debido a su alta demanda y a la gran importancia que posee en la dieta de la población, tanto en consumo fresco como en conservas, en forma de jugos o pastas. (Faostad, 2005).

La producción mundial de tomates en el 2005 fue de 94.11 millones de toneladas (Anónimo, 2005). Siendo los principales países productores de tomate en fresco China, India, Estados Unidos, Turquía e Italia. En México se cultivan alrededor de 20,000 ha, con una producción de 2.8 millones de toneladas (Anónimo, 2005).

No obstante, el rendimiento es bajo en la mayoría de los países tropicales, debido fundamentalmente al efecto negativo que ejercen los factores climáticos, tales como las altas temperaturas, lluvias y humedad relativa, así como la incidencia de plagas y enfermedades, y las condiciones adversas que puedan presentarse, (Prohens, 2008).

Uno de los métodos potenciales de reducir la severidad de las enfermedades causadas por patógenos, es la inducción de resistencia en la planta (Baysalet al. 2003). Dicha actividad está asociada a numerosas respuestas de defensa activadas por el hospedero

después del contacto con el patógeno (Borboet *al.*, 2009) o con algún inductor biótico o abiótico (Valuevaet *al.*, 2004).

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).

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 (Kagaleet *al.* 2004).

OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta de inducción de resistencia en plantas de tomate tratadas con un producto comercial a base de extractos naturales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudio de la respuesta de inducción de resistencia en plantas de tomate tratadas con un producto comercial mediante el análisis de la actividad específica de las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa.
2. Estudio de la respuesta de inducción de resistencia en plantas de tomate tratadas con un producto comercial mediante el análisis de expresión de genes relacionados a la inducción de resistencia biótica y abiótica por RT-PCR.

HIPÓTESIS

Las aplicaciones de un producto comercial a base de extractos naturales, tendrá un efecto en incremento de actividad de alguna de las enzimas y/o expresión de genes bajo estudio en las plantas de tomate.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen e Historia del Tomate

El origen del género *Solanum* se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile, pero parece que fue en México donde se domesticó, quizá porque crecía como arvense entre los huertos. Durante el siglo XVI se consumían en México de distintas formas y tamaños e incluso rojos y amarillos, pero para entonces ya había sido llevado a España y servía como alimento también en Italia. En otros países europeos solo se utilizaban en farmacias y así se mantuvieron en Alemania hasta el siglo XIX. Los españoles y portugueses difundieron el tomate a Oriente Medio y África, de allí a otros países asiáticos y de Europa se difundió a Estados Unidos y Canadá (Marroquín, 2005).

El lugar donde se produjo la domesticación ha sido controvertido los nombres de *mala peruviana* o *pomi del Perú* dados por algunos botánicos del siglo XVI, quienes hicieron suponer que había sido domesticado en Perú. Estudios posteriores indican que el tomate fue domesticado en México por los aztecas y a ellos se debe el nombre actual; ya que esta cultura lo llamo *tomatl*(Candolle, 1883).

El cultivo del tomate se dio a conocer a nivel mundial después de la llegada de los españoles a México; pero no fue hasta 1554 que el cultivo fue introducido a Europa (Rick, 1978).

Clasificación taxonómica del tomate (Nuez, 2001).

Clasedicotyledoneas

Ordensolanales (Personatae)

FamiliaSolanaceae

SubfamiliaSolanoideae

TribuSolaneae

GéneroLycopersicum

EspecieEsculentum

Importancia del tomate a nivel mundial

El tomate es la hortaliza más cultivada en el mundo, con una superficie total de cultivo de alrededor de 2.5 millones de hectáreas; con una producción mundial de aproximadamente 77, 538,000 toneladas, siendo China el principal productor a nivel mundial además de Estados Unidos, India, Turquía, Italia, España y Egipto; ubicándose México hasta el décimo lugar en la producción mundial (Macuaet *al.*, 2012).

Importancia del tomate a nivel nacional

La producción de tomate en México sigue una ruta de “ventanas productivas”; inició masivamente en la década de los 60, por la intervención de capital estadounidense, con el objetivo de cubrir la demanda de Estados Unidos durante la época invernal (Macías, 2003).

Las hortalizas contribuyen aproximadamente con poco más de 3% de la superficie agrícola sembrada en México (Macías, 2003). Según cifras del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) la superficie sembrada en 2008 fue de 57,200 ha,

lográndose un volumen de producción de 2,263,200 ton, siendo la hortaliza con mayor volumen de producción en México (Sagarpa, 2010).

La superficie del estado de Sinaloa dedicada a la siembra de este cultivo representó el 33.5% respecto al total nacional, San Luís Potosí el 9.3%, Baja California el 8.8% y Michoacán 7.7% (Melchor, 2006). Los anteriores estados junto a Jalisco y Baja California Sur aportan el 65.7% de la producción. Produce México 39.5 ton/ha. En cuanto al rendimiento, Jalisco, Querétaro, Baja California tienen un rendimiento por encima del promedio nacional. Con base en cifras preliminares en 2009 la superficie sembrada ascendió a 101 mil 328 ha, superficie superior a las extensiones territoriales de países completos, como Andorra (46 mil 800), Malta (31 mil 600), o San Marino (6 mil 100); entre otros (Tonche, 2005; Ramos y Carballo, 2006).

Principales estados productores

En la República Mexicana, se produce tomate durante todo el año. En el análisis temporal, durante los primeros meses del año, es cuando se genera el tope de producción nacional, en el estado de Sinaloa, que abastece al mercado nacional y la mitad del norteamericano. Por otro lado, durante el verano, la producción de los estados del centro y de Baja California, es la que abastecen la demanda interna y de exportación. Finalmente, en los meses de agosto a diciembre, son otras entidades las que cubren la producción.

En la distribución por estados, se encuentra Sinaloa con 345,011.10 toneladas como el principal productor de jitomate, principalmente de tipo Saladette. En segundo lugar está Baja California, con 162,324.92 toneladas, que produce principalmente, el jitomate que se exporta. En los últimos años, México ha ocupado el primer lugar en exportaciones del

producto. Tiene su principal mercado en Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, España, Alemania, Suiza y Australia, (Inforural, 2012).

Morfología del tomate

Raíz. El tipo de raíz depende del sistema de cultivo, los tomates sembrados en forma directa presentan un sistema radicular pivotante, profundo y poco ramificado, mientras que los sembrados por trasplante poseen raíces más superficiales y más ramificadas (Jaramillo y Arias, 1997).

Tallos. Los tallos y ramas son de consistencia herbácea, por lo cual la planta no se sostiene por sí sola, teniendo que emplearse tutores para su cultivo. El tallo principal presenta protuberancias en la zona proximal al cuello de la raíz, que pueden originar raíces adventicias cuando se rodea de suelo hasta la primera hoja (Jaramillo y Arias, 1997).

Hojas. Las hojas son compuestas, imparipinadas y están recubiertas de una fina velloidad, los bordes de las hojas son lobulados (Jaramillo y Arias, 1997).

Flores. Las flores son pentámeras o hexámeras, los estambres se encuentran soldadas entre sí, formando un cono estaminal alrededor del pistilo, cuyo estigma se encuentra por debajo de la superficie del cono estaminal, con lo cual se asegura la autopolinización. Las flores se encuentran agrupadas en inflorescencias o tipo de racimo; en la planta el cuajamiento de los frutos ocurre de abajo hacia arriba, esto quiere decir, de las inflorescencias inferiores a las superiores (Jaramillo y Arias, 1997).

Fruto. El fruto es una baya de forma y tamaño variable, está dividido en cinco partes, pared externa e interna, tejido locular, pulpa gelatinosa, piel y semillas. El color del fruto depende de la presencia de pigmentos carotenoides y es un aspecto fundamental de la calidad (Jaramillo y Arias, 1997).

Semillas. Son ligeramente pubescentes y aplanadas, el embrión está colocado en espiral, envuelto por el endospermo; la viabilidad de la semilla es de tres a cuatro años, aun cuando en algunos casos se conserva hasta los 12 años (Jaramillo y Arias, 1997).

Requerimientos climáticos

Temperatura: La temperatura óptima de desarrollo oscila entre 20 y 30°C durante el día y entre 1 y 17°C durante la noche; temperaturas superiores a los 30-35°C afectan a la fructificación, por mal desarrollo de óvulos y al desarrollo de la planta en general y del sistema radicular en particular. Temperaturas inferiores a 12-15°C también originan problemas en el desarrollo de la planta.

A temperaturas superiores a 25°C e inferiores a 12°C la fecundación es defectuosa o nula.

La maduración del fruto está muy influida por la temperatura en lo referente tanto a la precocidad como a la coloración, de forma que valores cercanos a los 10°C así como superiores a los 30°C originan tonalidades amarillentas.

No obstante, los valores de temperatura descritos son meramente indicativos, debiendo tener en cuenta las interacciones de la temperatura con el resto de los parámetros climáticos, (Infoagro, 2013).

Humedad: La humedad relativa óptima oscila entre un 60% y un 80%. Humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y el agrietamiento

del fruto y dificultan la fecundación, debido a que el polen se compacta, abortando parte de las flores. El rajado del fruto igualmente puede tener su origen en un exceso de humedad edáfica o riego abundante tras un período de estrés hídrico. También una humedad relativa baja dificulta la fijación del polen al estigma de la flor, (Infoagro, 2013).

Luminosidad: Valores reducidos de luminosidad pueden incidir de forma negativa sobre los procesos de la floración, fecundación así como el desarrollo vegetativo de la planta. En los momentos críticos durante el período vegetativo resulta crucial la interrelación existente entre la temperatura diurna y nocturna y la luminosidad, (Infoagro, 2013).

Suelo: La planta de tomate no es muy exigente en cuanto a suelos, excepto en lo que se refiere al drenaje, aunque prefiere suelos sueltos de textura silíceo-arcillosa y ricos en materia orgánica. No obstante se desarrolla perfectamente en suelos arcillosos enarenados. En cuanto al pH, los suelos pueden ser desde ligeramente ácidos hasta ligeramente alcalinos cuando están enarenados. Es la especie cultivada en invernadero que mejor tolera las condiciones de salinidad tanto del suelo como del agua de riego, (Infoagro, 2013).

Principales plagas y enfermedades del tomate

Dentro de las plagas más importantes se encuentran: gusano cortador (*Agrotis* spp), grillo (*Achetadomesticus* y *gryllusbimaculatu*), hormiga (*Solenopsis*), pulgones (*Myzuspersicae*), arañita roja (*Tetranychusurticae*), 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 dispares. En el lugar del picado se endurece la carne del fruto (Van Haeff, 1995).

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 (Agrios, 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*, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, entre otros (Steiner y Doudoroff, 1977).

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).

Mecanismos de resistencia de plantas hacia enfermedades

Para comprender como se induce la respuesta de resistencia de las plantas hacia patógenos, a continuación se explica de manera general en qué consiste dicho proceso.

Resistencia en plantas

Las plantas son atacadas continuamente por muchos patógenos pero también son resistentes a la vasta mayoría de ellos. Estas pueden tener un sofisticado sistema de defensa para combatir los patógenos que hacen uso de diversas estrategias de infección. Sin embargo, los patógenos han sido capaces de desarrollar mecanismos para suprimir o vencer el sistema de

defensa de su hospedero. Virus, bacterias y hongos requieren al menos en ciertos estados de su ciclo de vida, de células hospederas para reproducirse (biotropos obligados, biotropos o hemibiotropos), donde algunos de ellos usan enzimas tóxicas o metabolitos para matar o vivir en las células muertas (necrotropos) (Custers, 2007a).

Las plantas emplean diferentes líneas de defensa. Una primera línea pasiva de defensa es la cutícula cerosa y la pared celular de las plantas con la cual previene la entrada de muchos patógenos y sirve de protección contra la desecación. La cutícula de muchos órganos de las plantas está compuesta de ácidos grasos conocidos como ceras. Varios virus, bacterias y hongos patógenos son incapaces de atravesar esta capa y solo pueden hacerlo a través de heridas o aperturas naturales como estomas o hidátodos. Algunos como *Magnaporthe grisea* y *Colletotrichum* sp, han desarrollado mecanismos para entrar a las plantas a través de la cutícula por medio de apresorios que penetran generando una turgencia que provoca la ruptura mecánica de la misma. Otros como *Fusarium* sp producen cutinasa, una enzima que disuelve la capa cerosa. La importancia de la capa cerosa en prevenir la entrada de patógenos, fue revelada por plantas mutantes de *Sorghum bicolor*, en las cuales se logró reducir la deposición de cutícula y en consecuencia, se generó susceptibilidad a hongos patógenos como *Exserohilum turcicum* (Custers, 2007a).

Aun cuando el patógeno rompe mecánicamente dichas barreras de defensa, muchas plantas presentan cantidades significativas de compuestos antimicrobianos tales como: fenoles, glucósidos fenólicos, lactosas insaturadas, compuestos sulfurados, saponinas, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.

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 (Walterset *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 (Ruesset *al.*, 1996).

La RI surgió como una importante alternativa de control de patógenos (Barbosa MAG, *et al.*, 2008), la cual considera que las “armas” con las cuales las plantas se defienden, involucran a un gran número de pequeñas moléculas exógenas denominadas inductores o agentes inductores (Cavalcanti LS, *et al.*, 2005), que cuando son reconocidas por moléculas endógenas, tienen la función de activar o aumentar el nivel de resistencia de los vegetales, tanto a nivel local como en puntos distantes al sitio de infección, así como de participar de otras actividades fisiológicas, (Schreiber K, *et al.*, 2008).

El término “resistencia inducida” fue propuesto en el Primer Simposio Internacional de Resistencia Inducida a Enfermedades de Plantas (First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases) realizado en Corfú, Grecia, en el año 2000, para designar a todos los tipos de respuestas que incitan a las plantas a protegerse de las enfermedades y de plagas de insectos, incluyendo tanto respuestas locales como sistémicas (Angarita AS. R. 2001; Cavalcanti LS, *et al.*, 2005). Esta expresión involucra a los fenómenos de Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y Resistencia Sistémica Inducida (RSI), comúnmente utilizados, que aunque son distintos, fenotípicamente son semejantes. La similitud de ambos se basa en que, las plantas, luego de ser expuestas a un agente inductor, activan sus

mecanismos de defensa tanto en el sitio de infección como en áreas más distantes (respuestas sistémicas), de manera más o menos generalizada (Cavalcanti LS, *et al.*, 2005).

Ácido salicílico

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 ácido salicílico 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. 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.

Resistencia sistémica adquirida (RSA) también puede ser liberada rociando o inyectando a las plantas ácido salicílico, o por tratamiento con H₂O₂, 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.

Ácido jasmónico

El ácido jasmónico (JA), participa en la señalización de las respuestas vegetales frente a diversos estrés de tipo abiótico como el salino (Abdala y cols., 2003; Tsonev y Cols., 1998), el osmótico (Kramell y Cols., 1995), el hídrico (Wang, 1999), el inducido por bajas temperaturas (Lee y Cols., 1996), y por metales pesados (Xiang y Oliver, 1998). El JA también está implicado en la inducción de la maduración organoléptica en diversos frutos climatéricos mediante la regulación positiva o negativa de la producción de etileno (Peña-Cortés y OLS., 2005).

El ácido jasmónico se encuentra en muchas especies vegetales y está involucrado en diversas funciones incluyendo la resistencia y senescencia de la planta. El ácido jasmónico es producido por la planta después del daño producido por una oruga resultando un incremento de la producción de compuestos de resistencia, (G. Camarena, 2002).

El ácido jasmónico ahora es un miembro apreciado dentro de un gran grupo de compuestos relacionados biosintéticamente y estructuralmente denominados jasmonatos u octadecanoide ácido α -linolénico. Después se descubrió que el metil-jasmonato es un inductor de la síntesis de inhibidores de proteasas de insectos en tomate, una respuesta disparada normalmente por el ataque de herbívoros, (Farmer *et al.*, 1990).

Moléculas activadoras que inducen resistencia

El concepto de activador desde el inicio, fue utilizado para moléculas capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en la planta, en ausencia del patógeno (Albersheim y Valent 1978, Keen *et al.*, 1972). En la actualidad, esta definición, se ha generalizado y aceptado para cualquier molécula química que pueda estimular mecanismos de defensa o asociados con la respuesta de defensa de las plantas. Estas moléculas activadoras hacen referencia a un amplio ámbito de compuestos, los cuales pueden ser derivados a partir de plagas, de plantas u de otros microorganismos así como a partir de preparadores fisiológicos de origen vegetal o de análogos producidos sintéticamente. Las moléculas activadoras no deben ser tomadas como sustitutos de fungicidas, sino como una alternativa adicional dentro de una estrategia de manejo integrado (Lyon Newton, 2000).

Las moléculas activadoras de inducción de resistencia pertenecen a familias químicas diversas como ácidos grasos, RNA levaduras, glicoproteínas, proteínas, péptidos, glicolípidos, lípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, entre otras.

Benzothiadiazole BTH

El S-metilbenzo [1, 2,3] tiadiazol-7-carbotioato (BTH) suministra protección frente a diversas enfermedades en una amplia gama de cultivos (Colson-Hankset *et al.*, 2000; Maxson-Steinet *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 (Louwset *al.*, 2001). También se han realizado ensayos en otras solanáceas como tomate y tabaco (Csinoset *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-Steinet *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.

Quitosán

El quitosán es un producto natural derivado de la quitina. Químicamente el quitosán es una sustancia natural muy similar a la celulosa ya que se obtiene de la N-deacetilación de la quitina pudiendo ser mediante métodos químicos, físicos y/o enzimáticos (Synoiewick, 2003). Dos de los parámetros más importantes que influyen en la aplicación de dicho polímero son: el grado de polimerización y el grado de desacetilación, los cuales dependen del peso molecular.

Diferentes derivados del quitosán han sido implicados en la inducción de la resistencia al ataque de insectos y patógenos, principalmente a través de la vía del jasmonato, que está también implicado en la respuesta a estrés hídrico (Munemasa *et al.*, 2007).

Al aplicarlo directamente a los tejidos de la planta el quitosán induce la peroxidación de lípidos (Dubery *et al.*, 2000) y la producción de especies reactivas de oxígeno (Orozco-Cardenas y Ryan, 1999), promoviendo de esa forma la activación de respuestas de defensa contra el estrés biótico y abiótico (Lee *et al.*, 1999). En cambio, al aplicarlo en el sustrato (Ohta *et al.*, 1999), es probable que el quitosán actúe como un efectivo agente quelatante (Rathke y Hudson, 1994). Sin embargo, la funcionalidad y actividad del quitosán depende de sus características físicas como el peso molecular y el grado de acetilación.

Acibenzolar s metil (ASM)

Resistencia sistémica adquirida (SAR) es una defensa de la planta natural que puede conferir una protección duradera frente a un amplio espectro de microorganismos (Durrant y Dong, 2004; Van Loon *et al.*, 2006). SAR requiere el ácido salicílico molécula de señal

(SA) y está asociado con la acumulación de (PR) proteínas relacionadas con la patogénesis, que se cree que contribuyen a la resistencia. SAR puede ser activado en ausencia de agentes patógenos mediante el tratamiento de las plantas con inductores químicos (Gorlach *et al.*, 1996). Acibenzolar - S metil (ASM), un homólogo funcional del ácido salicílico, es el más conocido inductor producido en el comercio de SAR (Tally *et al.*, 1999). La expresión de la proteína PR (β - 1,3 glucanasa) gen, PR-2, en cítricos aumentó en respuesta a ASM y ácido isonicotínico (INA). El insecticida imidacloprid (IMID) se descompone en planta en ácido 6-cloronicotínico, un análogo de INA que induce la respuesta SAR (Ford *et al.*, 2010; Sur y Stork, 2003). Francis *et al.*, (2009) confirmó en un ensayo en macetas de invernadero que empapa el suelo de IMID así como INA y ASM indujeron una regulación de alta y persistente de la PR-2 en la expresión de genes que se correlaciona con la reducción de las lesiones bucales durante un máximo de 24 semanas.

ASM y otros inductores comerciales de la resistencia han sido evaluados ampliamente como un componente para el control de enfermedades de las plantas en el campo (Vallad y Goodman, 2004; Walters y Fountaine, 2009). En la producción de cítricos de la Florida, la insecticidas neonicotinoidesimidacloprid (Admire Pro) y tiametoxam (THIA) se aplican como el suelo empapa a los árboles no portantes para el control del minador de los cítricos (*Phyllocnistiscitrella*) y la infección asociada de galerías de minadores de hojas por Xcc (Rogers, 2012). Neonicotinoides sistémicos son aún más importantes para la reducción de la transmisión por el vector psílido (*Diaphorinacitri*) de *CandidatusLiberibacterasiaticus* (Las), el agente causal de la enfermedad Huanglongbing (HLB) enfermedad (Graham *et al.*, 2013B). HLB se detectó por primera vez en Florida a finales de 2005 y ahora es ampliamente distribuida en todas las regiones cítrícolas comerciales (Gottwald, 2010).

Rubores vigorosos repetidas de los árboles jóvenes son muy propensos a los daños de alimentación y minador psílido con la posibilidad de un rápido incremento en Las infecciones (Gottwald, 2010) y Xcc inóculo (Steinet *al.*, 2007), respectivamente. Las aplicaciones al suelo de la neonicotinoides, IMID y THIA y ASM o rotaciones de la temporada larga de ASM con IMID y THIA demostraron ser muy eficaces para reducir la infección foliar y deshoje inducido cancro - en los jóvenes árboles de toronja no portantes (Graham y Myers, 2011).

Metabolitos antioxidantes

El término “antioxidante” se refiere a cualquier molécula capaz de estabilizar o desactivar los radicales libres antes de que puedan atacar las células. Los seres humanos han desarrollado sistemas altamente complejos de antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) que trabajan sinérgicamente y en combinación con otros para proteger las células y los sistemas de órganos contra los daños causados por los radicales libres. Los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos. Algunos de los componentes de la dieta que no neutralizan los radicales libres, pero aumentan la actividad endógena, también se pueden clasificar como antioxidantes (Rahman, 2007).

En condiciones que favorecen el estrés oxidativo, los antioxidantes endógenos pueden ser insuficientes, por lo que los antioxidantes de la dieta pueden resultar necesarios para mantener las funciones celulares óptimas. Los antioxidantes enzimáticos más eficientes son la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen las vitaminas E y C (Rahman, 2007), el zinc (Song Y et al., 2010), el

grupo de los tioles, la melatonina, los carotenoides y los flavonoides, entre otros (Rahman, 2007).

Antioxidantes enzimáticos

Glutación peroxidasa (GPx)

Entre las enfermedades con potencialidades para ser tratadas con plantas medicinales se encuentra un grupo numeroso de patologías asociadas al estrés oxidativo, tales como: trastornos cardiovasculares y gastrointestinales, procesos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, desórdenes de la fertilidad y diabetes, entre otras (Patel *et al.*, 2006; Küpeli *et al.*, 2007; Ronald *et al.*, 2007; Bucciarelli y Skliar, 2007). El estrés oxidativo ocurre debido al desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y la capacidad del organismo de mantener las ERO en niveles no tóxicos.

El sistema antioxidante de las plantas incluye un conjunto amplio de compuestos de naturaleza proteínica, entre las que se encuentran las enzimas antioxidantes; así como compuestos no proteínicos como la vitamina E, el ácido ascórbico, el á-tocoferol, el glutatión y los pigmentos carotenoides (González *et al.*, 2000). Entre las enzimas más importantes se encuentran la catalasa y las peroxidasas (Arora *et al.*, 2002; ShahinSharif *et al.*, 2008), por la capacidad de transformar el compuesto prooxidante peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno molecular (Pascale *et al.*, 2005).

Las plantas contienen numerosas sustancias con actividad biológica, lo que ha sido motivo de especial atención por sus efectos antivirales y antitumorales (Muanza, 1995), la antimutagenicidad de estos compuestos es una de las temáticas que más se aborda en la

actualidad (Anh 1996). Entre los mecanismos propuestos como responsables de esta actividad se encuentran su posibilidad de captar los radicales libres (Young, 1994), la inhibición de la tasa metabólica de los carcinógenos por las enzimas de fase 1, así como la inducción de enzimas antioxidantes y detoxificadoras (Wilkinson, 1997), (Te C, 1997).

Por la composición química del *Mangifera indica* L. (VIMANG), y los resultados fitoterapéuticos, se piensa que sería interesante el estudio de la actividad antigenotóxica del extracto por el ensayo cometa y el ensayo de micronúcleos en eritrocitos, y su posible relación con la capacidad de modular la glutatión peroxidasa (enzima antioxidante) y las glutatión-S-transferasa (enzima detoxificadora) en el hígado.

Superóxido Dismutasa (SOD)

Estudios independientes sobre las propiedades peculiares oxígeno dependientes de la xantina oxidasa de la leche dieron lugar a la observación de que esta enzima produce O_2^- y H_2O_2 . Teniendo una fuente enzimática de O_2^- , se llegó rápidamente al descubrimiento de la actividad SOD y esta actividad llevó al aislamiento de esta enzima por (McCord and Fridovich, 1969) en eritrocitos bovinos. Una vez que se obtuvo la enzima, eran obvias las similitudes fisicoquímicas entre las diferentes cupreínas.

Como ya se ha indicado, la función de SOD consiste en eliminar al radical superóxido. Este radical no se acumula en medio acuoso ya que fácilmente se dismuta. El radical superóxido es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidroperóxido, cuyo pka es de 4,18.

El radical superóxido puede actuar como un agente reductor, cediendo su electrón extra, o como un agente oxidante, reduciéndose a H_2O_2 . Por ejemplo, reduce al citocromo C y oxida a la adrenalina (Fridovich, 1978).

Por tanto, se puede considerar que el radical superóxido y los productos que derivan de él, como son el radical hidroxilo, el oxígeno singlete excitado, los peróxidos, etc., todos ellos más tóxicos que el radical superóxido, pueden iniciar una cadena de reacciones que pueden conducir a daños celulares tan importantes como el ataque al DNA, membranas lipídicas y otros componentes celulares esenciales. Por consiguiente, aunque el radical superóxido por sí mismo no sea un radical tan tóxico, puede generar otros radicales que si son ciertamente peligrosos (Fridovich, 1., 1978).

Por otra parte, el radical superóxido es un metabolito intermediario muy frecuente en el metabolismo de los organismos aerobios. Las enzimas xantino oxidasa, aldehído oxidasa, dihidroorótico deshidrogenasa, varias flavin deshidrogenasas, triptófano dioxigenasa, dopamina hidroxilasa, p-cumáricohidroxilasa, cistaminaoxigenasa, 2-nitropropano oxigenasa y galactosa oxidasa, entre otras, utilizan y generan el radical superóxido. Numerosos compuestos de importancia biológica, tales como las hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, ferredoxinas reducidas, etc., se oxidan espontáneamente y, al hacerlo, producen radical superóxido. La autooxidación de algunos de los componentes de la cadena de transporte electrónico de la mitocondría también genera radical superóxido.

Catalasa

La reacción de la catalasa es la disminución de dos moléculas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2), función que realizan junto con las peroxidasas

siendo indispensables para la detoxificación de ROS durante el estrés (Garg y Manchanda, 2009) generado por la fotorespiración, oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de purinas (Gill y Tuteja, 2010). Aunque algunas catalasas de bacterias usan manganeso (Mn) como cofactor de la reacción redox, todos los eucariotas conocidos tienen como base el grupo hemo (es decir contienen Fe). Las catalasas están compuestas de polipéptidos que en suma tienen una masa de entre 50 a 70 kDa, estando conformados como tetrámeros, donde cada monómero contiene un grupo hemo (Zamocky *et al.*, 2008).

La función básica de las catalasas es la degradación de la molécula de H_2O_2 en agua y O_2 , lo cual ha sido demostrado mediante estudios de isótopos radioactivos, donde se ha establecido que el O_2 generado mediante la reacción catalítica (dismutación) proviene de una sola molécula de H_2O_2 (Kato *et al.*, 2004) y con el remanente de H_2 y la otra molécula de H_2O_2 se producen las dos moléculas de agua que son formadas en distintos pasos.

Se ha reportado incremento en la actividad de la CAT por diversas condiciones de estrés: osmótico (Herrera-Santoyo *et al.*, 2007), bajas temperaturas (Jiang *et al.*, 2011), paraquat (Shahrtash *et al.*, 2011), salinidad (Bakarat, 2011; Khelifa *et al.*, 2011), sequía (Mafakheri *et al.*, 2010), toxicidad por microelementos (Soto *et al.*, 2011), permitiendo la adaptación de las plantas a determinado factor, sin embargo cambios en el comportamiento de la actividad de CAT se presentan dependiendo de la intensidad del estrés, tal como lo determinaron Esfandiari *et al.* (2007).

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del experimento

La fase de desarrollo del cultivo, aplicación de tratamientos y toma de muestras de la presente investigación se llevó a cabo en el invernadero de Arysta Lifescience, que se localiza en el Bulevar Jesús Valdés Sánchez #2369, en Fraccionamiento Europa, Saltillo, Coahuila. El invernadero cuenta con temperatura controlada y riego programado.

La fase de análisis de actividades enzimáticas y expresión de genes se realizó en los laboratorios del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Diseño experimental

El método estadístico utilizado fue completamente al azar, con siete tratamientos y cuatro repeticiones.

T1 = Producto ALSMX-080 a una dosis de 0.5 ml/L

T2 = Producto ALSMX-080 a una dosis de 1.0 ml/L

T3 = Producto ALSMX-080 a una dosis de 1.5 ml/L

T4 = Control químico ASM a una dosis de 0.05 g/L

T5= Control químico ASM a una dosis de 0.075 g/L

T6= Control químico ASM a una dosis de 0.1 g/L

T7= Testigo absoluto T x a

Aplicación de tratamientos

Se realizaron 4 aplicaciones de tratamientos, iniciando a los 26 días después del trasplante, con intervalos de aplicación de 2 semanas (8, 22 de mayo, 5 y 19 de junio del 2013), que comprende las etapas de floración a fructificación.

Muestreo

Se realizó toma de muestras de plantas tratadas y no tratadas a las 24 horas después de la 2^a, 3^a y 4^a aplicación de tratamientos. Se tomaron muestras de hojas nuevas de tomate (parte superior de planta) una parte se puso en papel aluminio con etiqueta y se sumergió en Nitrógeno líquido, otra parte de la muestra se colocó en los frascos etiquetados, los cuales se sumergieron en Nitrógeno líquido. Una vez en el laboratorio se pasó todo el material al Ultracongelador (-80°C).

Análisis de actividad enzimática relacionada a inducción de resistencia

Extracción de catalasa

La actividad catalasa fue determinada mediante la metodología reportado por Rao *et al.*, 1997 modificado. Se pesó 0.1 g de hoja de tomate y se colocó en tubo en el equipo de Fastprep para romper las células a través del movimiento multidireccional y simultáneo. Las muestras se colocaron en el ultracongelador para que congelara, se le agregó 1mL de buffer de fosfato.

Se pasó al Fastprep con dos tiempos de 60 segundo/ 65M/segundos. Se volvió a colocar en el congelador. Posteriormente se centrifugo 12,000 gravedad por 10 minutos a 1 °C.

Se diluyó la muestra (extracto) 1:20 (20 µl de muestra más 380 µl) de buffer de fosfato.

Las lecturas se realizaron en dos tiempos, tiempo 0 y 1.

En el tiempo cero se tomó los 400 µl de la muestra diluida y se le agregó ácido sulfúrico al 2% (150 µl) más peróxido de hidrógeno al 30% (20 µl).

En el tiempo 1 se tomó los 400 µl de la muestra diluida más peróxido de hidrógeno al 30% (20 µl) después del minuto de haberle agregado peróxido de hidrógeno se le agregó ácido sulfúrico al 2% (150µl).

Se colocaron las muestras a 25°C en el thermomixer R, a 1400 revoluciones por 1 minuto.

Actividad enzimática Superóxido dismutasa

Para medir la actividad superóxido dismutasa se utilizó el Kit comercial de Sigma Aldrich. La preparación del extracto de proteínas se llevó a cabo de la misma manera antes mencionada. Se agregaron 10 µl de cada solución de muestra en los pozos de la microplaca de 96 pozos, además de los blancos, se agregaron 100 µl de la solución WST a cada pozo y se mezcló la microplaca. Se agregaron 10 µl de buffer de dilución al blanco 2 y 3. Posteriormente se agregaron 20 µl de solución de enzima a cada muestra y al blanco 1, la placa se incubó a 37°C por 20 minutos, y se leyó la absorbancia en un lector para microplacas utilizando el filtro de 450 nm. Se calculó la actividad SOD como % de tasa de inhibición del formazan utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad SOD (\% de inhibición)} = \left\{ \frac{[(A \text{ blanco } 1 - A \text{ blanco } 3) - (A \text{ muestra} - A \text{ blanco } 2)]}{(A \text{ blanco } 1 - A \text{ blanco } 3)} \right\} \times 100$$

Determinación de proteínas totales

La concentración de proteínas se determinó según Bradford (1976). El extracto se preparó como se menciona anteriormente. La técnica consistió en agregar 0.1 mL de extracto en un tubo ependorff, y 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).

Actividad enzimática glutatión peroxidasa

Se tomó 0.2 ml de sobrenadante (200 μ l) mas 0.4 ml de GSH (0.1 M) y se agregaron 0.2 ml de KNHPO_4 .

Se colocó en la estufa por 25°C minutos.

Se agregó peróxido de hidrogeno 1.3 mM (0.2 ml).

Se dejó que reaccionara por 10 minutos a temperatura ambiente y se le agregó ATA al 1% (500 μ l).

Se dejó que reposara en agua de hielo por 30 minutos, posteriormente se pasó a centrifugar por 10 minutos a 3000 gravedad a 4°C.

Se tomó 32 μ l de la reacción anterior, se le agrego 147 μ l de Na_2HPO_4 (0.32M), y se le adiciono 21 μ l de DTNB a 1mM.

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó en muestras compuestas, es decir, se hizo una mezcla de tres repeticiones de cada tratamiento.

Método de Trizol

El tejido congelado o liofilizado se maceró con nitrógeno líquido, posteriormente se pesó 100 mg (tejido congelado) ó 20 mg (tejido liofilizado) en un tubo de 2 ml, e inmediatamente se agregó 1 ml de TRI reagent. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se agregó 200 ul de cloroformo y se agitó vigorosamente hasta que tenga un aspecto lechoso, la mezcla se incubo 15 min a temperatura ambiente.

La mezcla se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C.

Se recuperó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ARN con 1 ml de etanol al 70%colocófrío agitando haciendo inversiones en el tubo. Se centrifugó a 7,500 g por 5 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla aprox. 15 min a temperatura ambiente (si a los 15 min hay gotitas de etanol, removerlas con papel). La pastilla de ARN se re suspendió con 50 ul de agua DEPC.

Nota. Si no se disuelve la pastilla calentar el tubo a 60°C por 10-15 min.

Se distribuyó la solución de ARN en 3 tubos (alícuotas) de 0.6 ml (15 ul, 15 ul, 20 ul).

El ARN se almacenó a -80°C (si es a temperatura menor se DEGRADA).

Cuantificación de ARN

Para cuantificar el ARN se utilizó el espectrofotómetro en el método de ARN, se midió el blanco (agua milli Q) y posteriormente las muestras, para medir la muestra se agregó 2 ul

de muestra y 198 ul de agua milli Q, se tomó los datos de Absorbancia 260, Absorbancia 280, y el valor R.

Se hace una tabla como la siguiente:

Tabla 1: Descripción del procesamiento de valores para la cuantificación del ARN.

Muestra	A 260	A 280	R	Ug/ml	Ug totales (50 ul)
Código de la muestra			=A260/A280	=(A260)(100)(50)	=(Ug/ml)(0.05)

Calidad del ARN

Para medir la calidad del ARN se realizó mediante una electroforesis desnaturalizante.

Se necesita tener los valores de cuantificación del ARN para realizar los cálculos de las muestras.

Se preparó un gel de agarosa al 1.3% de la siguiente manera: Se pesó 0.52 g de agarosa y se le agregó a un vaso de precipitado con 25 ml de agua DEPC, una vez que se disolvió la agarosa (mezcla transparente), se agregó 8 ml de MOPS y 7 ml de formaldehído, e inmediatamente se agregó la mezcla en el porta gel junto con el peine (cuidando que no queden burbujas).

Se dejó solidificar (30 minutos).

En tubos de 0.6 ml se prepararon las muestras (como en la tabla de abajo):

Tabla 2: Descripción de los cálculos para la muestra ARN en electroforesis desnaturalizante (Calidad de ARN).

Muestra	Ul de muestra (2 ug)	Ul de agua DEPC	Ul de buffer loading (buffer de carga)
	No debe de pasar de 5 ul	Utilizar en caso que se requiera aforar la muestra a 5 ul	Siempre son 5 ul
	En total 5 ul		

Ya que se tenga en cada tubo la muestra, el agua u el buffer loading se incuban a 60°C por 10 min, inmediatamente después se pasan a 4°C para enfriarse.

Una vez que el gel está solidificado, se sumerge en la cámara de electroforesis para ARN y se agrega solución MOPS 1X a la cámara hasta la marca, posteriormente se quita con cuidado el peine hacia arriba.

Se van cargando cada una de las muestras en los pozos (todo el contenido del tubo), cuidando que no se derramen, al final se anota el orden de cómo se acomodaron las muestras en el gel.

La cámara se conecta a la fuente de poder, y se dejó correr a 70 volts por 1 hora 20 minutos.

Se sacó el gel de la cámara con cuidado y se colocó en el transiluminador para ver las bandas. Se tomó la foto y se guardó en la computadora del transiluminador y en una memoria USB.

Síntesis de c-ADN

Primera reacción

Se utilizaron 2 ug de ARN para la reacción, se aforo a 5 ul con agua DEPC, se agregó un control negativo solamente con 4 ul de agua DEPC y 1 ul de Random primer.

Los tubos se calentaron a 70°C por 5 minutos en una termoplaca, inmediatamente se pasó a 4°C por 5 minutos.

Se centrifugaron por 10 segundos en microfuga.

Segunda reacción

Se realizó la siguiente mezcla en un tubo de 2 ml (cantidades para 1 muestra, si son 20 muestras multiplica las cantidades por 21, es decir se agrega 1 muestra más para que no falten reactivos:

Agua libre de nucleasas	5.5 ul
Buffer de reacción 5X	4 ul
MgCl ₂	3 ul
DNTP mix	1 ul
Inhibidor de ribonucleasa	0.5 ul
<u>Transcriptasa reversa</u>	<u>1 ul</u>
TOTAL	15 ul

Se tomaron 15 ul de la mezcla y se agregaron al tubo de la primera reacción.

Los tubos se colocaron en el Termociclador en las siguientes condiciones:

25°C por 5 min
42°C por 60 min
70°C por 15 min
4°C HOLD (tiempo de espera)

Una vez terminado el tiempo se guardan los tubos a -20 °C (congelador).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez que se sintetizó el cADN se llevó a cabo la PCR con cada par de primers para un gen específico, en total se probaron 9 par de primers correspondientes a los 9 genes a analizar (3 de cada fitohormona), además de incluir un gen endógeno.

Se realizó el coctel colocando en un tubo de 0.6 ml los siguientes reactivos:

<i>Reactivos</i>	<i>Cantidad (para 1 muestra)</i>
Agua destilada desionizada estéril	18 μ l
Buffer para PCR 10x	2.5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
dNTPS (25 mM)	0.2 μ l
Iniciador 5'-3' (15 pM)	0.83 μ l
Iniciador 3'-5' (15 pM)	2.0 μ l
Enzima Taq-Polimerasa (5 U/ml)	0.2 μ l
TOTAL	24 μ l

Se mezclaron los reactivos con la micropipeta, el tubo se depositó en un recipiente con hielo, posteriormente se depositaron 24 μ l del coctel en un tubo de 0.2 μ l, luego se adicionó 1 μ l del cADN de la muestra y se mezclaron con la micropipeta. Los tubos se introdujeron al Termociclador marca Labnet donde las condiciones de PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos de la TM del iniciador, 1 minuto a 72°C) y 10 minutos a 72°C. Una vez terminado el tiempo de corrida las muestras se guardaron a -20°C en el congelador.

Las secuencias de los iniciadores utilizados para identificar la expresión de los genes se realizaron con las secuencias del ARNm de los genes antes mencionados específicamente para *Solanum lycopersicum*, para el diseño de los iniciadores se utilizó el Software Primer designingtool (NCBI), donde se obtuvo la secuencia de los iniciadores, el tamaño del

amplificado y la temperatura de anillamiento (T_m). Se preparó una solución madre de cada iniciador de 100 pmol/ μ l y de esta se preparó una solución de trabajo de 15 pmol/ μ l.

En la siguiente tabla se presentan las secuencias de los iniciadores:

Tabla 3: Descripción de los iniciadores utilizados en este estudio.

GEN	DESCRIPCIÓN	INICIADOR FORWARE	INICIADOR REVERSE	TM (°C) PCR	PRODUCTO (pb)
SAR	Resistencia sistémica adquirida (Ácido salicílico)	AGGCTAGCGGCCTTTGC	GAGCTGGGGGAAAGCGG	60	111
SIR	Resistencia sistémica inducida (Ácido jasmónico)	ACCATATGGCCTCAGCAAGAAA	TAGGTCTCCTTACCGGCTAACA	60	105
AT	Tolerancia abiótica (DREB3)	ACAGACTGCCCATCATGCTT	TAGGCAAACGGATCTCAGCG	60	152
G3P	Gen endógeno	GGAGTCGACCGGTGTTTCA	GGGAGCAAGGCAATTTGTGG	60	190

La temperatura óptima de anillamiento (TM) de los iniciadores, se determinó por medio del contenido de ácidos nucleicos, el cual determinó el fabricante de los iniciadores (Macrogen, Corea).

Una vez obtenido el producto de la PCR, se realizó una electroforesis horizontal para verificar la presencia del amplificado de cada gen (banda), y comprobar con un marcador molecular las pares de bases de cada banda.

Electroforesis horizontal de agarosa al 3%

En un vaso de precipitado se disolvieron 4.5 g de agarosa en 150 ml de buffer TAE 1x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M), mediante una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura

de 45°C. La solución se vertió en un porta gel al cual se le agregó un peine, se evitó dejar burbujas en el gel. Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de parafilm se colocó una gota (1 ul) de buffer de carga (50% de glicerol, 1 mM EDTA, 0.2% azul de bromofenol y 60 ug/mL de red gel), se colocó 5 ul del ADN de una muestra (4 ul de marcador molecular 100 pb marca Axygen) y se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TAE 1x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90 volts por 45 minutos. En el Transiluminador de luz UV, se visualizó la banda correspondiente a cada gen.

Análisis semi-cuantitativo

Para realizar el análisis semi-cuantitativo de expresión de genes, se realizó mediante el análisis por Densitometría de imagen utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) Con este análisis se obtuvieron los datos numéricos de la expresión de los genes objeto, además se pudo llevar a cabo un análisis estadístico (ANOVA) y una comparación de medias (Tuckey) para determinar diferencias significativas de expresión de genes entre tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad enzimática

Actividad catalasa específica

A continuación se describen los resultados obtenidos en cuanto a la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo antioxidante de plantas.

En la **Figura 1** se muestra la actividad específica de la enzima catalasa en tejido de hojas de tomate, en el primer muestreo, donde no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos, dicha enzima es capaz de alterar el peróxido de hidrogeno y lo separa en oxígeno y agua. En el primer muestreo la mayor concentración de la actividad catalasa se expresa en las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.0 ml/L, teniendo un incremento en la actividad del 69.42% (153.5mM de H₂O₂/mg de proteína), seguido de las plantas tratadas con ASM a una dosis de 0.05 g/L, teniendo un incremento del 47.24% (133.4 mM de H₂O₂/mg de proteína), las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.5 ml/L, teniendo un incremento del 17% (106.5 mM de H₂O₂/mg de proteína), y las plantas tratadas con ASM a una dosis de 0.075 g/L, teniendo un incremento del 1.10% (mM de H₂O₂/mg de proteína) en comparación con el Testigo Absoluto(90.6mM).

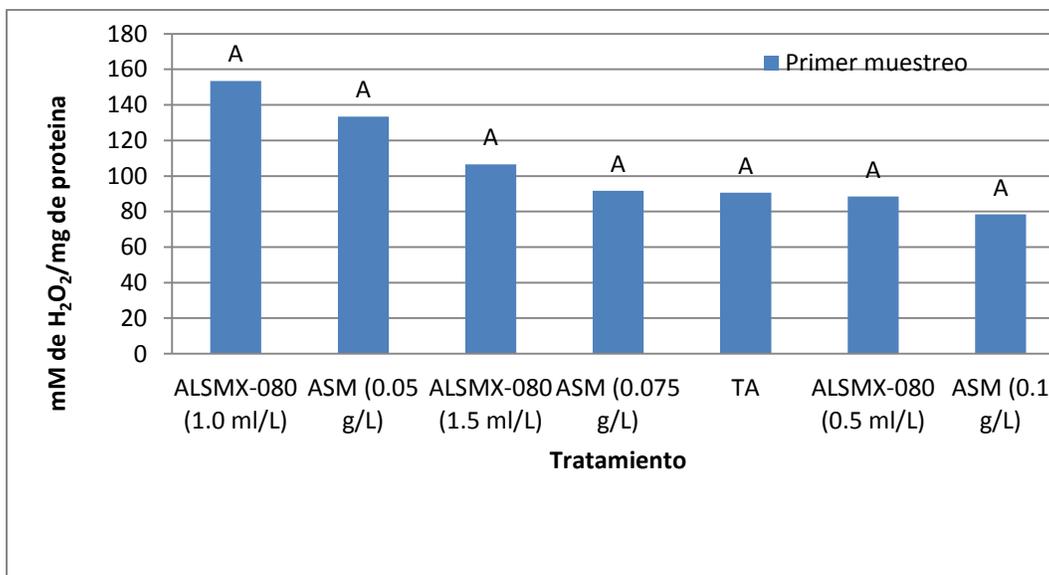


Figura 1: Actividad catalasa específica de plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 Y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración). Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellos (prueba de medias por Tukey $\alpha \leq 0.05$, Minitab 16).

La actividad catalasa específica en el segundo muestreo (**Figura 2**) no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí se presentaron tendencias de aumento en comparación con el testigo absoluto; la mayor actividad específica de catalasa se expresó en las plantas tratadas con ASM a una dosis de 0.1 g/L, teniendo un incremento del 64.66% (135.40mM de H₂O₂/mg de proteína), seguido de las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 0.5 ml/L, teniendo un incremento del 23.03% (101.17mM de H₂O₂/mg de proteína), las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.5 ml/L, teniendo un incremento del 1.90% (83.80 mM de H₂O₂/mg de proteína) en comparación con el Testigo Absoluto (82.23mM).

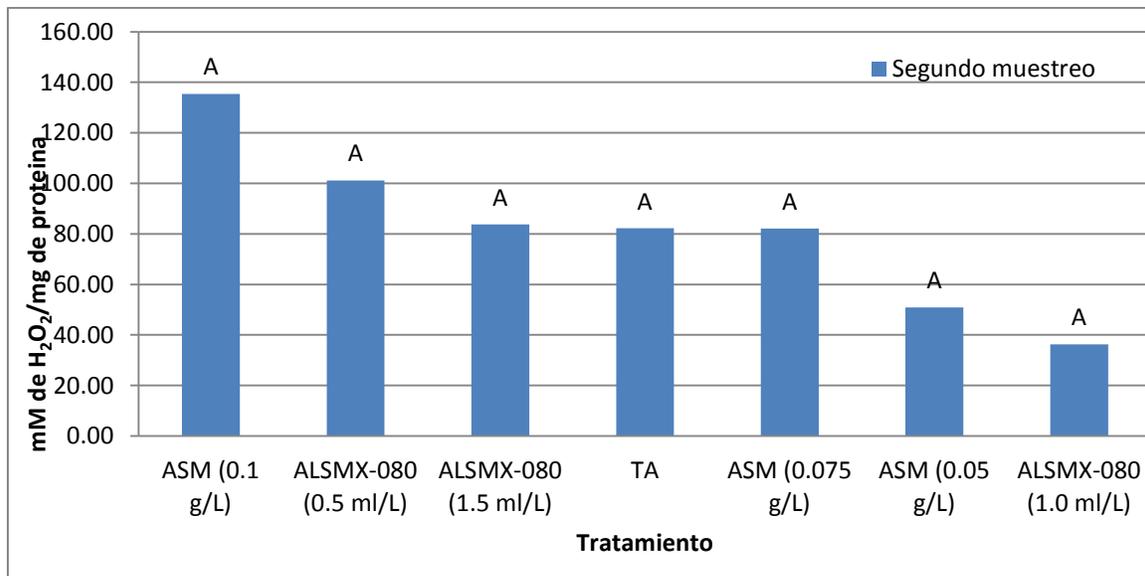


Figura 2: Actividad catalasa específica de plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 Y ASM a diferentes dosis (segundo muestreo a 54 ddt en etapa de inicio de floración).

Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellos (prueba de medias por Tukey $\alpha \leq 0.05$, Minitab 16).

La actividad catalasa específica en el tercer muestreo (**Figura 3**) si presenta diferencias significativas entre tratamientos, donde las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 0.5 ml/L, presenta un incremento de 1,508% (1973.4mM de H₂O₂/mg de proteína), en comparación con el Testigo Absoluto (122.7mM).

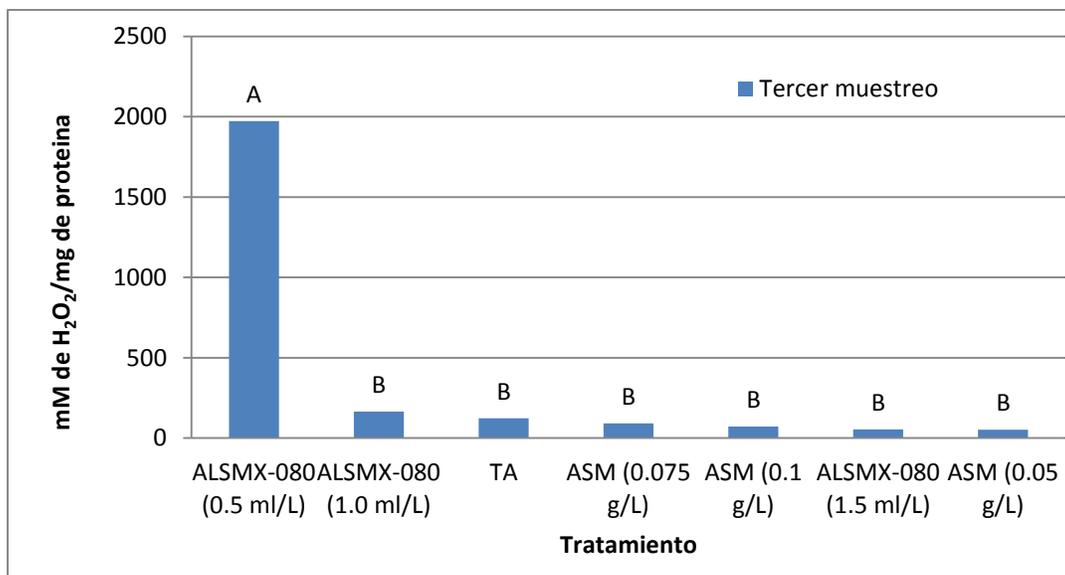


Figura 3: Actividad catalasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 y ASM a diferentes dosis (tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos).

Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellos (prueba de medias por Tukey $\alpha \leq 0.05$, Minitab 16).

Actividad superóxido dismutasa

En la **Figura 4** se muestra la actividad específica de la enzima de superóxido dismutasa en tejidos de hojas de tomate durante el primer muestreo, dicha enzima es capaz de atacar los radicales libres y prevenir enfermedades. En el primer muestreo se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, donde las plantas tratadas con ASM a una dosis de 0.05 g/L, presenta un incremento de 175% (30.144 % de inhibición de formazan/mg de proteína), seguido de las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 0.5 ml/L, tiene un incremento de 106% (22.571 % de inhibición de formazan/mg de proteína), las plantas tratadas con ASM a una dosis de 0.1 g/L, tiene un incremento de 101% (22.091 % de inhibición de formazan/mg de proteína), las plantas tratadas con ASM a una dosis de 0.075

g/L, tiene un incremento del 99.80% (21.889 % de inhibición de formazan/mg de proteína), las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.5 ml/L, tiene un incremento del 93.24% (21.17 % de inhibición de formazan/mg de proteína) y plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.0 ml/L, tiene un incremento del 71.98% (18.841 % de inhibición de formazan/mg de proteína) en comparación con el testigo absoluto (10.955 % de inhibición de formazan/mg).

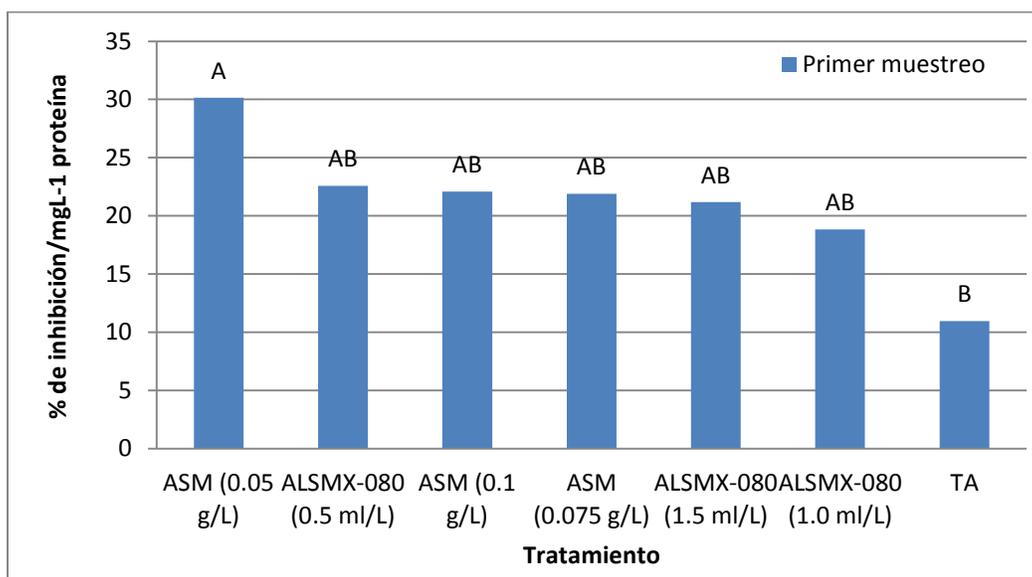


Figura 4: Actividad superóxido dismutasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración). Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellos (prueba de medias por Tukey $\alpha \leq 0.05$, Minitab 16).

La actividad específica superóxido dismutasa en el segundo muestreo (**Figura 5**) no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, la mayor actividad específica de superóxido dismutasa se expresó en el testigo absoluto (36.823 % de inhibición de formazan/mg).

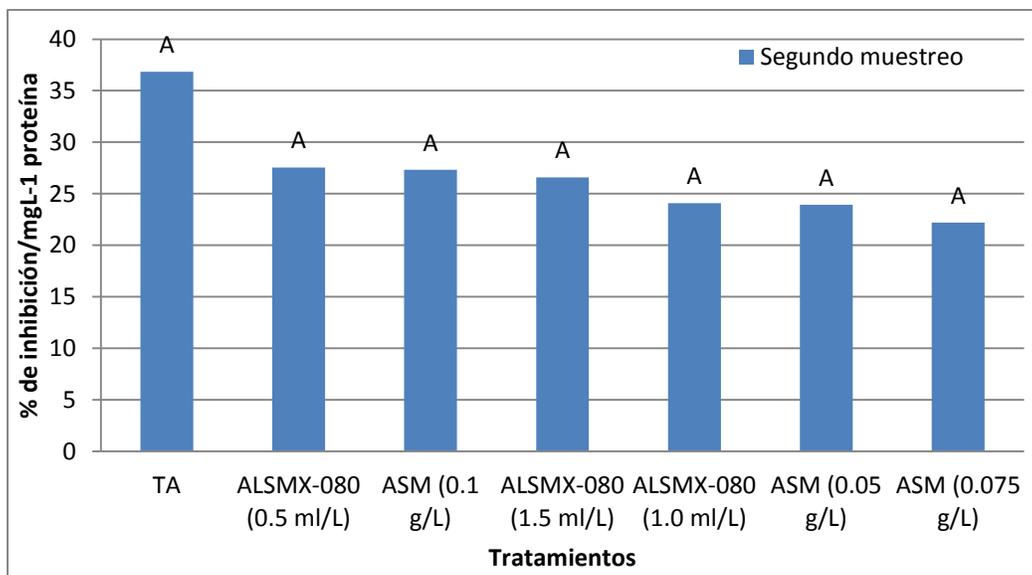


Figura 5: Actividad superóxido dismutasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 y ASM a diferentes dosis (segundo muestreo a 54 ddt en etapa de inicio de fructificación). Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellos (prueba de medias por Tukey $\alpha \leq 0.05$, Minitab 16).

La actividad superóxido dismutasa en el tercer muestreo (**Figura 6**) no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos pero si se presentaron tendencias de aumento en comparación con el testigo absoluto; la mayor actividad específica de superóxido dismutasa se expresó en las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 0.5 ml/L, tiene un incremento del 10.16% (35.017 % de inhibición de formazan/mg de proteína), seguido de las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.0 ml/L, tiene un incremento del 2.70% (32.647 % de inhibición de formazan/mg de proteína), en comparación con el testigo absoluto (31.787 % de inhibición/mg).

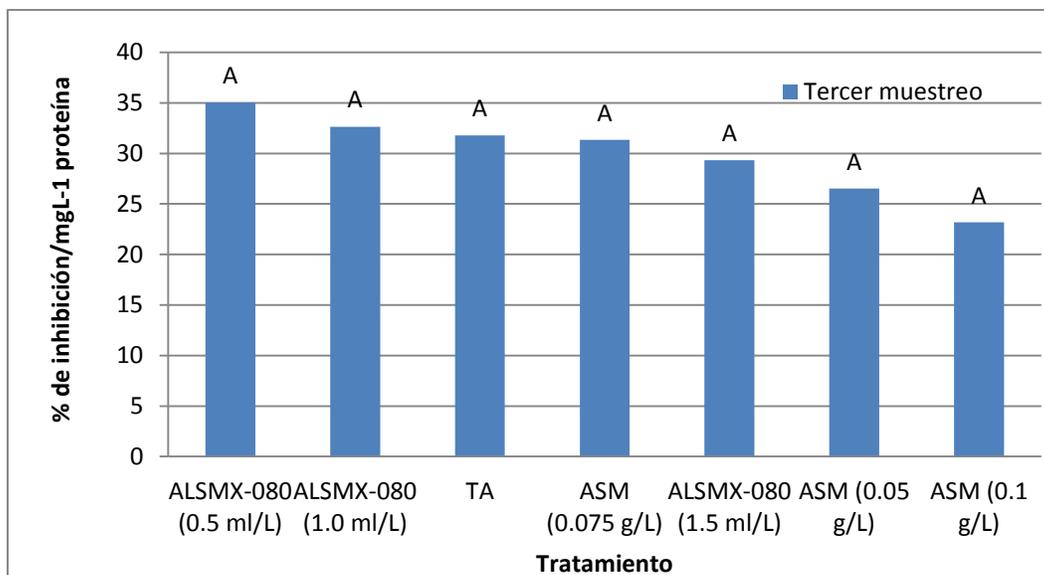


Figura 6: Actividad superóxido dismutasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 y ASM a diferentes dosis (tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos). Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellos (prueba de medias por Tukey $\alpha \leq 0.05$, Minitab 16).

Actividad glutatión peroxidasa

En la **Figura 7** se muestra la actividad específica de la enzima glutatión peroxidasa en tejido de hojas de tomate en el primer muestreo, dicha enzima es capaz de reducir el estrés oxidativo y agentes tóxicos. En el primer muestreo se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, donde las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 0.5 ml/L, presenta un incremento de 138% (393.75mU/ml de proteína), seguido de las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.0 ml/L, tiene un incremento del 91.51% (316.07mU/ml de proteína), las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.5 ml/L, tiene un incremento del 48.99% (245.9mU/ml de proteína), las plantas tratadas con ASM a

una dosis de 0.075 g/L, con un incremento del 23.55% (203.92 mU/ml de proteína) en comparación con el testigo absoluto (165.04mU/ml).

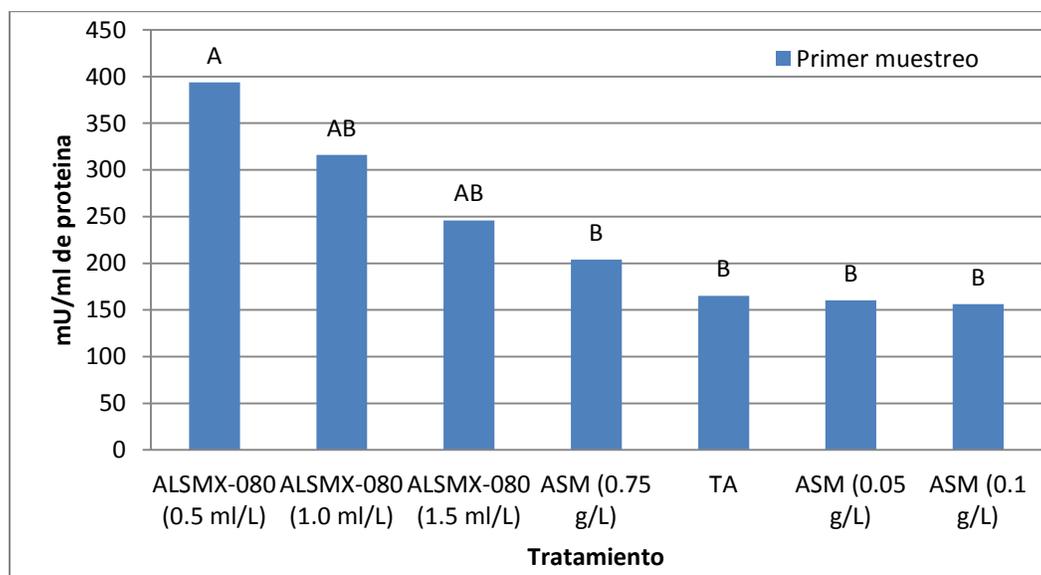


Figura 7: Actividad glutatión peroxidasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración). Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellos (prueba de medias por Tukey $\alpha \leq 0.05$, Minitab 16).

La actividad glutatión peroxidasa en el segundo muestreo (**Figura 8**) no presenta diferencias significativas entre tratamientos pero si se presentan tendencias de aumento en comparación con el testigo absoluto; la mayor actividad específica de glutatión peroxidasa se expresó en las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 0.5 ml/L, con un incremento del 89.56% (819.1mU/ml de proteína), seguido de las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.5 ml/L, con un incremento del 75.83% (759.8mU/ml de proteína), las plantas tratadas con ALSMX-080a una dosis de 1.0 ml/L tienen un incremento del 23.88% (535.5mU/ml de proteína), en comparación con el testigo absoluto con una cantidad de (432.1mU/ml).

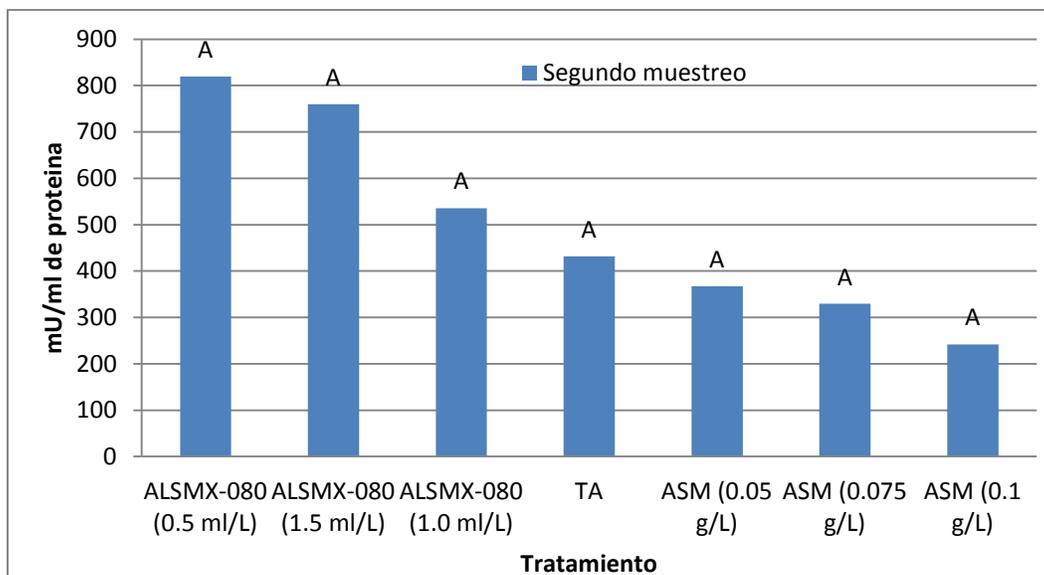


Figura 8: Actividad glutatión peroxidasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 y ASM a diferentes dosis (segundo muestreo a 54 ddt en etapa de inicio de fructificación). Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellos (prueba de medias por Tukey $\alpha \leq 0.05$, Minitab 16).

La actividad glutatión peroxidasa en el tercer muestreo (**Figura 9**) presentó diferencias significativas entre tratamientos, donde las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 0.5 ml/L presentaron un incremento de 322.8% (830.4mU/ml de proteína), en comparación con el testigo absoluto (267.9mU/ml).

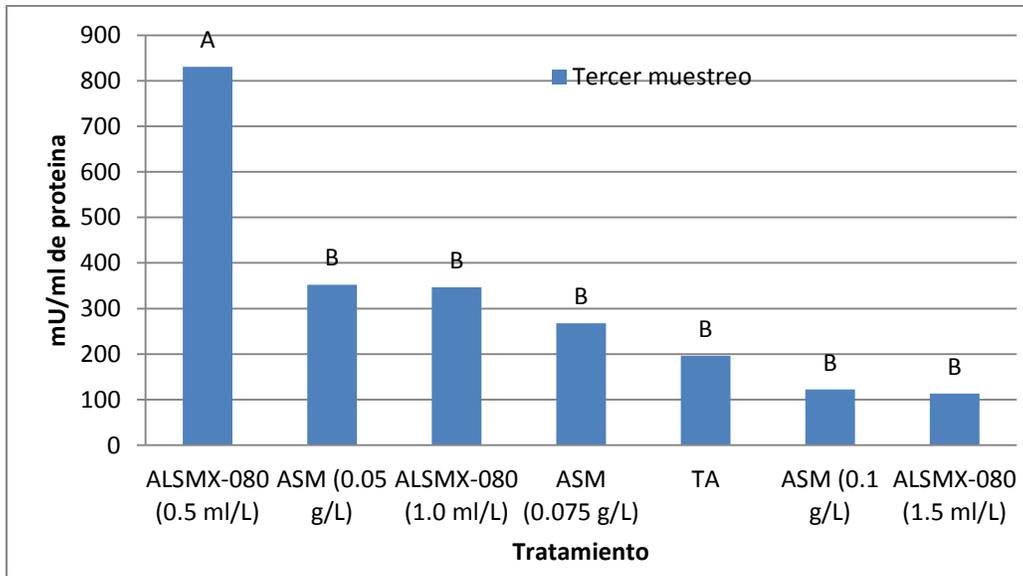


Figura 9: Actividad glutatión peroxidasa específica de las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos). Los valores con literales iguales, no tienen diferencia significativa entre ellos (prueba de medias por Tukey $\alpha \leq 0.05$, Minitab 16).

Expresión cualitativa de genes

En la **Tabla 4** se muestran los resultados de la cuantificación de las 21 muestras compuestas de hojas de tomate de los 7 tratamientos en los tres diferentes muestreos. Donde se puede observar que hay una buena cuantificación de ARN en ambas muestras; para determinar si tiene una buena cuantificación el ARN, debe tener al menos 10 μg totales y una R mínima de 1.4, entre más alta sea la R, mayor pureza tiene el ARN.

Tabla 4: Valores obtenidos en la cuantificación de ARN por espectrofotometría.

Muestra	A260	A280	R	µg/mL	µg Totales
ALSMX-080 (0.5 ml/L) 1er muestreo	0.674	0.383	1.760	33370	168.1
ALSMX-080 (1 ml/L) 1er muestreo	0.811	0.447	1.814	4055	202.75
ALSMX-080 (1.5 ml/L) 1er muestreo	0.365	0.119	1.834	1825	91.25
ASM 0.05 g/L 1er muestreo	0.525	0.293	1.792	2625	131.25
ASM 0.075 g/L 1er muestreo	0.421	0.221	1.814	2005	100.25
ASM 0.1 g/L 1er muestreo	0.955	0.536	1.782	4775	238.75
Testigo absoluto	0.287	0.164	1.750	1435	71.75
ALSMX-080 (0.5 ml/L) 2do muestreo	0.169	0.092	1.837	845	42.25
ALSMX-080 (1 ml/L) 2do muestreo	0.165	0.103	1.602	825	41.25
ALSMX-080 (1.5 ml/L) 2do muestreo	0.299	0.172	1.738	1495	74.75
ASM 0.05 g/L 2do muestreo	0.502	0.284	1.768	2510	125.5
ASM 0.075 g/L 2do muestreo	0.305	0.172	1.773	1525	76.25
ASM 0.1 g/L 2do muestreo	0.248	0.135	1.837	1240	62
Testigo absoluto	0.112	0.059	1.898	560	68
ALSMX-080 (0.5 ml/L) 3er muestreo	0.128	0.071	1.803	640	32
ALSMX-080 (1 ml/L) 3er muestreo	0.290	0.150	1.933	1450	72.5
ALSMX-080 (1.5 ml/L) 3er muestreo	0.208	0.120	1.733	1040	52
ASM 0.05 g/L 3er muestreo	0.193	0.119	1.622	965	48.25
ASM 0.075 g/L 3er muestreo	0.139	0.072	1.931	695	34.75
ASM 0.1 g/L 3er muestreo	0.307	0.161	1.907	1,535	76.75
Testigo absoluto	0.348	0.208	1.673	1,740	87

A continuación se muestra la imagen de gel de agarosa de una electroforesis desnaturalizante (**Figuras 10**), los cuales se utilizaron para ver la calidad del ARN por medio de las bandas. En un ARN de buena calidad deben visualizarse 2 bandas intensas que corresponden a la subunidad mayor del ARN ribosomal (28S) y a la subunidad menor

(18S), debajo de estas bandas se verán varias bandas tenues que corresponden al ARN mensajero, al ARN de transferencia así como micro ARN.

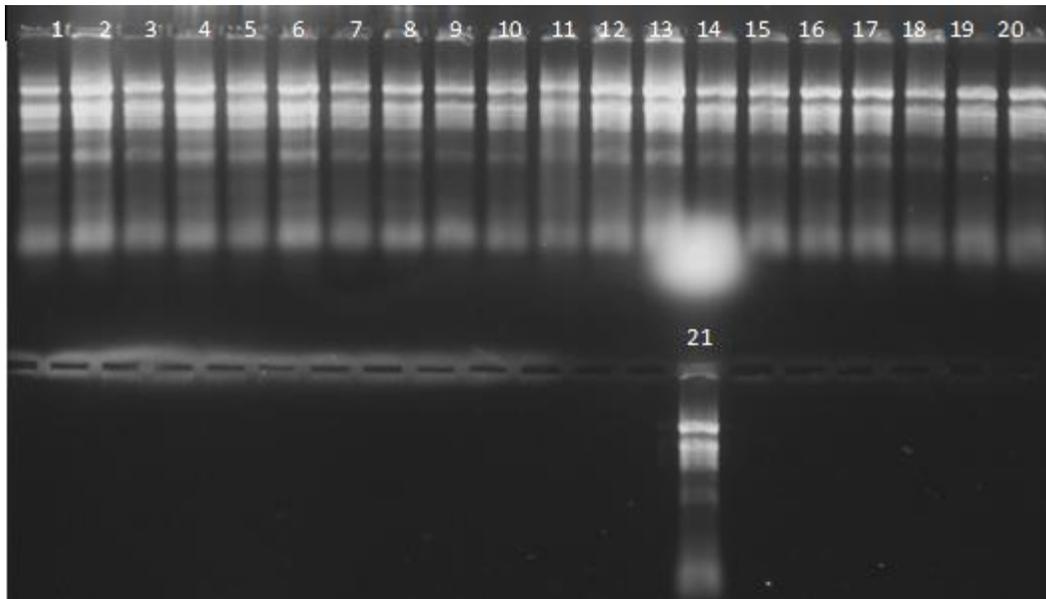


Figura 10: Electroforesis desnaturalizante con gel de agarosa al 1.3%. Primer muestro, Carril 1: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 2: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 3: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 4: ASM (0.05 g/L), carril 5: ASM (0.075 g/L), carril 6: ASM (0.1 /L), carril 7: Testigo absoluto (H₂O), segundo muestreo, carril 8: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 9: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 10: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 11: ASM (0.05 g/L), carril 12: ASM (0.075 g/L), carril 13: ASM (0.1 g/L), carril 14: Testigo absoluto (H₂O), tercer muestreo, carril 15: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 16: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 17: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 18: ASM (0.05 g/L), carril 19: ASM (0.75 g/L), carril 20: ASM (0.1 g/L), carril 21: Testigo absoluto (H₂O).

Una vez verificada la cantidad y calidad del ARN, se realizó la síntesis del c-ADN, y posteriormente se realizó la PCR punto final para cada uno de los genes de estudio (SAR, SIR y AT), y para el gen endógeno (G3F).

En la **Figura 11** se muestra la imagen del gel de electroforesis de la amplificación del gen SAR a 111 pb. La expresión del gen SAR, está implicado en la transcripción de la proteína PR1, que es inducida en respuesta a una variedad de patógenos. Se trata de un marcador molecular útil para la respuesta de resistencia sistémica adquirida en plantas. La expresión de este gen es sensible a ácido salicílico.

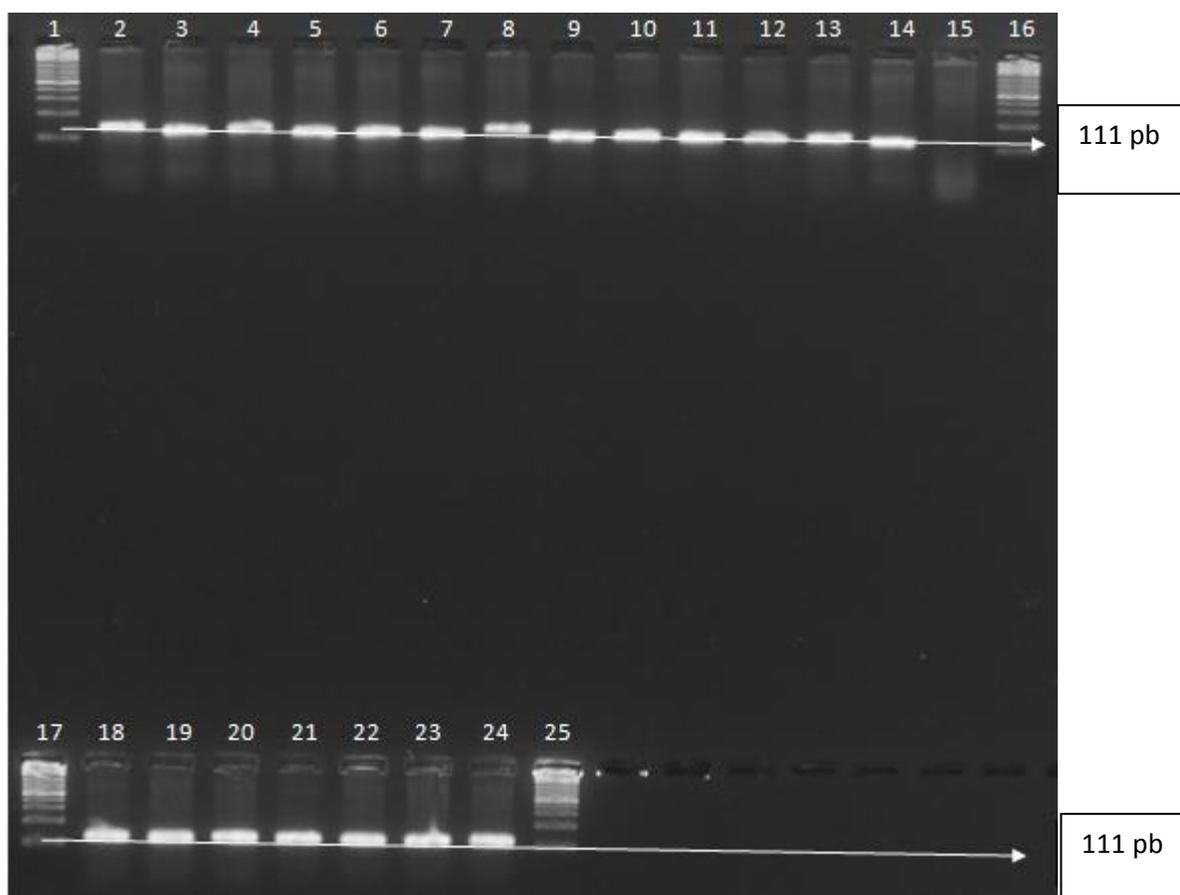


Figura 11: Amplificación del gen SAR por PCR de las muestras obtenidas en los tres muestreos a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles 1, 16, 17 y 25: Marcador molecular 100pb, primer muestro, carril 2: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 3: ALSMX-080 (1.0 ml/L), carril 4: ALSMX-080 (1.5 ML/l), carril 5: ASM (0.05 g/L), carril 6: ASM (0.075 g/L), carril 7: ASM (0.1 g/L), carril 8: Testigo absoluto (H₂O), segundo

muestreo, carril 9: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 10: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 11: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 12: ASM (0.05 g/L), carril 13; ASM (0.075 g/L), carril 14: ASM (0.1 g/L), carril 15: Testigo absoluto (H₂O), tercer muestreo, carril 18: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 19: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 20: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 21: ASM (0.05 g/L), carril 22: ASM (0.075 g/L), carril 23: ASM (0.1 g/L), carril 24: Testigo Absoluto (H₂O).

En la **Figura 12** Se muestra la imagen del gel de electroforesis de la amplificación del gen SIR a 105 pb. El gen SIR codifica para una proteína nuclear localizada (JAZ1) implicada en la señalización vía jasmonato. Los niveles de transcripción JAZ1 se elevan en respuesta a un estímulo de jasmonato. Los jasmonatos (JAS) comprenden una familia de hormonas vegetales que regulan varios procesos de desarrollo y median en las respuestas a varios tipos de estrés abiótico y biótico, incluyendo patógenos (Demianski *et al.*, 2012).

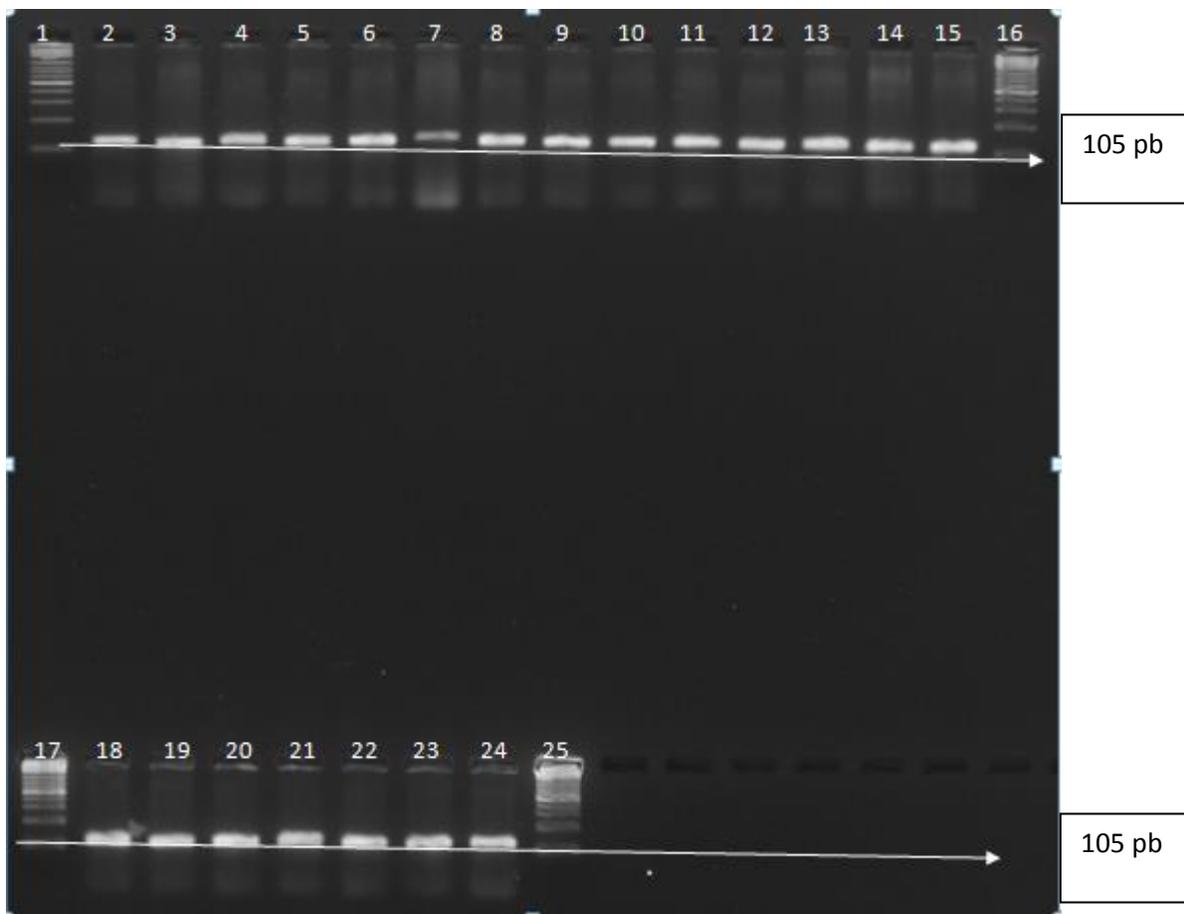


Figura 12: Amplificación del gen SIR por PCR de las muestras obtenidas en los tres muestreos a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles 1, 16, 17 y 25: Marcador molecular 100pb; primer muestreo, carril 2: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 3: ALSMX-080 (1.0 ml/L), carril 4: ALSMX-080 (1.5 ML/l), carril 5: ASM (0.05 g/L), carril 6: ASM (0.075 g/L), carril 7: ASM (0.1 g/L), carril 8: Testigo absoluto (H₂O), segundo muestreo, carril 9: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 10: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 11: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 12: ASM (0.05 g/L), carril 13; ASM (0.075 g/L), carril 14: ASM (0.1 g/L), carril 15: Testigo absoluto (H₂O), tercer muestreo, carril 18: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 19: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 20: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 21: ASM (0.05 g/L), carril 22: ASM (0.075 g/L), carril 23: ASM (0.1 g/L), carril 24: Testigo Absoluto (H₂O).

En la **Figura 13** se muestra la imagen del gel de electroforesis de la amplificación del gen AT a 152 pb. El gen AT codifica para un miembro de las proteínas quinasas relacionadas con SNF1 (SnRK2) cuya expresión está activada por estrés osmótico iónico (sal) y no iónico (manitol).

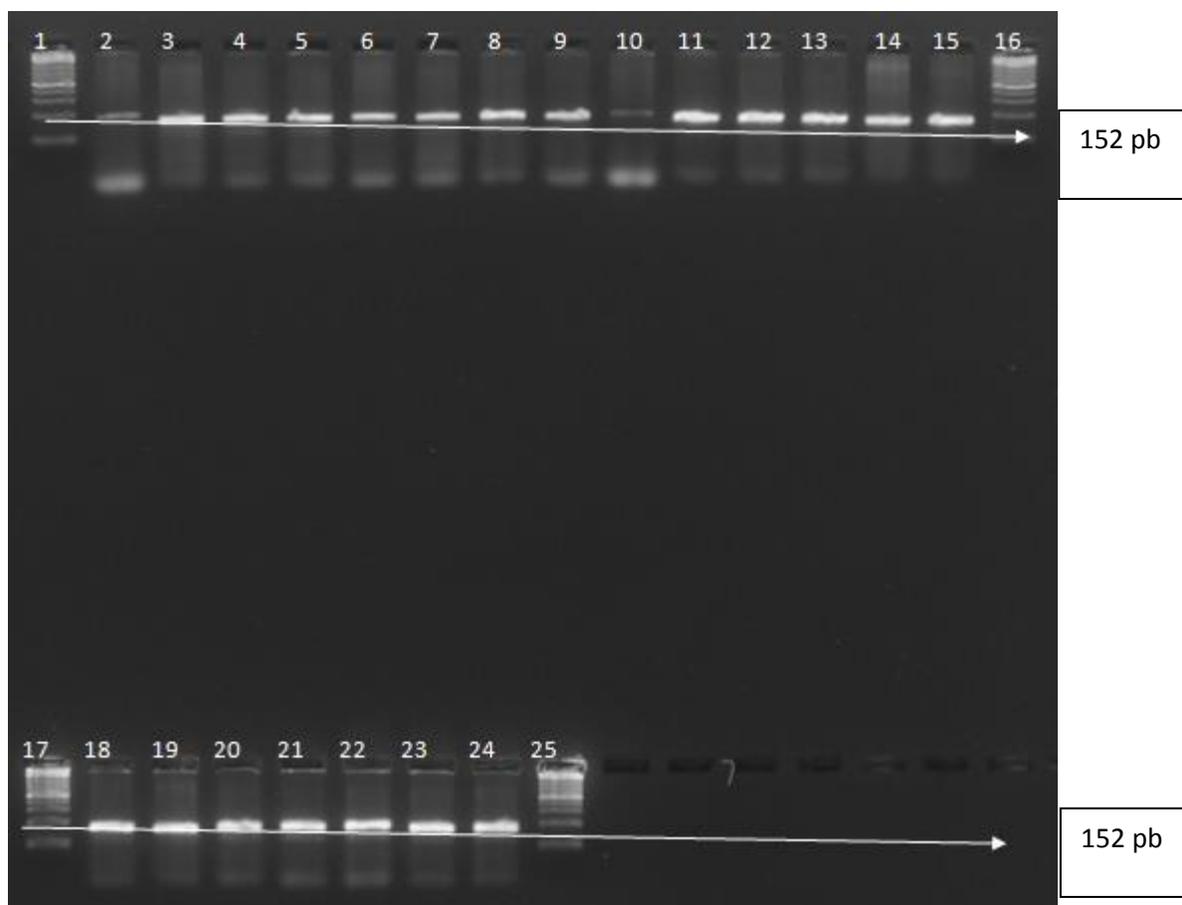


Figura 13: Amplificación del gen AT por PCR de las muestras obtenidas en los tres muestreos a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles 1, 16, 17 y 25: Marcador molecular 100pb; primer muestreo, carril 2: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 3: ALSMX-080 (1.0 ml/L), carril 4: ALSMX-080 (1.5 ML/l), carril 5: ASM (0.05 g/L), carril 6: ASM (0.075 g/L), carril 7: ASM (0.1 g/L), carril 8: Testigo absoluto (H₂O), segundo muestreo, carril 9: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 10: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 11:

ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 12: ASM (0.05 g/L), carril 13; ASM (0.075 g/L), carril 14: ASM (0.1 g/L), carril 15: Testigo absoluto (H₂O), tercer muestreo, carril 18: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 19: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 20: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 21: ASM (0.05 g/L), carril 22: ASM (0.075 g/L), carril 23: ASM (0.1 g/L), carril 24: Testigo Absoluto (H₂O).

Como control interno de la RT-PCR se utilizó el gen endógeno Gliceraldehído 3 fosfato (G3f) específico para *Solanum lycopersicum*, este gen se utiliza como control interno, ya que su expresión no debe variar, o presentar un mínimo de variación aunque haya un cambio en la fisiología de la planta derivado de cambios en el ambiente o estimulados por otro medio. En RT-PCR con la amplificación de éste gen endógeno comprobamos que no hubo un mal ajuste de la concentración de ARN para la síntesis de cADN, ya que si no hay un buen ajuste de la concentración de ARN por consecuencia se tendría una expresión diferencial entre tratamiento provocado por este error en la cuantificación. El gen G3f está implicado en la vía de la glucólisis, la gliceraldehído 3 fosfato es una enzima implicada en una de las reacciones más importantes de la glucólisis ruta de Embden-Meyerhof, puesto que cataliza un paso en el cual se genera el primer intermediario de elevada energía, y, además, genera un par de equivalentes de reducción (en forma de NADH).

Este gen amplificó a 190 pb con una temperatura de anillamiento de 60°C.

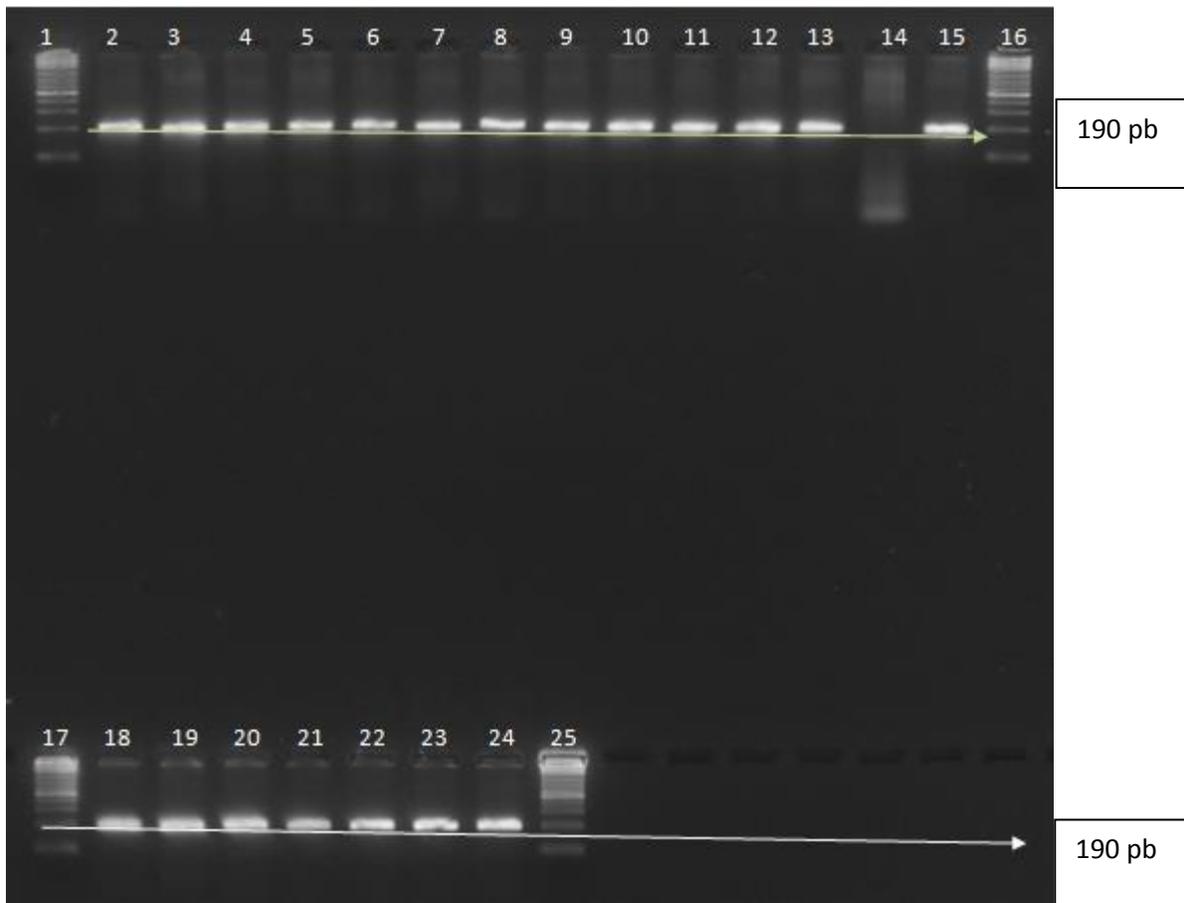


Figura 14: Amplificación del gen endógeno G3F por PCR de las muestras obtenidas en los tres muestreos a una temperatura de anillamiento de 60°C. Carriles 1, 16, 17 y 25: Marcador molecular 100pb; primer muestreo, carril 2: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 3: ALSMX-080 (1.0 ml/L), carril 4: ALSMX-080 (1.5 ML/l), carril 5: ASM (0.05 g/L), carril 6: ASM (0.075 g/L), carril 7: ASM (0.1 g/L), carril 8: Testigo absoluto (H₂O), segundo muestreo, carril 9: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 10: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 11: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 12: ASM (0.05 g/L), carril 13; ASM (0.075 g/L), carril 14: ASM (0.1 g/L), carril 15: Testigo absoluto (H₂O), tercer muestreo, carril 18: ALSMX-080 (0.5 ml/L), carril 19: ALSMX-080 (1 ml/L), carril 20: ALSMX-080 (1.5 ml/L), carril 21: ASM (0.05 g/L), carril 22: ASM (0.075 g/L), carril 23: ASM (0.1 g/L), carril 24: Testigo Absoluto (H₂O).

Expresión semi-cuantitativa de genes

En la **Figura 15** se muestran los resultados de la expresión semi-cuantitativa del gen SAR, en las plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 y ASM en tres muestreos diferentes, donde se observa que el gen se expresó arriba de 25 veces más en las muestras de plantas tomadas a los 54 días después del trasplante en comparación con la expresión observada en las muestras tomadas a 40 y 68 días después del trasplante, lo cual concuerda con lo reportado con Herman *et al*, 2007 que encontró diferencias en expresión de genes relacionados a resistencia a enfermedades dependiendo del número de aplicaciones de ASM . Esta sobreexpresión fue inducida en distinta medida por la aplicación de todos los tratamientos, siendo el tratamiento ALSMX-080 a una dosis de 1.5ml/L el que indujo el mayor incremento de 75.44 veces, seguido de las plantas tratadas con ALSMX-080 a una dosis de 1.0 y 0.5 ml/L con un incremento de 75.03 y 74.95 veces, las plantas tratadas con el elicitor ASM a una dosis de 0.075, 1 y 0.05 y g/L tuvieron un incremento de 74.75, 70.09 y 57.04 veces más en comparación con el testigo absoluto. En el primer muestreo, las plantas tratadas con las 3 dosis de ASM así como las dosis de 1 y 1.5 ml de ALSMX-080 mostraron un incremento en la expresión del gen SAR no mayor a 0.3 veces más que el testigo. En el tercer muestreo solo las plantas tratadas con ASM a una dosis de 0.05 tuvieron un incremento de 0.22 veces más en comparación con el testigo absoluto.

La expresión del gen SAR, está implicado en la transcripción de la proteína PR1, que es inducida en respuesta a una variedad de patógenos. Se trata de un marcador molecular útil para la respuesta de resistencia sistémica adquirida en plantas. La expresión de este gen es sensible a ácido salicílico.

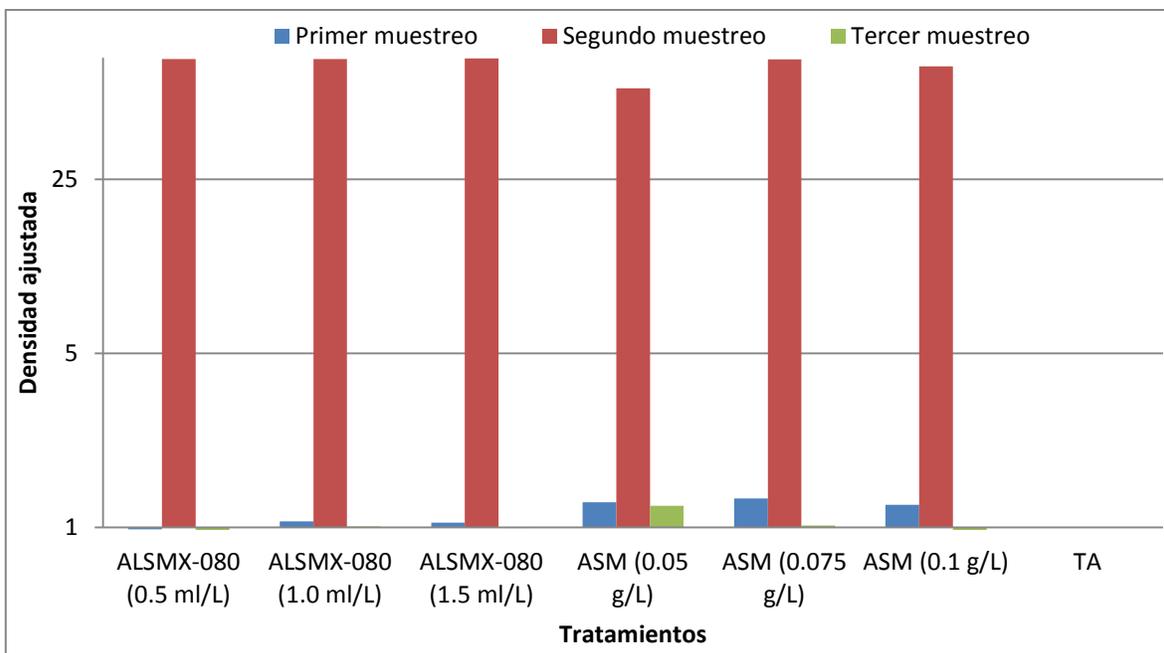


Figura 15: Expresión semi-cuantitativa del gen SAR, en las plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración, segundo a 54 ddt en etapa de llenado de fructificación y tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos).

En la **Figura 16** se muestran los resultados de la expresión semi-cuantitativa del gen SIR, en las plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 y ASM en tres muestreos diferentes, donde se observa que la mayor sobreexpresión se dio en las muestras tomadas a 54 y 68 días después del trasplante y fue inducido por las aplicaciones tanto de ASM como de ALSMX-080, en mayor medida por las aplicaciones de ASM a 0.05 y 0.075 g/L, con un incremento de 0.316 y 0.33 veces más que el testigo absoluto.

El gen SIR codifica para una proteína nuclear localizada (JAZ1) implicada en la señalización vía jasmonato. Los niveles de transcripción JAZ1 se elevan en respuesta a un estímulo de jasmonato. Los jasmonatos (JAS) comprenden una familia de hormonas

vegetales que regulan varios procesos de desarrollo y median en las respuestas a varios tipos de estrés abiótico y biótico, incluyendo patógenos (Demianski *et al.*, 2012).

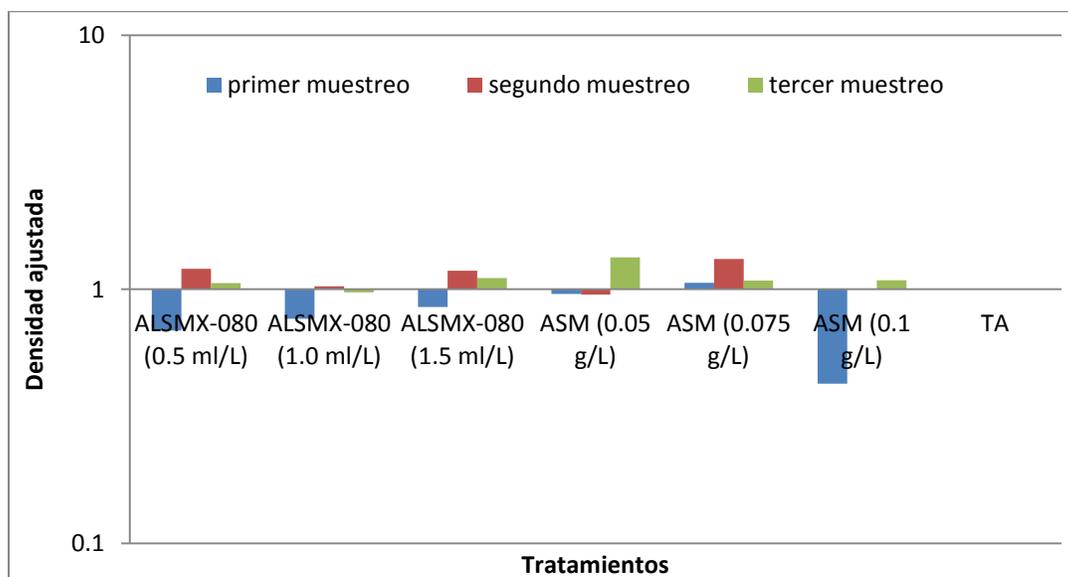


Figura 16: Expresión semi-cuantitativa del gen SIR, en las plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 y ASM a diferentes dosis (primer muestreo a 40 ddt en etapa de floración, segundo a 54 ddt en etapa de llenado de fructificación y tercer muestreo a 68 ddt en etapa de llenado de frutos).

En la **Figura 17** se muestran los resultados de la expresión semi-cuantitativa del gen AT, en las plantas de tomate tratadas con ALSMX-080 y ASM en tres muestreos diferentes, donde se observa que en el primer muestreo solamente las plantas tratadas con ASM a una dosis de 0.05 g/L, tuvieron un incremento de 0.10 veces más en comparación con el testigo absoluto. En el tercer muestreo las plantas tratadas con ASM a las 3 dosis evaluadas tuvieron incremento de la expresión de este gen, en un rango de 0.005 a 0.21 veces más que el testigo.

El gen AT codifica para un miembro de las proteínas quinasas relacionadas con SNF1 (SnRK2) cuya expresión está activada por estrés osmótico iónico (sal) y no iónico (manitol).

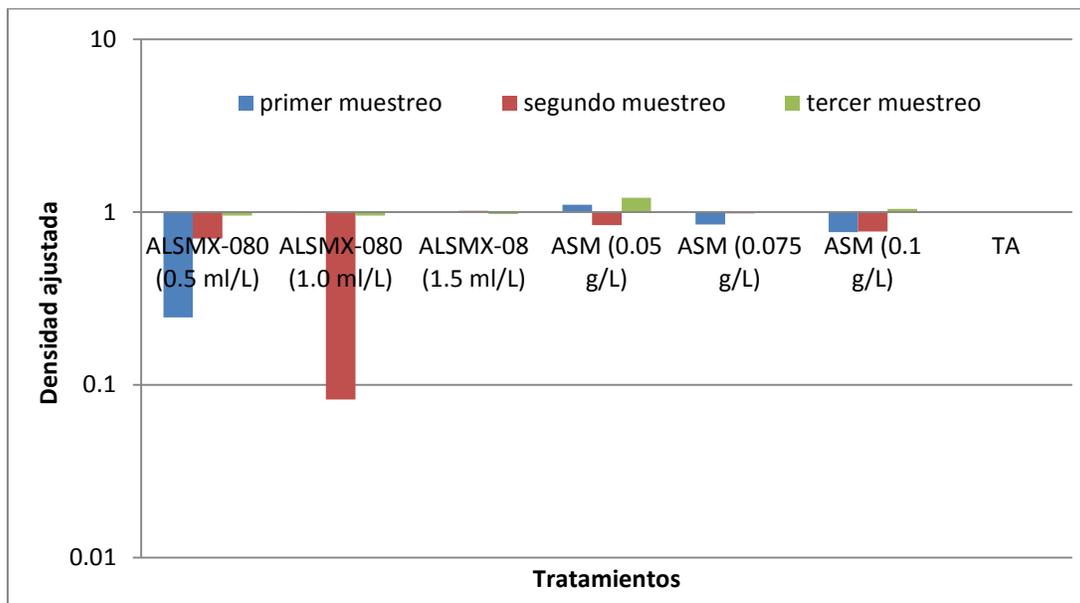


Figura 17: Expresión semi-cuantitativa del gen SAR, en las plantas de tomate tratadas con ALSM-080 y ASM a diferentes dosis (primero, segundo y tercer muestreo).

CONCLUSIONES

En base a los resultados y discusiones que se realizaron previamente, se puede concluir que:

- La utilización de ALSM-080, de forma foliar, a diferentes concentraciones induce una mayor respuesta en los niveles de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, en las hojas de tomate, con un efecto residual de 24 horas.
- La aplicación de ALSMX-080 a una concentración de 0.5 ml/L de forma foliar es la que presenta una mejor respuesta en el aumento la actividad catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.
- El gen mayormente sobre-expresado fue el gen SAR
- La mayor sobreexpresión del gen SAR se obtuvo a los 54 días después del trasplante con la aplicación de ALSMX-080 a las 3 dosis evaluadas.
- La mayor sobreexpresión del gen SIR se obtuvo con la aplicación de ASM a 0.05 y 0.075 g/L a 54 y 68 días después del trasplante.
- La sobreexpresión del gen AT se obtuvo solo con la aplicación de ASM a 40 y 68 días después del trasplante

LITERATURA CITADA

- Abdala, G., Miersch, O., Kramell, R., Vigliocco, A., Agostini, E., Forchetti, G., Alemano, S. (2003). Jasmonate and octadecanoid occurrence in tomato hairy roots. Endogenous level changes in response to NaCl. *Journal of Plant Growth Regulation* 40: 21-27.
- 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.
- Agrios, George; 2002. Fitopatología. Segunda edición. Limusa. Grupo Noriega Editores. Mexico. 425-431 pp.
- Albersheim, P; Valent, BS. 1978. Host-pathogen interactions in plants: plants when exposed to oligosaccharides of fungal origin defend themselves by accumulating antibiotics. *J. Cell. Biol.* 78: 627-643.
- Angarita AS. R. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Revista Manejo Integrado de Plagas* 6: 4-11.
- Anh D, Putt D, Kresty L, Stoner GD, Fromm D, Hollenberg PF. The effects of dietary ellagic acid on rat hepatic and esophageal mucosal cytochromes P450 and phase II enzymes. *Carcinogenesis* 1996; 17(4): 821-8.
- Anónimo. 2005. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
- Arora, A. *et al.* 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Review article. *Current Science*. 82:1227
- Baysal Ö., Soylu E. M. and Soylu S., 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis* *Plant Pathology* 52: 747-753.
- Barbosa MAG, Laranjeira D, Coelho RSB. 2008. Custo fisiológico da resistência a algodoeiros sob diferentes níveis de nitrogênio. *Revista Summa Phytopathologica* 34 (4): 338-342.

- Borboa Flores J., Rueda Puente E. O., Acedo F. E., Ponce J. F., Cruz M., Juárez O., and García Ortega A. M., 2009. Detección de *Clavibactermichiganensis subespecie michiganensisen* el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32 (4): 319-326.
- Bucciarelli, A. &Skliar, M.I. 2007. Plantas medicinales de Argentina con actividad gastroprotectora. *Ars Pharm.* 48 (4):361
- Candolle, A. 1883. *Origine des plants cultivées*. Bailliere. Paris.
- Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, De Resende MLV, Romeiro R. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. FEALQ. Piracicaba. 2005, 11-153.
- 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.
- Custers, J H. H. V. 2007a. General introduction: engineering disease resistance in plants. En: *Engineering disease resistance in plants*: 145-156.
- Chen, Z.; Silva, H.; Klessig, D. F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.
- 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.
- 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.
- Dubery, I.A., L.G. Teodorczuk, A.E. Louw. 2000. Early responses in methyl jasmonate preconditioned cells toward pathogen-derived elicitors. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3:105-110.
- Durrant, W.E., Dong, X., 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185-209.

- Faostat. Datos provisionales 2005 de producción, última actualización febrero del 2006. Disponible en <faostat.fao.org/faostat>. Consultado: abril 18, 2006.
- Farmer E., Ryan CA. 1990. InterplantCommunication: Airbomemethyl ácido jasmonicomonate induces synthesis of protein ase inhibitors in plantleaves. PNAS. pp. 7713-7716.
- Farmer, E. E.; Calderali, D.; Pearse, G.; Walker-Simmons, M. K.; Ryan, C. A. 1994. Diethyloditiocarbamic acid inhibits the octadecanoid signal pathway for the wound induction of proteinase inhibitor in tomato leaves. *Plant Physiology* 106: 337.
- Ford, K.A., Casida, J.E., Chandran, D., Gulevicha, A.G., Okrent, R.A., Durkinc, K.A., Sarpong, R., Bunnellec, E.M., Wildermuth, M.C., 2010. Neonicotinoid insecticides induce salicylate associated plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17527e17532.
- Francis, M.I., Redondo, A., Burns, J.K., Graham, J.H., 2009. Soil application of imidacloprid and related SAR inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *Eur. J. Plant Pathol.*124, 283e292.
- Fridovich.: The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880(1978).
- Fridovich, I.: Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lilestyle. *Photochem. andPhotobiol.* 28: 733-741 (1978).
- G. Camarena G. 2002. Octadecanoides como reguladores de la defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. Universidad Autónoma Chapingo.* pp. 107-112.
- González, M.C. *et al.* 2000. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquimia.* 25:1
- Gorlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.-H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J., 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629e643.
- Gottwald, T.R., 2010. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 119e139.

- Graham, J.H., Dewdney, M.M., Myers, M.E., 2010. Streptomycin and copper formulations for control of citrus canker on grapefruit. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 123, 92e99.
- Graham, J.H., Johnson, E.G., Gottwald, T.R., Irey, M.S., 2013b. Pre-symptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by Huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. *Plant Dis.* 97, 1195e1199.
- Infoagro, 2013. El cultivo de tomate. Consultado el día 18 de Octubre de 2013. <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>
- Inforural, 2012. El cultivo de tomate. Consultado el día 18 de Octubre de 2013. <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article104177>
- 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.
- Jaramillo, J, Arias, M. 1997. ICA Hortalizas, Manual de Asistencia Técnica No 28.
- Kagale, S.; Marimuthu, T.; Thayumanavan, B.; Nandakuman, R. and Samiyappan, R. 2004. Physiological and Molecular Plant Pathology. 65. 91-100 p.
- King, Keen, NT; Partridge, JE; Zaki, AI. 1972. Pathogen produced elicitor of a chemical defense mechanisms in soybeans monogenically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology* 62: 768.
- Kramell, R., Atzorn, R., Schneider, G., Miersch, O., Brückner, C., Schmidt, J., Sembdner, G., Paethier, B. (1995). Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 29-36.
- Küpel, E. *et al.* 2007. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of five Anatolian *Achillea* species. *Turkish J. Pharm. Sci.* 4 (2):89
- Lee, S. H. Choi, S. Suh, I.-S. Doo, K.-Y. Oh, E.J. Choi, A.T. Schroeder Taylor, P.S. Low, Y. Lee. 1999. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol.* 121:147-152.
- Lee, T.M., Lur, H.S., Lin, Y.H., Chu, C. (1996) Physiological and biochemical changes related to methyl jasmonate-induced chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant, Cell and environment* 19: 65-74.

- 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.
- Lyon, GD; Newton, AC. 2000. Implementation of elicitor mediated induce resistance in agriculture. In *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture*. Agrawal, AA; Tuzun, S; Bent, E. Eds. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press.p.299-318.
- Macías, Alejandro. Enclaves agrícolas modernos: el caso del jitomate mexicano en los mercados internacionales. *Región y Sociedad, revista del colegio de Sonora* 15, Enero-Abril 2003,103-151.
- MacuaGonzalez, J. I., Lahoz García, I., Calvillo Ruiz, S. y Bozal Yanguas, J. M. 2012. *Variedades de tomate para industria*. Navarra Agraria. Edición 2013.
- Marroquín, J. 2005. Etimología del tomate (En línea). <http://www.etimologias.dechile.net/?tomate>. (Fecha de consulta 15/01/07).
- 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.
- Melchor, Julio J. Evaluación funcional de licopeno del tomate rojo variedad huaje (*Lycopersicon esculentum* Mill pyriforme). Tesis Ing. en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2006.
- 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.
- Muanza DN, Euler KL, Williams L. Screening and antitumor and anti-VIH activities of nine medicinal plants from Zaire. *IntJPharmacogn* 1995; 33 (2): 98-106.
- Munemasa, S., Oda, K.; Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., and Murata, Y. 2007. The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormonal signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in Arabidopsis guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production. *Plant Physiol* 143, 1398-1407.

- McCord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *Biochem. J.* 244: 6049-6055 (1969).
- Nuez, Fernando. El cultivo del tomate. Madrid España: Ediciones Mundi-Prensa. 2001.
- Ohta, K. A. Taniguchi, N. Konishi, and T. Hosoki. 1999. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. *HortScience* 34:233-234.
- Orozco-Cardenas, M. and C.A. Ryan. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6553-6557.
- Pascale, G. *et al.* 2005. Differential regulation of Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutases by retinoic acid in normal and psoriatic human fibroblasts. *Journal Autoimmunity*. 24 (1):69.
- Patel, S. *et al.* 2006. Status of antioxidant defense system and expression of toxicant responsive genes in striatum of maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse: Mechanism of neurodegeneration. *Brain Res.* 1081: 9.
- Peña-Cortés, H., Barrios, P., Dorta, F., Polanco, V., Sánchez, C., Sánchez, E., Ramírez, I. (2005) Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 246-260.
- Perez, Yaelin Rodríguez, María de los A. Hernández y Blanca M. de la Noval. (2003) dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción de HMA-Tomate (*Lycopersicon* Mill) var. Amalia. Inducción de PR2, PR3 y Fenilalanina Amoniolisa en raíces de tomate. (INCA) La Habana Cuba.
- Prohens, J. y Nuez, F. (Eds). Handbook of plant breeding. Vegetables II: *Fabaceae*, *Liliaceae*, *Solanaceae*, and *Umbelliferae*. New York. Springer Science, 2008, 372 p. ISBN: 978-0-387-74108-6.
- Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Journal of Clinical Interventions in Aging*. 2007 June; 2(2):219-36.
- 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.

- Ramos, Adriana, Aquiles Carballo, Adrian Hernández, y Tarsicio Corona, eds. Caracterización de líneas de jitomate en hidroponía. Agricultura Técnica en México 32, Mayo-Agosto 2006, 213-223.
- Rathke T. D., S. M. Hudson. 1994. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. *Rev. Makromol. Chem. Phys.* 34C (3): 375.
- Rick, C.M.1978. El tomate investigación y ciencia. The tomato. *Sci. Amer.* 239(2): 45-55.
- Rogers, M.E., 2012. Protection of young citrus trees from Asian citrus psyllid and HLB. *Citrus Ind.* 93 (1), 10e15.
- Ronald, A. *et al.* 2007. Efecto protector del *Aloe vera* (sábila) en lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas. *CIMEL.* 12 (2):71
- 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.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant cell* 8:1809-1819.
- Sagarpa. Indicadores Básicos del Sector Agroalimentario y Pesquero. Abril 2010.
- Schreiber K, Desveaux D. 2008. Message in a Bottle: Chemical Biology of induced Resistance in Plants. *Plant Pathology Journal* 24 (3): 245-268.
- Shahin Sharif, A. *et al.* 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *FoodResearch International.* 41:1
- 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.
- Song Y et al. Marginal zinc deficiency increases oxidative DNA damage in the prostate after chronic exercise. *Free Radical Biology & Medicine.* 2010 Jan 1;48(1):82-8. Epub 2009 Oct 28.
- 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.
- Stein, B., Ramallo, J., Foguet, L., Graham, J.H., 2007. Citrus leaf miner control and copper fungicide sprays for management of citrus canker on lemon in Tucumán, Argentina. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 120, 127e131.
- Stainer, R. AND M. Doudoroff, M. 1977 *Microbiologia*. Editorial. Aguilar S. A. Barcelona España. 467 p.m.
- Sur, R., Stork, A., 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bull. Insectol.* 56, 35e40.
- Synowiecki, J. (2003). Production properties and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(2):145-171
- Tally, A., Oostendorp, M., Lawton, K., Staub, T., Bassi, B., 1999. Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. In: Agrawal, A.A., Tuzun, S., Bent, E. (Eds.), *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN, pp. 357e370.
- Te C, Gentile JM, Baguley BC, Pearson AE, Gregory T, Ferguson RL. *In vivo* effects of chlorophyllin on antitumour agent cyclophosphamide. *Int J Cancer* 1997; 70(1): 84-9.
- Tonche, Luis Armando. Determinación del pH óptimo para la proteasa obtenida del cardo (*Cynaracardunculus* L.) aplicable en la tecnología quesera. Tesis Ing. en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2005.
- Tsonev, T.D., Lazova, G.N., Stoinova, Z.G., Popova, L.P. (1998). A posible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedlings to salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 17: 153-159.
- Vallad, G.E., Goodman, R.M., 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44, 1920e1934.
- Valueva TA, Mosolov VV. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defence against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 69: 1305–1309.

- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defenselated proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135e162.
- Van, Haeff, J. N. 1995. *Manuales de tomates para educación agropecuaria. Área: producción vegetal. 2º Edición.* Editorial Trillas. México, D.F. pp.16.
- 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 Phenolicsintterestance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Research Singpost.* Kerolda India.
- Walters, D.R., Fountaine, J.M., 2009. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *J. Agric. Sci.* 147, 523e535.
- 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 inn response to agents that induce.
- Wilkinson VJ, Clapper ML. *Detoxification enzymes and chemoprevention division of population science,* Philadelphia: Fox Chose Cancer Center, 1997.
- Xiang, C., Oliver, D.J. (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metal and jasmonic acid in Arabidopsis. *Palnt Cell* 10: 1539-1550.
- Young H, Jun S, Ho C, Wan S, Hun D, Au W. Anticlastogenic effects of galangin against bleomycininduced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. *Mut Res* 1994; 311: 225-9.