

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÒN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Estudio de la expresión de genes inducidos por la aplicación de un producto a base natural para el control de punta morada de la papa

Por:

Ana Lilia Rodríguez Juárez

Tesis

Presentada como requisito para obtener el título de:

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Estudio de la expresión de genes inducidos por la aplicación de un producto a base natural para el control de la punta morada de la papa

Presentado por:

Ana Lilia Rodríguez Juárez

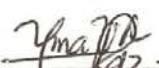
TESIS

Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:


INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El presente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:


Director


Dra. Ana Verónica Charles
Rodríguez

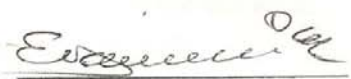
Asesor

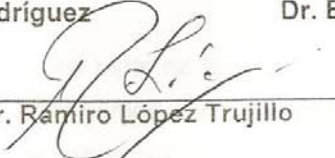

M.C Ma. Lilliana Flores
López

Asesor


MC. Leopoldo Herrera Rodríguez

Asesor


Dr. Edmundo Mario Rodríguez
Campos


Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Marzo, 2011

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme el espíritu, fuerza e iluminación para iniciar y terminar esta carrera profesional y con ello permitirme ahora disfrutar de este maravilloso momento al alcanzar esta meta que me es tan importante para el resto de mi vida.

A la **Virgen María** que siempre intercedió para que nunca me faltara la fe, esperanza y fuerza para vencer todo tipo de obstáculos que en la vida se presentan.

A mi universidad, mi **ALMA TERRA MATER**, por todos los conocimientos

que adquirí durante estos años, además de inculcarme a ser un profesionalista que sepa resolver las adversidades que se presentan en la vida.

Al **Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, principalmente a los maestros por darme sus conocimientos y a todas las persona que ahí trabajan por su gran atención brindada.

A la Dra. **Ana Verónica Charles Rodríguez**. Por haber confiado en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A mi asesor de tesis y una de las personas que más admiro, a **M.C. María Liliana Flores López**, por su valiosa cooperación para concluir este proyecto. Gracias Lili, por tu paciencia, confianza y disposición y por que sin tu valiosa aportación no hubiera sido posible concluir esta investigación.

A las personas que forman parte de la empresa **Biorganix Mexicana S.A. de C.V.** Por su apreciable tiempo y enseñanzas ofrecidas durante mi estancia para la elaboración de este proyecto.

A la **LCN. Laura Maricela Lara López**, gracias por su atención, apoyó y amistad brindada a lo largo de mi estancia en la institución.

A **Andres Briones Montes**, por haberme brindado cariño y ser la persona que más me ha apoyado desde que salí de mi hogar.

A mis grandes **amigos**: Claudia Marín, Candelaria Molina, Lorena Pedraza y Miguel Olivares, Raymundo Cabrera. Por escucharme y apoyarme incondicionalmente, gracias por todos estos años de sincera amistad.

A Ivon Luna, Alfredo Avendaño, Ana Lilia Velázquez, Antonio Mata, Dalia Solís, Nayely Monzón., Valentina Ramos, Ignacio Cristóbal Colon, Germán Cuapio, Flor Rodríguez, y a todos mis compañeros de la generación XCVI.

A todas aquellas personas que de una o de otra forma participaron en mi formación durante mi estancia en esta Universidad. Gracias....

DEDICATORIA

Con mucho cariño:

*A mi madre, **Alejandra Juárez Luna** por su amor, oraciones y grandísimo sacrificio en cada una de las etapas de mi estudio, por ser esa bella flor que se fecundo y me dió la vida. Gracias mamá te quiero mucho.*

*A mi padre, **Julián Rodríguez Martínez** por enseñarme con amor a ser una persona lleno de ilusiones para lograr grandes metas en la vida, quien abrió mis ojos para ver que estudiar es el tesoro mas grande que el hombre puede adquirir, por enseñarme con el ejemplo que con voluntad nos podemos superar y salir adelante. Papa nunca olvides que te quiero mucho.*

*A mis abuelitos: **José Maldonado y Asunción Hernández** que en vida me regalaron el mas caluroso cariño durante toda mi niñez que tanto falta me hacia y quienes me enseñaron a tener amor y humildad.*

*A **Gloria Luna, Juana Martínez y José Rodríguez** por enseñarme a tener fe en Dios, por su motivación y consejos para salir adelante quienes en mas de una ocasión me endulzaron la vida al compartir con migo experiencias de la vida.*

*A mis Hermanos **Reynaldo y Alejandro Rodríguez**, por su gran apoyo y consejos brindados, les agradezco sus sacrificios para que yo saliera adelante.*

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	III
INDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE CUADROS	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 ANTECEDENTES	4
1.2 JUSTIFICACIÓN	5
1.3 HIPÓTESIS	6
1.4 OBJETIVO GENERAL	6
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
2. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1 ORIGEN DE LA PAPA	8
2.1.2 <i>Importancia</i>	9
2.1.3 <i>Enfermedades en el cultivo de la papa</i>	9
2.1.4 <i>La punta morada de la papa</i>	10
2.1.4.1.1 <i>Sintomatología</i>	11
2.2 MÉTODOS DE CONTROL	13
2.2.1 <i>Control cultural</i>	13
2.2.2 <i>Control químico</i>	13
2.2.3 <i>Control legal</i>	14
2.2.4 <i>Control biológico</i>	14
2.2.5 <i>Control alternativo</i>	15
2.3 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA EN PLANTAS	16
2.3.1 <i>Resistencia sistémica inducida (RSI)</i>	17
2.3.2 <i>Resistencia sistémica adquirida (RSA)</i>	17
2.3.3 <i>Metabolitos secundarios</i>	18
2.3.4 <i>Compuestos fenólicos</i>	19
2.3.5 <i>Fitoalexinas</i>	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.2 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE GENES	22
3.3 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES DE HOJAS Y TALLOS.....	24
3.4 DETERMINACIÓN DE FITOALEXINAS EN TUBÉRCULO	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE GENES	27
4.2 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES EN TUBÉRCULO.....	33
4.3 DETERMINACIÓN DE FENOLES EN TALLO Y HOJA	34
4.4 DETERMINACIÓN DE FITOALEXINAS	36
5. CONCLUSIONES	39
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. SÍNTOMAS TÍPICOS DE LA PUNTA MORADA DE LA PAPA.....	12
FIGURA 2. COMPARACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN DE LOS MENSAJEROS SECUNDARIOS AS Y AJ EN LA RSI O RSA.	18
FIGURA 3. EXPRESIÓN DE GENES EN PLANTA DE PAPA EN EL PRIMER MUESTREO	29
FIGURA 4. EXPRESIÓN DE GENES EN PLANTA DE PAPA EN EL SEGUNDO MUESTREO.....	31
FIGURA 5. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES EN TUBÉRCULO....	34
FIGURA 6. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES EN TALLO Y HOJA.	35
FIGURA 7. DETERMINACIÓN DE FITOALEXINAS EN TUBÉRCULO.	37

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
CUADRO 2. DIAGRAMA DE APLICACIONES, MUESTREOS Y VARIABLES EVALUADAS.....	22
CUADRO 3. RELACIÓN DE PRIMERS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA.	24
CUADRO 4. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO (500 PPM).	25
CUADRO 5. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESISTENCIA EN PAPA EN EL PRIMER Y SEGUNDO MUESTREO.	33
CUADRO 6. RESULTADOS DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS DE TUKEY (A = 95%)	34
CUADRO 7. RESULTADOS DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS DE TUKEY (A = 95%)	35
CUADRO 8. RESULTADOS DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS DE TUKEY (A = 95%)	38

RESUMEN

La enfermedad de la punta morada de la papa en México representa pérdidas considerables llegando a producir hasta un 95% de tubérculos anormales lo que significa una pérdida total del valor comercial del cultivo. El empleo de inductores de resistencia en plantas se presenta como una alternativa en el tratamiento de esta y otras enfermedades más, además de presentarse como una opción amigable para el medio ambiente. El presente trabajo se realizó en la empresa Biorganix Mexicana S.A de C.V en donde se estudió el mecanismo de defensa en plantas de papa en ausencia de la enfermedad “punta morada” mediante el empleo de un producto a base natural denominado BX-47 en dos diferentes dosis, además de la aplicación de inductores de resistencia como ácido salicílico y ácido jasmónico, los que fueron aplicados por aspersión directamente 15 días después de la germinación de la planta. Repitiendo el experimento 4 veces en un lapso de tiempo de 15 días, esto bajo condiciones de invernadero.

Las evaluaciones se realizaron detectando la expresión de ciertos genes marcadores, mediante la síntesis y amplificación de ADN complementario (ADNc) con la técnica PCR y análisis de geles de electroforesis, siguiendo la comparación estadística de la expresión de las diferentes dosis con un testigo absoluto para comprobar la presencia del efecto inductor de resistencia. Este efecto fue evaluado mediante la expresión de 9 genes reportados previamente en la literatura. De igual manera se midió la cantidad de fenoles y fitoalexinas para todos los tratamientos. Estos se analizaron estadísticamente en una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de rangos múltiples de Tukey.

La aplicación del producto BX-47 resultó en la expresión de los 9 genes de resistencia; estos resultados demuestran que el producto puede ser aplicable en el cultivo de papa como herramienta de control de la enfermedad de punta morada. Futuros estudios en condiciones de campo y en presencia de la enfermedad serían requeridos para comprobar su efectividad.

Palabras clave: BX-47, expresión de genes, inducción de resistencia.

ABSTRACT

In Mexico, potato purple top disease accounts for considerable losses causing up to 95% of abnormal tuber production. This means the total loss of the commercial value of the crop. The use of plant resistance inducers is presented as an environmentally friendly alternative to treat this and other agricultural crop diseases. The following project was made in the facilities of Biorganix Mexicana S.A. de C.V. The mechanism of plant defence under greenhouse conditions in the absence of the disease 'potato purple top' was studied by the application of two different doses of a natural based product key: BX-47 and the resistance inducers salicylic and jasmonic acid; these were applied directly in to the plant by aspersion 15 days after germination, repeating the experiment 4 times in periods of 15 days after the previous application.

The evaluation was done by detecting marker genes by complimentary DNA (cDNA) synthesis and amplification through PCR and gel electrophoresis techniques. A statistical comparison with an untreated control was made in order to determine the effect of the resistance inducer. The genetic evaluation included the expression of 9 genes previously reported in literature. Likewise, phenol and phytoalexin levels were measured for all treatments and were statistically tested by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's range test.

Application of the resistance induction product BX-47 resulted in the expression of all 9 evaluated genes; these results demonstrated the product's applicability as a tool for the control of purple top disease in potato crops. Future studies in field conditions and in presence of the disease would be required to prove its efficacy.

Key words: BX-47, gene expression, resistance inducers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) en México ocupa el cuarto lugar en importancia superado por el maíz, trigo y arroz. Sin embargo, entre las hortalizas cultivadas se ubica en el primer lugar (Flores y Lira, 2008). Desde 1992 se ha venido observando una enfermedad que ha causado pérdidas importantes en este cultivo, misma que se le denomina “Punta Morada de la Papa”, debido a la coloración morada o púrpura que adquieren los bordes de las hojas jóvenes cuando la planta es atacada por esta enfermedad (Flores y Lira, 2008). Su aparición es independiente de condiciones climáticas tales como temperatura, humedad relativa y días nublados; lo único que esta enfermedad requiere es la presencia de los insectos vectores. Puede causar pérdidas considerables, llegando a producir hasta un 95% de tubérculos anormales, lo que significa la pérdida total del valor comercial del cultivo (Erlar *et al.*, 2007). La causa de la enfermedad de la punta morada se ha atribuido a fitoplasmas *Ca. Phytoplasma asteris* (Molliuctes: Acholeplasmatales), el cual es un tipo de bacteria que es un parásito obligado; actualmente existen publicaciones científicas que indican también la participación del organismo bacteriano *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lia *et al.*, 2009). Ambos organismos son transmitidos por insectos pertenecientes al orden Hemíptera, principalmente cicadelidos (*Circulifer tenelus*) y psílidos como la Paratrioza (*Bactericera cockerelli*) (Fiarro *et al.*, 2007).

El control de enfermedades se ha hecho difícil por los elevados costos de los plaguicidas, en su mayoría de importación. Además de que este medio de control ha traído enormes problemas para la salud animal y humana con un impacto ambiental que cada vez más va incrementado. Esto ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de enfermedades y plagas agrícolas, basados en el biocontrol, empleando productos de origen vegetal,

animal o microbiano, explorando el potencial presente en los metabolitos secundarios y con los avances del conocimiento de los mecanismos de la resistencia sistémica inducida o adquirida. En la naturaleza encontramos a las plantas continuamente expuestas a una amplia gama de microorganismos patogénicos que las pueden atacar, pero éstas tienen la capacidad de utilizar varias estrategias de defensa. Esto lleva a representar nuevas alternativas para los agricultores.

Actualmente BIORGANIX MEXICANA S.A de C. V. se encuentra trabajando en el desarrollo de un producto a base de extractos vegetales para el control de la punta morada de la papa, basado en la inducción de la resistencia y la modificación de los hábitos alimenticios de los insectos vectores; sin embargo existen inconvenientes, ya que los productos recomendados como inductores de resistencia actualmente no cuentan con un reglamento nacional bajo el cual se presente una solicitud de registro ante la dependencia correspondiente.

Este trabajo de investigación se realizó en la empresa Biorganix Mexicana S.A. de C.V., en colaboración con el Departamento de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; como parte del proyecto “Desarrollo de un Agroquímico de Base Natural para el Control de la Punta Morada de la Papa” financiado por CONACYT-ECONOMIA (ECO-2007-COL-72501).

1.2 Justificación

Actualmente el sector agrícola requiere de productos de alto valor biológico para poder contrarrestar las distintas enfermedades causadas por patógenos; por lo tanto la utilización de productos derivados de extractos vegetales, pueden ser de gran utilidad para la prevención de enfermedades en plantas y pérdidas económicas para los productores.

La agricultura orgánica en México y en el mundo es una tendencia en constante crecimiento en los últimos años, sin embargo la oferta de productos biológicos y orgánicos aprobados para esta práctica es aún limitada presentando una gran área de oportunidad para el desarrollo de nuevos productos que satisfagan las necesidades del agricultor con soluciones reales y amigables con el medio ambiente.

El uso de productos orgánicos como inductores de resistencia es una extensa área de trabajo dirigida al desarrollo de nuevos métodos para el control de plagas que reúnan los requerimientos de seguridad en la aplicación tanto en condiciones de invernadero como de campo abierto. Los bajos o nulos efectos negativos en el crecimiento vegetal, desarrollo y rendimiento del cultivo, además de la baja o nula toxicidad tanto para el cultivo como para el consumidor y aunado a su capacidad de provocar la inducción de un amplio espectro de defensas, hacen de esta solución una atractiva área de estudio que brindaría un efecto de protección duradera y de bajo costo para el agricultor.

1.3 Hipótesis

El producto BX-47 a base natural es capaz de inducir resistencia en la planta de papa, al activar los genes que actúan directamente en el mecanismo de defensa de la planta.

1.4 Objetivo General

Evaluar la expresión de genes y metabolitos secundarios de resistencia inducidos por la aplicación de un producto a base orgánica en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Gigant.

1.5 Objetivos Específicos

- Estudiar la expresión de genes inducidos por la aplicación de un producto a base orgánica en plantas de papa en ausencia de la enfermedad.
- Comparar la expresión genética en las plantas tratadas con el producto orgánico contra la expresión de genes de plantas tratadas con 2 moléculas inductores de resistencia (ácido jasmónico y ácido salicílico).
- Cuantificar la producción de metabolitos secundarios relacionados con la resistencia adquirida de la planta (fenoles y fitoalexinas) en los diferentes tratamientos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen de la papa

El género *Solanum* es muy diverso, ya que existen alrededor de 1000 especies, y se encuentra ampliamente distribuida en el mundo; sin embargo, hay una fuerte concentración de especies en América del Sur y América Central.

Las solanáceas tuberosas no representan más del 10 por ciento del género *Solanum*; se conocen alrededor de 200 especies repartidas en 21 series taxonómicas, se les encuentra desde las montañas, hasta el sur de Chile, sobre todo en las zonas elevadas, aunque algunas especies se encuentran en las llanuras de Argentina, Uruguay y el sur de Brasil, en el litoral peruano y chileno del pacífico (Rousselle *et al.*, 1999).

Algunos autores coinciden con los estudios por Vavilov (1951), respecto a que el centro del origen de la papa está localizado en la tierra alta de Perú, habiéndose extendido por el sur de Bolivia, Argentina y Chile; por el norte hacia Ecuador, Colombia, Guatemala y México, de estas regiones fue introducida a Europa por los conquistadores españoles a finales del siglo XVI, de donde se extendió al mundo en pocos siglos. Una vez distribuida mundialmente ha sido muy útil como alimento humano (Huaman *et al.*, 1998). Actualmente en México se siembran alrededor de 67 mil hectáreas de las que se obtiene una producción aproximada de 1 millón 350 mil toneladas, mismas que permiten satisfacer las demandas del consumo interno. En los últimos 10 años, los principales estados productores han sido: Sinaloa, Coahuila, Estado de México, Nuevo León, Chihuahua, Sonora y Guanajuato, quienes en conjunto aportaron el 60 por ciento del total de la producción nacional durante este mismo periodo (Moctezuma y Sánchez, 2005).

2.1.1 Importancia

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una hortaliza muy importante, no solamente por la superficie que anualmente se destina a su cultivo, sino por la cantidad de carbohidratos que aporta a la alimentación del pueblo mexicano. Es una fuente muy significativa de energía como alimento de uso tradicional. Ofrece mayor producción de calorías por hectárea y es el segundo lugar en cuanto a la producción por unidad de superficie de proteína diaria, después de la soya (SARH, 1994). Además, constituye una fuente importante de ingresos para los agricultores, y genera empleos para los trabajadores agrícolas que abarcan todas las labores de cultivo y de postcosecha como cargadores, transportistas y comerciantes (Rocha, 1985).

La mayoría de la papa producida en el mundo se consume en fresco, pero en los países desarrollados cada vez es más alto el porcentaje de papa que se procesa de diferentes maneras para su aprovechamiento posterior. Actualmente, en la industria de la papa, las técnicas han evolucionado con papas trozadas congeladas y hojuelas deshidratadas, y otros sistemas de deshidratación y de conservación mediante fritura para cocción respectivamente (Alonso, 1996).

2.1.2 Enfermedades en el cultivo de la papa

A causa de ser un cultivo atacado por muchos insectos, plagas y enfermedades, es importante mencionar algunas de las enfermedades que pueden mermar en gran medida su producción.

El cultivo de la papa es atacado frecuentemente por patógenos de diversa naturaleza, provocando enfermedades de las cuales destacan: la pierna negra, producida por la bacteria *Erwinia carotovora*; el marchitamiento bacteriano, provocado por *Ralstonia solanacearum*; necrosis bacteriana,

producida por *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*; tizón tardío, producido por *Phytophthora infestans* Mont. De Bary; tizón temprano, provocado por el hongo *Alternaria solani* Ell. Sor; amarillamiento y marchitamiento provocados por varias especies de hongos del género *Fusarium*; verticilosis, causada por el hongo *Verticillium alboatrum*; *Rizoctonosis* por *Rhizoctonia solani* Kuhn (Arce, 1996). Además, entre las enfermedades provocadas por virus destacan el *potexvirus X* (PVX), el *potyvirus Y* (PVY), el *carlavirus S* (PVS), y el *potyvirus A* (PVA) (NAPPO citado por Lozoya-Saldana et al., 2002). Dentro de las enfermedades causadas por fitoplasmas destaca la punta morada de la papa, cuyos síntomas se han descrito en prácticamente todos los continentes (Arce, 1996), y por la importancia que ha manifestado en los últimos años, ha sido objeto de diversos estudios.

2.1.3 La punta morada de la papa

La punta morada de la papa (PMP), fue reconocida inicialmente en Canadá durante 1933, pero fue hasta 1953, cuando se registraron incidencias del 20 al 75%. En 1954 las pérdidas en la producción comercial de papa fueron cuantiosas en Canadá y Estados Unidos de Norte de América (Cadena, 1993). Fue mencionada por primera vez en México por Niederhauser y Cervantes en 1956 y observada en el valle de Toluca, en las cercanías del Nevado de Toluca, en Guanajuato, Michoacán y en los estados de Puebla y Tlaxcala (Cadena y Galindo, 1985). A principios de la década de los noventa en las áreas paperas de Coahuila, Nuevo León y Jalisco, comenzó a manifestarse una enfermedad de etiología parecida a la de punta morada de la papa como tubérculos aéreos y brotes axilares anormales, así como una coloración en los bordes de las hojas rosa-purpura (García, 1996).

La punta morada de la papa es considerada después del tizón tardío, como la enfermedad más importante del cultivo (Moctezuma y Sánchez, 2005).

Su aparición es independiente de condiciones climáticas tales como temperatura, humedad relativa y días nublados; lo único que esta enfermedad requiere es la presencia de los insectos vectores (García De La Rosa y Flores Nava, 2003). Puede causar pérdidas considerables, llegando a producir hasta un 95% de tubérculos anormales, lo que significa la pérdida total del valor comercial del cultivo (Cadena-Hinojosa, 1999).

La causa de la enfermedad de la punta morada se ha atribuido a fitoplasmas, transmitidos por insectos pertenecientes al orden Hemiptera, principalmente cicadelidos (*Circulifer tenelus*) y psílicos como la Paratrioza (*Bactericera cockerelli*) (Fiarro *et al.*, 2007). Actualmente existen publicaciones científicas que indican también la participación del organismo bacteriano *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lia *et al.*, 2009)

Almeyda *et al.*, (2008) consignan que *B. cockerelli* en México está relacionado con la enfermedad permanente del tomate y han considerado que su agente causal era de etiología viral, y que el mayor porcentaje de asociación de *B. cockerelli* con fitoplasmas, ubica a esta especie como el posible principal vector del agente causal de la punta morada de la papa.

2.1.3.1 Sintomatología

Algunos autores mencionan que los síntomas provocados por esta enfermedad, varían, dependiendo del órgano de la planta afectado, estado fenológico del cultivo y condiciones del medio ambiente que rodean al mismo (Flores *et al.*, 2004).

En el tubérculo, se puede observar un rayado generalizado conocido como papa rayada o papa manchada. Estas rayas o manchas pueden ser leves o cubrir totalmente el interior del tubérculo (Flores *et al.*, 2004). Las plantas pueden manifestar la enfermedad desde los 20 días después de la emergencia, dependiendo de las condiciones de nutrición, y humedad. Muestran

acortamiento de entrenudos, coloración amarilla y/o morada en los márgenes de las hojas apicales principalmente, proliferación de brotes axilares con una hinchazón basal y el tallo tiene forma de raquis (Figura 1) (Flores *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004).

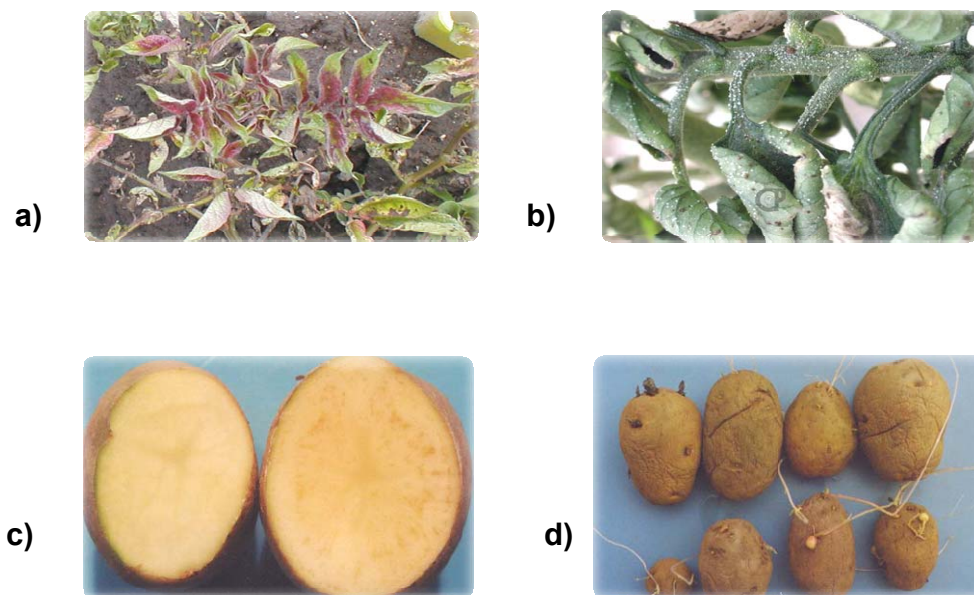


Figura 1. Síntomas típicos de la punta morada de la papa. a) Manchado característico de la PMP en hoja., b) Enrollamiento apical., c) Necrosis interna., d) Disminución en el rendimiento de tubérculo.

Estos síntomas son más evidentes 40 días después de la emergencia y en adelante, lo que quizás tenga que ver con el arribo previo de insectos vectores de fitoplasmas que se alimentan de la sabia de la planta de la papa, y al hacerlo inoculan el o los fitoplasmas. En síntomas muy avanzados, los tallos subterráneos, estolones y raíces, manifiestan una coloración café oscura del sistema vascular (Flores *et al.*, 2004). La producción de tubérculos aéreos, pequeños y deformes como producto del taponamiento del sistema vascular, es muy común (Arslan *et al.*, 1985). La planta enferma toma al final una apariencia

de marchitez con un tono amarillento a morado apagado y muere prematuramente (Cadena y Galindo, 1985).

2.2 Métodos de control

El control de la enfermedad de PMP y otras relacionadas, depende exclusivamente del uso de semillas libres de esta enfermedad, el control del vector y eliminación de toda planta que muestre algunos de los síntomas descritos. En tubérculos en brotación, deben eliminarse aquellos que muestren principalmente proliferación de brotes y brotes ahilados (Salazar, 1996).

Algunos métodos de control se describen a continuación:

2.2.1 Control cultural

Las prácticas culturales más importantes que deben ser utilizadas para el manejo de los insectos vectores son la destrucción voluntaria de los focos de infestación, destruyendo las plantas viejas, inmediatamente después de la última práctica del cultivo; la destrucción de plantas hospederas de la plaga o de la enfermedad, al menos en los márgenes del cultivo y lotes adyacentes y el uso de semilla sana. Algunos autores señalan que el suelo y la fertilización pueden ayudar a disminuir los daños ocasionados por este insecto; se considera que si una planta se encuentra sana, es difícil que sea atacada severamente por las plagas (Avilés *et al.*, 2002).

2.2.2 Control químico

Una de las alternativas para el control de insectos es el método químico, donde responde de forma inmediata; sin embargo, lo interesante de este método es saber utilizarlo para así evitar el incremento de contaminantes en el medio ambiente que tanto daño ocasiona. Existen varios productos que ejercen buenos controles para este insecto, los cuales deben de utilizarse adecuadamente para evitar en un futuro que esta especie adquiriera resistencia a esta alternativa de solución (Avilés *et al.*, 2002).

Cortéz y Hurtado (2002) recomiendan para el control de *B. cockerelli* en el cultivo de papa el Tyociclam H oxalato en dosis de 429 g/ha, imidacloprid + cyflutrinn en dosis de 286 mL/ha, imidacloprid 429 g/ha y endosulfan en dosis de 1.5 L/ha.

2.2.3 Control legal

La Norma Mexicana (NOM-081-FITO-2001) precisa el manejo y eliminación de focos de infestación de plagas, mediante el establecimiento o reordenamiento de fechas de siembra, cosecha y destrucción de residuos, debido a que se considera que los daños de esta plaga repercuten en forma directa sobre los rendimientos obtenidos por unidad de superficie y en la calidad fitosanitaria y comercial, causando pérdidas socioeconómicas y un decremento significativo de las divisas obtenidas por las ventas de productos y subproductos de estos cultivos en el mercado nacional y de exportación (SAGARPA, 2002).

2.2.4 Control biológico

Este método de control emplea el uso de enemigos naturales, comúnmente llamados insectos benéficos, para prevenir, reducir o retrasar el desarrollo de poblaciones elevadas de las plagas. El objetivo del control biológico es mantener las poblaciones plaga por abajo del umbral que ocasiona un daño económico, no eliminarlas completamente, ya que ello equivaldría a dejar sin su fuente de alimento a los agentes de control biológico (De Bach, 1974). La aplicación de este método puede ser considerado como una estrategia válida para restaurar la biodiversidad funcional en ecosistemas agrícolas, al adicionar entomófagos "ausentes" mediante las técnicas clásicas o aumentativas de control biológico, incrementando la concurrencia natural de predadores y parásitos a través de la conservación y el manejo del hábitat (Nicholls y Altieri, 1997).

La introducción de enemigos naturales tiene una gran ventaja sobre otros métodos de control: es auto-sostenible y por tanto, económicamente viable a largo plazo, y con un mínimo o inexistente impacto ambiental (Flint y Roberts, 1989). Sin embargo, el abuso en el uso de insecticidas en el cultivo de la papa, trajo consigo una disminución considerable de insectos benéficos, por lo que el método de control biológico del vector causante de la PMP (*B. cockerelli*) se ha visto impedido.

2.2.5 Control alternativo

Un gran número de extractos de plantas han mostrado poseer actividad inductora, un ejemplo es el extracto de *Hedera helix* (Baysal *et al.*, 2002). Productos comerciales conteniendo extractos etanólicos de plantas han mostrado actividad contra un amplio rango de patógenos de muchos cultivos.

Von Rad *et al.*, (2005) observó la expresión de genes en *Arabidopsis* tratada con varios inductores comerciales disponibles, entre ellos el Neudo Vital, el cual es un extracto etanólico de plantas producido por W. Neudorff GmbH KG (Alemania).

El potencial de los extractos vegetales en el manejo de las plagas se sustenta por apoyar el manejo integrado de plagas en la producción de cultivos orgánicos, para ello se utilizan extractos de plantas con propiedades plaguicidas (Quintero *et al.*, 2002).

Las plantas ofrecen una fuente excelente de productos naturales biológicamente activos. A través de los años, numerosas plantas han sido exploradas como fuentes de insecticidas (Benner, 1993).

2.3 Inducción de resistencia en plantas

La resistencia inducida a enfermedades es el proceso que conduce a una mayor capacidad defensiva que es dependiente de las barreras físicas o químicas de la planta y activada por agentes bióticos o abióticos (Van Loon *et al.*, 1997). El proceso está regulado por una compleja red de señalización en donde destacan las señales moleculares del ácido salicílico y jasmónico (Beckers *et al.*, 2006). El primero induce la resistencia sistémica adquirida (RSA), que se caracteriza por la síntesis de numerosas proteínas de defensa. El ácido salicílico es uno de los compuestos claves para la estimulación de las defensas en las plantas por su capacidad sistémica de moverse y estimular a la planta a protegerse. Algunos de los compuestos que forman las plantas para sus defensas al estimularse con AS son: quitinasas, beta-1,3-glucanasas, PR-1, PR-5 (Durrant and Dong, 2004). El segundo está relacionado con la protección al ataque de insectos y patógenos necrotróficos (Beckers *et al.*, 2006) e induce la producción de diversas fitoalexinas, sustancias volátiles e inhibidores de proteinasas (Engelberth *et al.*, 2004). Ambas vías de señalización conducen a la activación de la autodefensa de las plantas y son disparadas por una gran cantidad de inductores.

El concepto de inductor ha sido asignado a moléculas activadoras capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en la planta, en ausencia del patógeno; la naturaleza química de estos inductores es muy variada, tales como: ácidos grasos, glicoproteínas, proteínas, péptidos, glicolípidos, lípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, entre otros. Se pueden encontrar inductores de tipo exógeno y endógeno, dependiendo de cómo son producidos. En el primer caso, el origen es parasitario o producido por algún agente físico externo, lo que lleva a subclasificar este tipo de inductores en biótico y abiótico, respectivamente. Cuando se menciona al inductor endógeno, se le asimila con moléculas liberadas desde la pared celular (contiene 90% de polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y/o pectina y, un 10%

de proteínas) del hospedante como resultado de la actividad hidrolítica del patógeno. Los fragmentos liberados, se consideran responsables de inducir las señales de defensa en la misma planta.

La inducción de resistencia resulta de la interacción de una planta con un agente inductor disponible. Los inductores pueden ser diversos. Sin embargo, en todos los casos, la interacción con el agente inductor resulta en la expresión de defensas y en la preparación de los tejidos sanos a responder rápidamente a la infección (Walters *et al.*, 2007).

2.3.1 Resistencia sistémica inducida (RSI)

Es un estado fisiológico en el que se mejora la capacidad de defensa dada por microorganismos que interactúan con las raíces de las plantas de manera benéfica. Las defensas innatas de la planta se potencian contra el subsecuente ataque de patógenos y parásitos, incluyendo bacterias, virus, hongos, nematodos y hasta insectos herbívoros. La RSI no involucra la acumulación de proteínas relacionadas con patógenos pero es regulada por jasmonatos y etileno. Estos mecanismos de resistencia permiten a la planta encender sus mecanismos de defensa a larga distancia (Figura 2) (Galindo-Flores, 2008).

2.3.2 Resistencia sistémica adquirida (RSA)

Es un estado fisiológico en el que se mejora la capacidad de defensa, y es activada por un patógeno virulento, como algún microorganismo no patogénico o de manera artificial por algún químico mediado por la producción de ácido salicílico, además de que se origina en el punto de infección y que involucra la síntesis de proteínas relacionadas a patogenicidad (PR) (Figura 2) (Galindo-Flores, 2008).

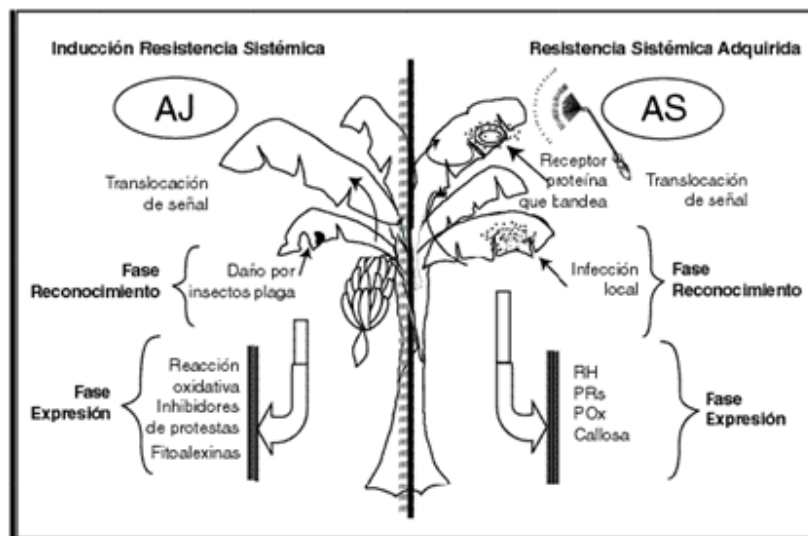


Figura 2. Comparación del modo de acción de los mensajeros secundarios AS y AJ en la RSI o RSA, tanto en la relación planta-patógeno como en la relación planta-insectos plaga (Tally *et al.*, 2000).

2.3.3 Metabolitos secundarios

Rodríguez (1997) indicó que las plantas son laboratorios naturales, donde se biosintetiza una gran cantidad de sustancias químicas, entre las que se encuentran las que producen el efecto protector, las cuales generalmente forman parte de los llamados “metabolitos secundarios” (MS). En las plantas son frecuentes los metabolitos secundarios con funciones defensivas contra insectos, tales como los alcaloides, aminoácidos no proteicos, los esteroides, las fitoalexinas, fenoles, glicosidos, quinonas, taninos y terpenoides.

Los MS forman parte de la protección química en las plantas ya que participan con una actividad antimicrobiana en contra de patógenos o con actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000). Los MS son compuestos de bajo peso molecular, se conocen aproximadamente 20,000 estructuras, que por su composición química son clasificados en dos grupos principalmente: nitrogenados y no nitrogenados (Wink, 1999). Los precursores de la biosíntesis de MS se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato.

2.3.4 Compuestos fenólicos

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

2.3.5 Fitoalexinas

Las fitoalexinas se definieron originalmente como metabolitos secundarios de bajo peso molecular, con propiedades antimicrobianas y que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos (Paxton, 1981). Estos compuestos normalmente se encuentran en niveles basales muy bajos en las plantas sanas, pero su acumulación se incrementa dramáticamente después del ataque de un patógeno. Las fitoalexinas se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan con la respuesta de hipersensibilidad (HR) (Hammerschmidt, 1993). Entre las fitoalexinas más estudiadas se encuentran aquellas derivadas del metabolismo de los fenil propanoides que tienen como base el aminoácido fenilalanina.

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

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló bajo condiciones de invernadero y los análisis se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular en las instalaciones de la empresa Biorganix Mexicana S.A de C.V., situada en el municipio de Ramos Arizpe, Coahuila, México.

3.1 Procedimiento experimental

Se utilizaron semillas de papa de la variedad Gigant, fueron colocadas en bolsas de plástico para invernadero de 20 L. El diseño experimental usado en la prueba fue básico, con 5 tratamientos completamente al azar con 3 repeticiones (Cuadro 1). En donde la unidad experimental estuvo representada por una planta de papa. En la prueba se evaluaron 2 diferentes dosis de la fórmula del prototipo BX-47.

Cuadro 1. Diseño experimental.

Tratamientos	Dosis	Dosis (L/Ha)
T ₁ (BX-47)	Dosis baja	3
T ₂ (BX-47)	Dosis alta	6
T ₃ (Ácido salicílico)	Dosis alta	6*
T ₄ (Ácido jasmónico)	Dosis alta	6*
T ₅ (Testigo absoluto)	Agua	Agua

* Solución 0.18 M.

Para asemejar las condiciones de aplicación de los productos en el proceso de producción estándar, se calculó la cantidad del producto a tirar por planta (7 ml). Se realizaron dos aplicaciones, la primera aplicación a los 20 días después de la germinación (ddG) de la planta y la segunda a los 35 días ddG, en donde la variable de evaluación fueron los productos, y las variables

medidas la expresión de genes. La tercera aplicación se realizó a los 50 ddG y la cuarta aplicación a los 65 ddG, en donde las variables medidas fueron la producción de fitoalexinas en tubérculo y los fenoles totales en tallo, hoja y tubérculo (Cuadro 2), estas variables se evaluaron hasta el cuarto muestreo.

Las condiciones de humedad y temperatura fueron monitoreadas diariamente, así como el riego de las plantas.

Cuadro 2. Diagrama de aplicaciones, muestreos y variables evaluadas.

Actividad	Aplicación	Muestreo	Variable de Respuesta
Aplicaciones			
Primera	8 junio	10 junio	Expresión de genes
Segunda	23 junio	25 junio	Expresión de genes
Tercera	7 julio	Producción de fitoalexinas y fenoles
Cuarta	23 julio	25 julio	Producción de fitoalexinas y fenoles

3.2 Evaluación de expresión de genes

Para el estudio de la expresión de genes, se muestrearon plantas a los 3 días después de la primera y segunda aplicación de los tratamientos. Se tomó el cuarto peciolo de cada unidad experimental. La muestra fue cortada y envuelta en papel aluminio y se pasó, inmediatamente, a nitrógeno líquido para evitar la degradación de la muestra. Posteriormente, se realizó la extracción de ARN utilizando el método de Trizol[®] (Invitrogen); para la síntesis de ADNc se utilizó la reacción de transcriptasa reversa, siguiendo la metodología del fabricante (Invitrogen).

Para la evaluación de la expresión de genes se utilizaron nueve pares de primers que previamente fueron probados en la empresa, para la amplificación de genes asociados con la resistencia en papa (Cuadro 3). La amplificación se llevó a cabo preparando un cóctel con 22.5 µl de reactivo PCR-mix (Invitrogen), 1 µl del ADNc (100 ng/µl) y 1 µl del primer izquierdo (25 mM) y 1 µl del primer derecho (25 mM) en microtubos de 200 µl (Axygen); se colocaron en el termociclador (Techne) y se seleccionó el programa con temperatura de desnaturalización de 94°C por 5 min, y 35 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturalización), 60°C por 30 s (alineación) y 72°C por 1 min. Una vez terminada la reacción se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % (p/v). Para la visualización de los segmentos amplificados se utilizó como referencia un marcador molecular de 100 bp (pares de bases) DNA Ladder (Invitrogen). Los geles se visualizaron y documentaron en el sistema de fotodocumentación (Minibispro DNR).

Cuadro 3. Relación de primers utilizados para la amplificación de genes de resistencia.

Gen	Secuencia	Tamaño de banda (pb)
1. PR1	TCAGGTGCAGGAGAGAACCT AATGAACCACCATCCGTTGT	213
2. PR2	GAAGCTGGTTTGGGAAATGA GTCTTGTGTGGCACCAATG	399
3. GLP1	TGGCAAGTGCATTTGTGAGT GCTCGGTAACGGATAAGCAA	328
4. GST-1	TGGCAAGTGCATTTGTGAGT GCTCGGTAACGGATAAGCAA	378
5. CHTB-3	GGTCCTTCAGGGGACTTAGG CACGATTAGCTGCTTGGTCA	577
6. P17CA-1	CCCTCGAATTGACTTTGGAA TAGCCGTGGTAAAGGTCCAC	453
7. AVIR-1	GCTACTGATCCTTTCCGCAG GCTTGAAGCGCCATAAAATC	477
8. ARG-1	GCCTCAACGTCTCTTCTTGG CACGGAGATATACACGCCCT	621
9. EF1A-3	TTTGGCCCTACTGGTTTGAC GTCTCAACAACCATGGGCTT	404

3.3 Determinación y cuantificación de fenoles de hojas y tallos

A los 3 días después de la última aplicación de los tratamientos, se muestrearon tallo y hojas de cada planta (100 mg). La muestra se pasó a nitrógeno líquido y se maceró inmediatamente para evitar la degradación de la misma. Posteriormente se agregó 0.5 mL de metanol. Para la determinación de fenoles, se utilizó el sobrenadante (macerado) de acuerdo con el método de

Folin y Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994). A 20 μ l del sobrenadante se agregaron 980.0 μ l de agua destilada y 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu, se agregaron 600.0 μ l de carbonato de sodio al 20% (p/v); se agitó, se dejó reposar 60 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic). Para la cuantificación se preparó una curva de calibración de ácido clorogénico de 0 a 500 ppm (Cuadro 4) y se reportó la concentración de mg fenoles totales/g peso fresco de tejido. Cabe mencionar que el análisis se realizó por triplicado.

Para la determinación de fenoles en tubérculo, se utilizaron trozos de la papa, se homogenizaron en metanol al 80 % (1 g de tejido por 10 ml del disolvente) y se dejaron reposar con una agitación continua durante 30 minutos. Los homogenados se pasaron a través de filtros Whatman No. 4, y posteriormente fueron centrifugados (SOL-BAT). El sobrenadante se utilizó para la determinación del contenido de fenoles con la misma técnica de Folin y Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994). Los resultados se analizaron estadísticamente en una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de rangos múltiples de Tukey.

Cuadro 4. Curva de calibración de ácido clorogénico (500 ppm).

Concentración (ppm)	Estándar (μL)	H₂O (μL)
0	0	20
50	2	18
100	4	16
200	8	12
300	12	8
400	16	4
500	20	0

3.4 Determinación de fitoalexinas en tubérculo

Para la determinación de fitoalexinas, se utilizó el tejido de tubérculo proveniente de los distintos tratamientos, el cual fue dividido en trozos y posteriormente fueron cubiertos con una mezcla de cloroformo: acetona: metanol (CAM) en una proporción 50, 5 y 45 %, respectivamente. Se siguió un tratamiento de 4°C durante 24 hrs; los homogenatos se filtraron y lavaron varias veces con CAM, se evaporaron por presión reducida hasta sequedad. Los residuos se resuspendieron en una mezcla de cloroformo: ácido acético 0,2 M (1:1), obteniendo dos fases, la fase clorofórmica inferior conteniendo las fitoalexinas y la acética superior. La fase inferior se evaporó por incubación a 40°C por 24 hrs y luego las fitoalexinas se disolvieron en 1 ml de ciclohexano y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se centrifugó a 1000 rpm (SOL-BAT). Se incubó por 10 min, y posteriormente se leyó absorbancia de la fase sulfúrica (inferior) en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic) a 500 nm. Se utilizó ácido sulfúrico concentrado como blanco (Andreu *et al.*, 2001). Los resultados se analizaron estadísticamente en una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de rangos múltiples de Tukey.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de expresión de genes

El estudio de la expresión génica se realizó a plantas de papa en dos tiempos de muestreo y tratadas con el producto BX-47 en dosis de 3 y 6 L/Ha, así como a los testigos de referencia tratados con ácido salicílico y ácido jasmónico. Previo al análisis, se llevó a cabo la selección de genes indicadores a partir de la información pública sobre el transcriptoma de plantas expuestas a patógenos y/o inductores (National Center for Biotechnology Information); los cuales fueron evaluados previamente para determinar las condiciones de amplificación.

Para la evaluación de la inducción de resistencia, se realizaron extracciones de ARN y posteriormente reacción de transcriptasa inversa para la formación de ADNc (ADN complementario). Esto permitió la detección de genes asociados a la resistencia en el cultivo de papa, utilizando los primers específicos para cada uno de los 9 genes (Cuadro 3). En cada una de las reacciones de amplificación por la técnica de PCR se corrió un control positivo (Factor de elongación), el cual es un componente esencial del aparato de translación eucariótico (Duckett and Kjer, 2003; Kim *et al.*, 2003a).

La primera aplicación de los tratamientos se realizó a los 20 días después de la germinación de la planta. En el primer muestreo el mejor tratamiento fue el T₂, tratamiento establecido como dosis alta (6 L/Ha) del producto BX-47. En todos los tratamientos se manifestaron los genes que participan en la expresión de proteínas de resistencia relacionadas con la patogenicidad (PR-1 y PR-2) (Van Loon, 1999); además de los genes que inducen la producción de las enzimas GLP-1 (relacionada con la reestructuración de la pared celular) (Ramos, 2007), y de la enzima GST

(glutación-S-transferasa), que está relacionada con el mecanismo de desintoxicación de la planta (Marrs, 1996). Se destacó la expresión del gen (AVIR) el cual se define como gen contra la respuesta ante el ataque viral (Hammond-Kosack *et al.*, 1998); en las muestras tratadas con el producto BX-47 en ambas dosis (Figura 3a y 3b) y en el tratamiento con ácido jasmónico (Figura 3d) Sin embargo, se observó que las bandas correspondientes al gen antiviral (pozo 7) cuando se aplicó el producto en ambas dosis (Figura 3a y 3b) presentaron mayor intensidad en comparación con la banda del tratamiento con ácido jasmónico; siendo más intensa en dosis alta.

Estos resultados evidencian que la aplicación del producto a base natural BX-47, modifica la expresión de genes al comparar los resultados del bandeo en el control absoluto (Figura 3e), induciendo la resistencia en la planta en ausencia de enfermedad.

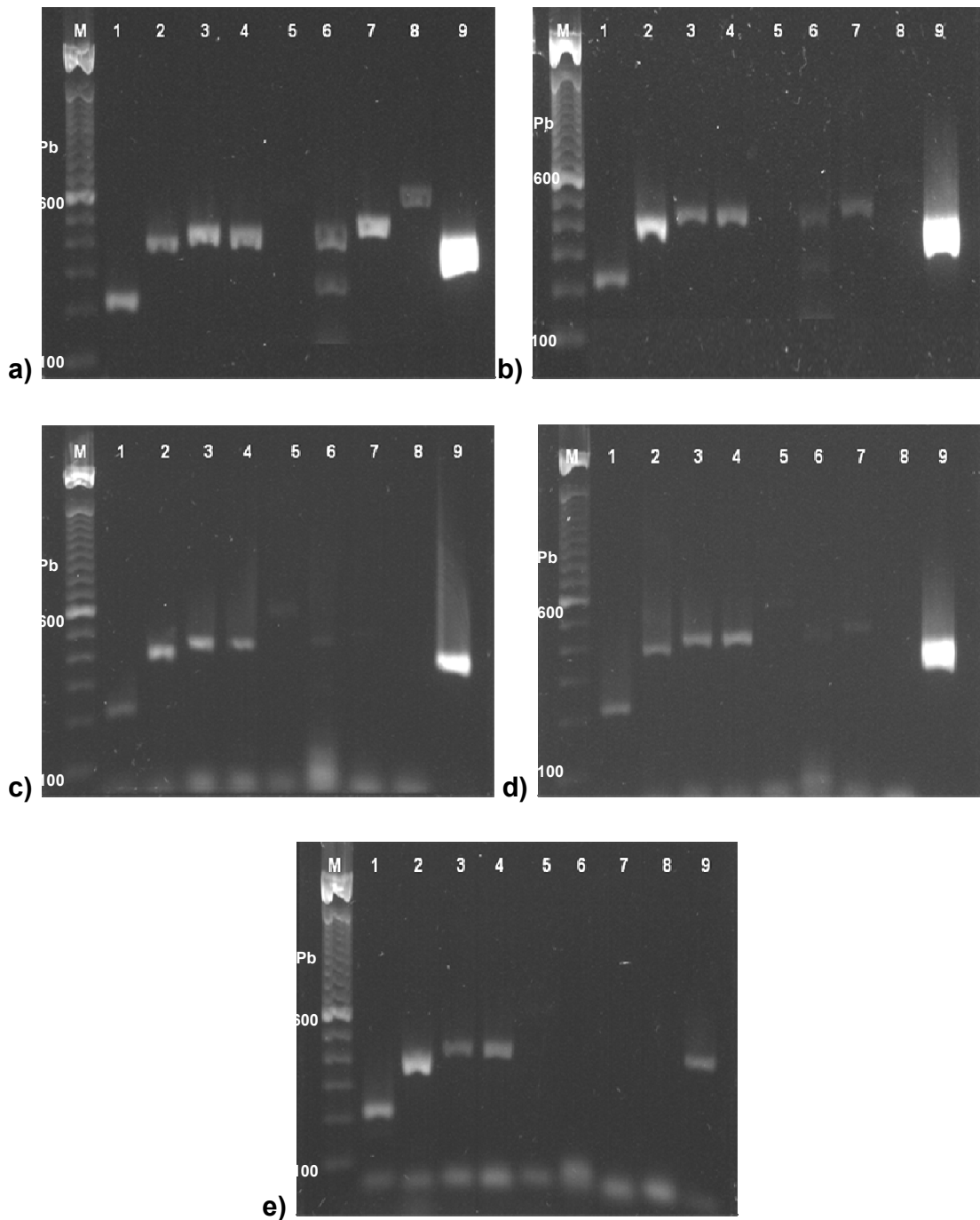


Figura 3. Expresión de genes en planta de papa en el Primer Muestreo en: a) BX-47 a Dosis alta, b) BX-47 a Dosis baja, c) Ác. Salicílico, d) Ác. Jasmónico, e) Control absoluto. M= marcador molecular. Pozo 1-9 genes de resistencia (1: PR1, 2: PR2, 3: GLP, 4: GST, 5: CHTB, 6: P17, 7: AVIR, 8: ARG, 9: EF1A).

Se realizó un segundo muestreo a los 35 días después de la germinación para evaluar el efecto de los tratamientos en la planta de papa. El muestreo se realizó a los 3 días de la aplicación de los tratamientos, con el objetivo de permitir la asimilación de los productos en la planta.

En el segundo muestreo los tratamientos T_1 y T_2 , dosis alta y baja, respectivamente (Figuras 4a y 4b), presentaron un comportamiento similar, ya que en los dos se expresaron los mismos genes relacionadas con la patogenicidad (PR-1 y PR-2), así como los genes que inducen la expresión de la enzima relacionada a la reestructuración de la pared celular (GLP), y la enzima relacionada con el mecanismo de desintoxicación de la planta GST (glutación-S-transferasa). Además se presentó bandeo que indicó la expresión del gen antiviral (AVIR), el cual se destacó por su presencia en los tratamientos con el producto BX-47 y en las moléculas inductoras de resistencia de referencia (ácido jasmónico y ácido salicílico). El tratamiento con ácido salicílico presentó un comportamiento similar al del producto BX-47 en ambas dosis; sin embargo, las bandas en los geles de los tratamientos con el producto BX-47 fueron más intensas para los genes antivirales (pozo 6 y 7), en comparación con el ácido salicílico (Figura 4c y 4d).

Los resultados de la expresión de genes demostraron que el mejor tratamiento del segundo muestreo fue el ácido jasmónico, ya que todos los genes estudiados se expresaron con bandeo intenso (Figura 4d). El comportamiento del control absoluto (Figura 4e) del segundo muestreo indicó que pudo presentarse estrés durante la etapa final del desarrollo de la prueba, ya que se manifestaron el gen antiviral (pozo 7) asociado con el ataque de patógenos virales y la arginasa (pozo 8), enzima que degrada la L-arginina en el intestino de los insectos herbívoros (Michigan State University Board of Trustees, East Lansing, 2009).

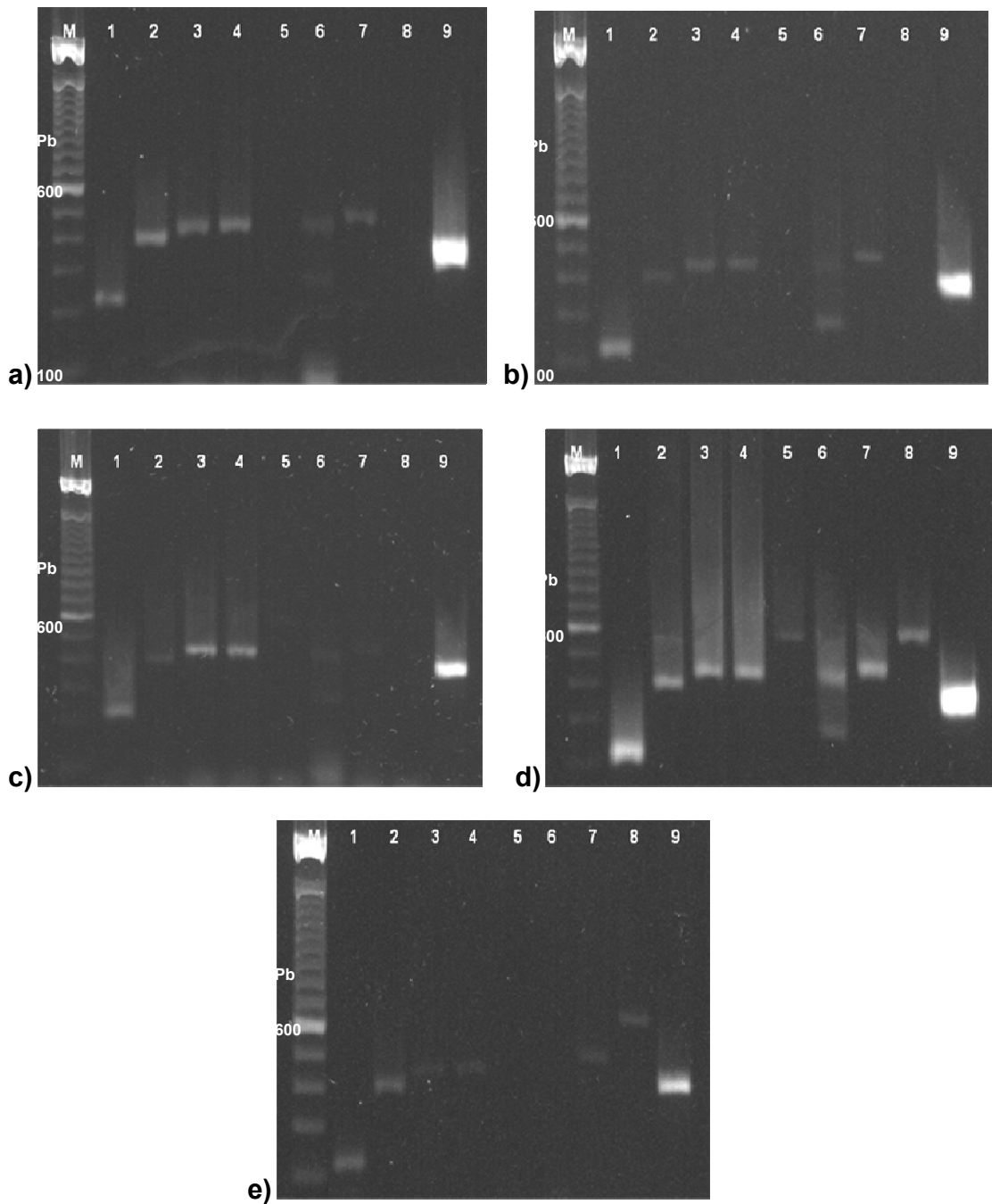


Figura 4. Expresión de genes en planta de papa en el Segundo Muestreo en: a) BX-47 a Dosis alta, b) BX-47 a Dosis baja, c) Ác. Salicílico, d) Ác. Jasmónico, e) Control absoluto. M= marcador molecular. Pozo 1-9 genes de resistencia (1: PR1, 2: PR2, 3: GLP, 4: GST, 5: CHTB, 6: P17, 7: AVIR, 8: ARG, 9: EF1A).

En el Cuadro 5 se presenta el resumen del perfil de expresión génica de los 5 distintos tratamientos en las dos fechas de muestreo. El tratamiento T₂ (dosis alta) presentó mayor expresión de genes que puede ser comparable con el perfil presentado por el ácido jasmónico, que fue evaluado como molécula inductora de referencia. Cabe señalar que los tratamientos con BX-47 presentaron mayor intensidad de bandeo en comparación de los demás tratamientos y del control absoluto. Con estos resultados, se comprobó que el producto BX-47 modificó la expresión de genes como indicativo de la resistencia inducida en la planta, al comparar su comportamiento con el del control absoluto.

El comportamiento del producto BX-47, pudiera ser comparable con los tratamientos químicos, tales como la aplicación del producto ácido DL-3-aminobutírico (BABA) y fosetyl-aluminium en el estudio realizado por Andreu *et al.*, (2006). En este estudio se comprobó el incremento de la resistencia sistémica adquirida (fitoalexinas, fenoles totales y enzimas hidrolíticas) por la aplicación de BABA y fosetyl-aluminium en plantas de papa con *Phytophthora infestans*. Además en cuanto al comportamiento de los controles positivos, en específico del ácido jasmónico que se mostró como el tratamiento de mejor inducción ya que se expresaron los 9 genes estudiados, este comportamiento puede ser comparado con el estudio donde se evaluó el transcriptoma de cis-jasmone en *Arabidopsis thaliana*, en el cual puede verse como un compuesto de señalización que participa en la modulación de la expresión de genes endógenos de plantas y la interacción planta-insecto realizado por C. Matthes *et al.*, (2010).

Cuadro 5. Comparación de la expresión de genes de resistencia en papa en el primer y segundo muestreo.

Tratamientos	T1		T2		T3		T4		T5	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1. PR-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2. PR-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3. GLP-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4. GST-1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
5. CHTB-1							X	X		
6. P17CA1	X	X	X	X	X	X	X	X		
7. AVIR-1	X	X	X	X		X	X	X		X
8. ARG	X		X					X		X
9. EF1A-3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

* T1= BX-47 a Dosis baja, T2= BX-47 a Dosis alta, T3 = Ác. salicílico, T4 = Ác. jasmónico y T5 = Control absoluto.

1 Primer muestreo; 2 Segundo muestreo

4.2 Determinación de fenoles totales en tubérculo

Los fenoles totales (FT) se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994) usando ácido clorogénico como estándar de referencia.

En la Figura 5. Se muestra el porcentaje de fenoles totales determinados en los tubérculos obtenidos de cada tratamiento al final de la prueba. Los resultados numéricos indican que hubo una mayor presencia de fenoles totales en los tratamientos de dosis baja y dosis alta (10.03 y 9.30 mg FT/g), pero estadísticamente no se presentó diferencia significativa con relación al control (9.29 mg FT/g) (Cuadro 6). Estos resultados demostraron que la aplicación del producto BX-47 en ambas dosis no afecta la calidad del tubérculo; ya que como lo reportaron Reyes and Cisneros-Zevallos (2003), el color oscuro de la pulpa del tubérculo puede estar relacionado con un incremento en la producción de fenoles totales.

Cuadro 6. Resultados de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha = 95\%$)

Categoría	Media estimada	Grupos
Dosis baja	4.593	A
Dosis alta	4.512	A
Control	4.499	A
Ac. Jasmónico	4.353	A
Ac. Salicílico	4.327	A

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes.

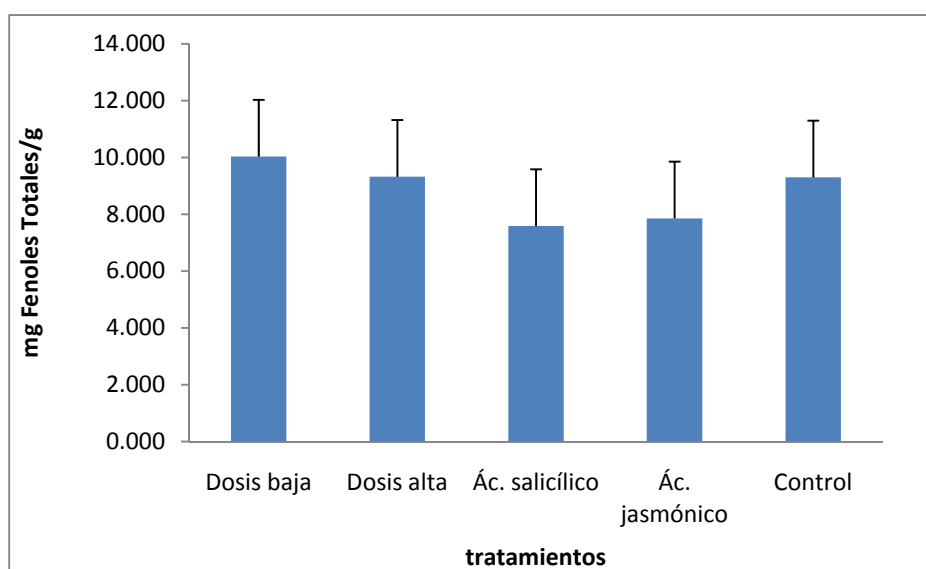


Figura 5. Determinación de Fenoles Totales en tubérculo.

4.3 Determinación de fenoles en tallo y hoja

La determinación de fenoles totales en tallo y hoja se realizó siguiendo el mismo método mencionado en el apartado 3.3. En la Figura 6 se muestran los resultados que indican que los tratamientos que presentaron la mayor cantidad de fenoles totales fueron: Dosis alta, Ácido salicílico y Ácido jasmónico (21.75, 16.96 y 15.42 mg FT/g, respectivamente). La prueba de medias de Tukey al 95% de confianza, demostró que el tratamiento Dosis alta del producto BX-47 presentó diferencia significativa en comparación de los demás tratamientos

(Cuadro 7), lo que indica que el producto induce la producción de fitoalexinas de naturaleza fenólica, sintetizadas por la vía de la fenilalanina. Estas fitoalexinas se encuentran relacionadas con la inactivación de las enzimas secretadas por hongos, bacterias (Arona y Wagle, 1985). Además se comprobó la estimulación de la síntesis de resistencia en las plantas tratadas con BX-47 en dosis alta.

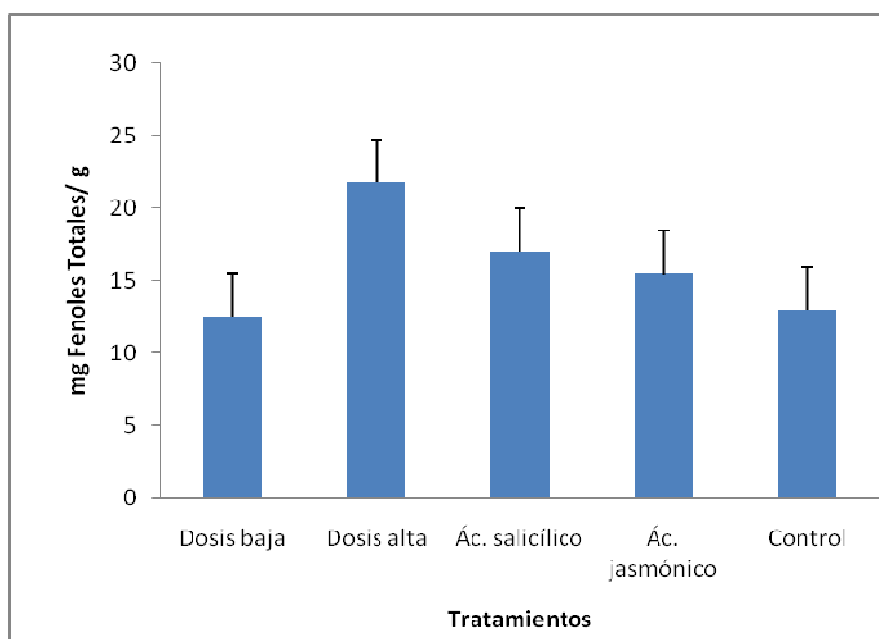


Figura 6. Determinación de Fenoles Totales en tallo y hoja.

Cuadro 7. Resultados de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha = 95\%$)

Categoría	Media estimada	Grupos
Dosis alta	217.583	A
Ac. Salicílico	169.667	A B
Ac. Jasmónico	154.250	A B
Control	128.972	B
Dosis baja	124.972	B

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes.

4.4 Determinación de fitoalexinas

Otros componentes de la resistencia como las fitoalexinas, las cuales poseen actividad antimicrobial, son sustancias reforzadoras de la pared celular que actúan como barrera física y son importantes en el desarrollo de la resistencia (Andreu, 2007).

La estimación de las fitoalexinas en todos los tratamientos (Dosis baja, Dosis alta, Ácido salicílico, Ácido jasmónico y Control absoluto), se realizó en el tubérculo desarrollado al final de la prueba utilizando el método espectrofotométrico desarrollado por Andreu *et al.*, (2001); y los datos obtenidos se utilizaron posteriormente para obtener de manera indirecta la concentración de fitoalexinas.

En la Figura 7 se muestra la concentración de fitoalexinas en los tubérculos al final de la prueba. El tratamiento que presentó numéricamente mayor presencia de fitoalexinas, fue el tratado con un inductor de resistencia de referencia, el ácido jasmónico. Este resultado está relacionado con lo reportado por Engelberth *et al.*, (2004), los cuales señalaron que la producción de diversas fitoalexinas, sustancias volátiles e inhibidores de proteínas son inducidas por la ruta del ácido jasmónico, como respuesta al ataque de insectos y patógenos necrotróficos (Beckers and Spoel, 2006). El análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa en relación a la producción de fitoalexinas cuando se aplicó el tratamiento BX-47, en ambas dosis, y el control absoluto. Sin embargo, para obtener resultados más específicos y cuantitativos sobre el efecto de la aplicación del producto BX-47 en la producción de moléculas de defensa, tales como fitoalexinas, es necesario realizar análisis más sensibles y específicos, tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Kozukue *et al.*, 2004), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Montero *et al.*, 2000), y electroforesis capilar (CE) (Gu *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos demostraron la presencia de fitoalexinas en cantidades basales en todos los tratamientos, tal como lo referencia Paxton (1981), las cuales podrían incrementar su acumulación dramáticamente después del ataque de un patógeno; sin embargo, este experimento se realizó en ausencia de patógeno.

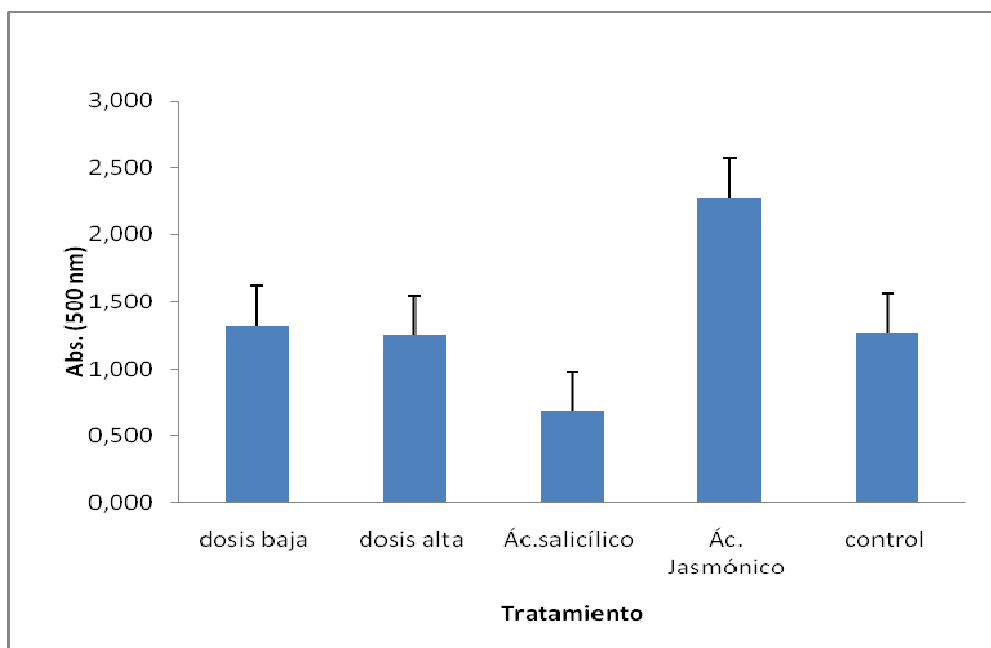


Figura 7. Determinación de fitoalexinas en tubérculo en el último muestreo.

El tratamiento que presentó menor cantidad de fitoalexinas fue el tratamiento con ácido salicílico, esto puede asumirse a la forma de asimilación de este inductor en la planta (Murphy *et al.*, 2001). Además de que, el ácido salicílico es el inductor de la resistencia sistémica adquirida (RSA), que se caracteriza por la síntesis de numerosas proteínas de defensa (Durrant *et al.*, 2004), a diferencia del jasmónico que es inductor de fitoalexinas y otras sustancias volátiles e inhibidores de proteínas (Engelberth *et al.*, 2004).

Por otro lado, cabe señalar que el producto BX-47 fue diseñado como un sistema de inducción de resistencia a la planta, en este estudio se realizaron pruebas para evaluar su potencial como inductor de las defensas en la planta

de papa en ausencia de enfermedad. La prueba de medias de Tukey al 95% de confianza, demostró diferencias significativas entre el ácido jasmónico que presentó mayor inducción en comparación de ácido salicílico, el resto de los tratamientos presentaron igualdad estadística (Cuadro 8). La técnica utilizada está diseñada para la detección de fitoalexinas de naturaleza triterpenoide; los resultados obtenidos indicaron que el producto BX-47 no indujo la producción de fitoalexinas triterpenoides, por el comportamiento similar obtenido en comparación con el control (Figura 7).

Cuadro 8. Resultados de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha = 95\%$)

Categoría	Media estimada	Grupos	
Ác. Jasmónico	0.792	A	
Dosis alta	0.203	A	B
Dosis baja	0.194	A	B
Control	0.003	A	B
Ác. Salicílico	-0.380		B

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes.

5. CONCLUSIONES

- Se comprobó que el producto BX-47 induce la expresión de genes relacionados con la defensa, cuando se aplicó en plantas de papa en dosis alta (6 L/Ha).

- Los resultados demuestran que el producto BX-47 estimuló la producción de metabolitos secundarios relacionados con la defensa.

- Los estudios realizados permiten generar herramientas que pueden ser utilizadas para el análisis temporal de la respuesta de defensa local y sistémica de diferentes cultivos de papa en respuesta al ataque de patógenos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology, fifth edition. Elsevier.
- Almeyda, I. H., Sánchez, A. J. y Garzón, A. J. 2008. Vectores causantes de punta morada de la papa en Coahuila y Nuevo León, México. Agricultura técnica en México, 34 (2), 141-150.
- Alonso, A. F. 1996. El cultivo de la patata. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España, 272.
- Andreu, A. B., M. Guevara., E, A, Wolski., G, R, Daleo and Daniel O, Caldiz. 2006. Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals.
- Andreu, A. B., Oliva, C., Huarte, M. and Daleo, G. 2001. Production of phytoalexins, glycoalcaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. Potato Research 44, 1-9.
- Andreu, B. 2007. Afitales en el Cultivo De Papa. Universidad Nacional de Mar del Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- Arce, F. A. 1996. El cultivo de la patata. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 145-172.
- Arona, K., and Wagle, D. S. 1985. Interrelationship between peroxidase, polyphenoloxidase activities and phenolic content of wheat for resistance to loose smut. Biochem. Physiol Pflanzen, 75-80.
- Arslan, A., Bessey, P. M., Matsuda, K. and Oebker, N.F. 1985. Physiological effects of psyllid (*Paratrioza cockerelli*) on potato. American potato Journal. P 9-22.

- Avilés, G. M. C., Garzón, T. J. A., Marín, J. A. y Caro, M. P. H. 2002. El psílido del tomate *Bactericera cockerelli* (Sucl): biología, ecología y su control. Memoria del Taller sobre *Bactericera cockerelli* Sulc. Como plaga y vector de fitoplasmas en hortalizas. Culiacán, Sinaloa, México, 23, 29 y 31.
- Bakan, B., A. C. Bily, D. Melcion, B. Cahagnier, C. Regnault- Roger, B. J. R. Philogene, and D. Richard-Molard. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. J. Agric. Food Chem. 51: 2826-2831.
- Baysal, O., Laux, P. and Zeller, W. 2002. Further studies on the induced resistance (IR) effect of plant extract from *Hedera helix* against fire blight (*Erwinia amylovora*). Acta Horticulturae 590, 273-277.
- Beckers, G. J. M. and Spoel, S. H. 2006. Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. Plant Biol Stuttg. 8, 1-10.
- Benner, J. P. 1993. Pesticida Science; Sussex, England; John Wiley and Son Limited 39, 95-102.
- C. Matthes et al., 2010 The transcriptome of cis-jasmone-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence.
- C. Montero, C., Bescós, B., Orea, J.M., González-Ureña, J.M. 2000. Rev. Anal. Chem. 19.
- Cadena, H. M. 1993. La punta morada de la papa en México: I. Incidencia y Búsqueda de Resistencia. Agrociencia, 247- 256.
- Cadena, H. M. y Galindo, J.A. 1985. Reducción de la Incidencia de la "Punta Morada de la Papa" por medio de fechas de siembras, genotipo de la planta y aplicaciones de insecticidas. Revista Mexicana de Fitopatología, 100-104.
- Cadena-Hinojosa, M. A. 1999. Potato purple top in Mexico: III. Effects of plant spacing and insecticide application. Revista Mexicana de Fitopatología, 91-96.

- Cortéz, M. R. y Hurtado, G. 2002. Guía técnica del cultivo de la papa. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, 26.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., and Lewis, N. G. 2000. Natural products (Secondary metabolites), 1250
- Cuypers, B., Schmelzer, E., and Hahlbroch, K. 1988. *In situ* localization of rapidly accumulated phenylalanine ammonia-Lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 1, 157-160.
- De Bach, P. 1974. Biological control by natural enemies. Cambridge University Press. London, 325 .
- Duckett, C.N. and Kjer, K. M. 2003. Cladistic analysis of the Oedionychines of Southern Brazil (Galerucinae: Alticini) based on two molecular markers. *In* Furth D.G. (ed.): Special Topics in Leaf Beetle Biology. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Chrysomelidae. Pensoft Publishers, Sofia, 117–132.
- Durrant, W. and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42, 185-209.
- Engelberth, J., Alborn, H. T., Schmelz, E. A. and Tumlinson, J. H. 2004. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1781-1785.
- Erler, F., Yegen, O. and Zeller, W. 2007. Field evaluation of a botanical natural product against the pear *Psylla Homoptera: psyllidae*. *Journal of Economic Entomology* 100, 66-71.

- Fiarro G., Garcia, M. and Marzachi, C. 2007. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in bioscience*, 1353-1375.
- Flint, M. L. y Roberts, P.A. 1989. Using crop diversity to manage pest problems, some California examples. *Am. J. Alt. Agric.* 3, 164-167.
- Flores, A. y Lira, R. H. 2008. Detección, diagnóstico y manejo de la enfermedad punta morada de la papa. Ediciones Parnaso.
- Flores, A., Alemán, N. y Notarios, Z. 2004. Alternativas para el manejo de la punta morada de la papa. En memorias simposio punta morada de la papa. Universidad Autónoma Agraria Narro. Buenavista Saltillo, Coahuila, 40-64.
- Galindo-Flores, H. 2008. Tesis: Resistencia inducida por micorrización en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ante *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*., 10
- Gallardo, C., L. Jiménez, and M-T. García-Conesa. 2006. Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chem.* 99: 455-463.
- García De La Rosa, J. y Flores Nava, A. 2003. Punta Morada de la Papa. Pfizer de México.
- García, Q. 1996. Etiología y Transmisión de oscurecimiento interno del tubérculo de la papa (*Solanum tuberosum*) para industria. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados. Montecillo, Estado de México, 65.
- Gharalari, A. H., Nansen, C., Lawson, D. S., Gilley, J., Munyaneza, J. E., and Vaughn, K. 2009. Knockdown mortality, repellency, and residual effects of insecticides for control of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae), *J. Econ. Entomol.* 102 (3), 1032-1038.
- Gu, X., Chub, Q., Dwyer, O. and Zece, M. 2000. *J. Chromatogr.* 881 (1-2), 471.

- Hammerschmidt, R. 1993. The nature and generation of systemic signals induced by pathogens, arthropod herbivores and wounds. *Advances in Plant Pathology* 10, 307-337.
- Hammond-Kosack, K. E., Tang, S., Harrison, K. and Jones, J. D. G. 1998. The tomato Cf-9 disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product Avr 9. *Plant Cell* 10: 1251–1266.
- Huaman, Z., Schmieliche, P. y Wissar, R. 1988. Los Recursos Genéticos de la Papa y su conservación en el centro internacional de la papa. Toluca Estado de México. 15-26 de agosto.
- Kim, D. O., O. K. Chun, Y. J. Kim, H. Y. Moon, and C. Y. Lee. 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 51 (22): 6509- 6515.
- Kim, S., Kjer, K. M. and Duckett, C. N. 2003a. Comparison between molecular and morphological-based phylogenies of galerucine/alticine leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Syst. Evol.* 34, 53–64.
- Kozukue, N., Han, J., Lee, K. and Friedman, M. 2004. Dehydrotomatine and a tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. *J Agric Food Chem* 52: 20792083.
- LEE I.-M., BOTTLNER K. D., MUNYANEZA J. E., SECOR G. A., GUDMESTAD N. C., 2004.- Clover proliferation group (16SrVI) subgroup A (16SrVI-A) phytoplasma is a probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon.- *Plant Disease*, 88: 429.
- Lia, W., Liefting, S., Bevan, R., Pennycook and Clover, G. 2009 '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', a liberibacter associated with plants in the family *Solanaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 208-214.

- Lozoya-Saldana, H., Sánchez-López, V., Román-Vázquez, R. y Hernández-Vilchis, A. 2002. Virosis en clones internacionales de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Valle de Toluca, México. *Agrociencia*, 93-102.
- Marrs, K.A. 1996. The functions and regulation of glutathione Stransferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 127–158
- Michigan State University Board of Trustees, East Lansing, 05011F: 2009. Use of Arginase in Plant Protection Against Herbivores.
- Moctezuma, R. C. y Sánchez, A. 2005. Epidemiología de hongos de suelo asociados al síntoma de punta morada en papa en México. *Boletín de la Papa* 6..
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M. and Buchman, L. J. 2009. Seasonal occurrence and abundance of the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, in South Central Washington. *American Journal of Potato Research* 86 (6), 513-518.
- Murphy, A. M., Gilliland, A., Wong, C. E., West, J., Singh, D.P. and Carr. J. P. 2001. Signal transduction in resistance to plant viruses. *European Journal of Plant Pathology*, 107-121.
- National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nicholls, C. L. y M. A. Altieri. 1997. Control biológico en agroecosistemas mediante el manejo de insectos entomófagos. *Agroecología y Desarrollo* 11/12, 31-42
- Niederhauser, J.S. y Cervantes, J. 1956. La papa como cultivo de temporal en los valles altos de México. Folleto de divulgación número 20, Oficina de Estudios Especiales, SAG.
- Paxton, J. D. 1981. Phytoalexins: a working redefenition. *Phytopathology Z.* 101:106-109.

- Quintero, S.R, Gioanetto, F., Chavéz, C. E y Bárcenas O. D. 2002. Curso Taller de Agricultura Orgánica. Universidad Autónoma de Chihuahua. CIDACOM, Chihuahua, Chihuahua, 227.
- Ramos, A. J. 2007. Análisis del silenciamiento génico mediante VIGS, de genes inducidos en *C. chinense* BG-3821 en presencia de geminivirus. Tesis de Maestría. ITC, Celaya.
- Reyes, L. F. and Cisneros-Zevallos, L. 2003. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L).
- Rocha, R.R. 1985. Guía para cultivar papa en el Bajío. SARH. Celaya, Guanajuato, México, 14.
- Rodríguez, H.C.1997. Insecticidas Vegetales y Agricultura Orgánica. Evento de aprobación en Certificación de Agricultura Orgánica. Colegio de posgraduados. Montecillo p 162-179.
- Rousselle, P., Robert, Y. y Crosnier, J.C. 1999. La patata. Ediciones Mundiprensa. México, 30.
- SAGARPA, 2002. Norma Mexicana. NOM-081-FITO-2001. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, 8.
- Salazar, L.F. 1996. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la papa (CIP), Lima Peru. 226p
- SARH, 1994. Norma oficial mexicana para la certificación de semilla de papa (proyecto), p 18.
- Secretaria de agricultura y recursos hidráulicos (SARH), "cultivos de hortalizas", INIFAP, Boletín técnico informativo, núm. 5, México, 1994.
- Tally, A., Oostendorp, M., Lawton, K., Staub, T. H. and Bassi, B. 2000. Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. *In* Induced plant

- defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture. Minnesota, USA, APS Press, 357-369.
- Van Etten, HD; Sandrock, RW; Wasmann, CC; Soby, SD; Mc Cluskey, K ; Wag, P. 1995 . Detoxification of phytoanticipins and phytoalexins by phytopathogenic fungi. Canadian Journal of Botany 73: 518-525.
- Van Loon, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European journal of plant pathology 103, 753-765.
- Van Loon, L.C., 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. *In*: Pathogenesis-related proteins in plants. Eds. S.K. Datta, S. Muthukrishnan, CRC Press LLC, Boca Raton, 1-19.
- Vargas-Madríz, H. 2010. Morfometría y table de vida de *Bactericera cockerelli* (Sulc) en dos variedades de jitomate en invernadero. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.
- Vavilov. 1951. The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants. Chronica Botanica 13,1-366.
- Von Rad, U., Mueller, M. J. and Durner, J. 2005. Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by mircoarray technology. New Phytologist 165, 191-202.
- Walters, D., Newton, A. and Lyon, G. 2007. Induced resistance for plant defense. A sustainable approach to crop protection. Blackwell Publishing.
- Waterman, P. G., and S. Mole. 1994. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 238.
- Wink, M. 1999. Introduction: Biochemistry, roles and biotechnology of secondary metabolites, 17.
- Zhaohui, Z., and M. H. Moghadasian. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. Food Chem. 109 (4): 691-702.