

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Análisis de Expresión de Genes Relacionados con La Resistencia al Estrés Biótico  
en Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Por:

**ELENA GUADALUPE GARCÍA ENCISO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Análisis de Expresión de Genes Relacionados con La Resistencia al Estrés Biótico  
en Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Por:

**ELENA GUADALUPE GARCÍA ENCISO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Asesor Principal Interno

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Susana González Morales  
Asesor Principal Externo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Flores Olivas  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ema Laura García Enciso  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Antonio González Fuentes  
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2020

## Agradecimientos

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por brindarme una formación académica

A la **Dra. Susana González Morales**. Por su asesoramiento, su enseñanza y guía. Gracias Dra. Por permitirme realizar este trabajo. Admiro su labor, paciencia y dedicación.

A la **Dra. Ema Laura García Enciso**: Por su asesoría, guiarme y enseñarme. Gracias por su paciencia, por mostrarme el valor de un trabajo realizado con calidad y esfuerzo.

Al **Dr. Alberto Flores Olivas** Por ser parte de mi comité de asesoría y sus aportaciones.

Al **Dr. Alberto Sandoval Rangel**: Por ser parte de mi comité de asesoría y sus aportaciones.

A la Empresa **Arysta LifeScience** ahora **UPL**, permitirme trabajar en este proyecto.

A mis amigos de generación: Dulce, Ivoón, Reyes y Juan Mayo.

## Dedicatoria

### A Dios

A mis padres: **Javier García y Paula Enciso**, a quienes admiro y agradezco su amor. Por ser mi ejemplo, por el cariño y la confianza que tienen en cada uno de nosotros. Gracias por ayudarnos a crecer y mejorar cada día.

A mis hermanos: **Gabriel, Gloria, Ema Laura y Paola**, Por su apoyo y cariño, gracias por cuidarme, por ser parte de mi ejemplo. Continué aprendiendo de ustedes, los quiero y admiro.

A mis Sobrinos: **Elizabeth, Michelle, Mateo y Mathías. Sandra** por su cariño y ser parte de nuestra familia.

A mis Abuelos: **Elena Ramírez, Guadalupe Rodríguez y Jesús Enciso**, por su cariño y cada bendición antes de despedirnos.

A **Fátima Martínez**: Por brindarme una familia lejos de casa, por su apoyo, cariño, paciencia y palabras de aliento.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>II</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Objetivo.....	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis.....	4
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
Importancia económica del tomate .....	5
Sistemas de producción en tomate .....	6
Estrés en plantas.....	7
Tipos de estrés.....	8
Estrés Biótico .....	9
Respuesta de defensa en las plantas .....	14
Sistema de defensa constitutivo o pasivo estructural .....	14
Sistema de defensa bioquímico constitutivo o pasivo .....	15
Sistema de defensa inducida .....	16
Sistemas de defensa estructurales inducidos o activos .....	17
Sistema de defensa bioquímico inducido o activo .....	17
Inducción de resistencia en plantas .....	19
Resistencia sistémica inducida (RSI).....	19
Resistencia sistémica adquirida .....	21
Elicitores .....	23
Expresión génica en eucariotas .....	26
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
Localización del sitio experimental.....	29
Material vegetal .....	29
Inoculación de FOL .....	31
Toma y almacenamiento de muestras .....	31
Extracción de ARN .....	32
Tratamiento con DNasa .....	33
Cuantificación de ARN .....	33
Calidad ARN.....	34
Síntesis de cDNA .....	35

Validación de genes.....	38
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
Rendimiento de ARN.....	41
Calidad de ARN.....	43
Validación de genes.....	48
Expresión del gen PR1.....	49
Ácido Jasmónico.....	55
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Descripción de los tratamientos aplicados.....	30
<b>Cuadro 2.</b> Programación del termociclador para la síntesis de cDNA de las muestras.....	35
<b>Cuadro 3.</b> Descripción de los iniciadores utilizados.....	36
<b>Cuadro 4.</b> Mezcla de reacción de PCR para la prueba de temperatura de anillamiento.....	37
<b>Cuadro 5.</b> Programa del termociclador para la prueba de temperatura de anillamiento de los iniciadores.....	37
<b>Cuadro 6.</b> Programación del termociclador para prueba qPCR para la cuantificación de la expresión de genes.....	39
<b>Cuadro 7.</b> Rendimiento de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 15 ddt.....	41
<b>Cuadro 8.</b> Rendimiento de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 57 ddt.....	42
<b>Cuadro 9.</b> Rendimiento de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 60 ddt.....	43
<b>Cuadro 10.</b> Parámetros utilizados para la cuantificación de genes PR1 y JA.....	47
<b>Cuadro 11 .</b> Resumen del análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 15 ddt.....	50
<b>Cuadro 12.</b> Resumen del análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 57 ddt.....	52
<b>Cuadro 13.</b> Resumen del análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 60 ddt.....	54
<b>Cuadro 14.</b> Resumen del análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 15 ddt.....	56
<b>Cuadro 15.</b> Resumen del análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 57 ddt.....	57
<b>Cuadro 16.</b> Resumen del análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 60 ddt.....	58

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principales países productores de tomate en el año 2017 (Participación porcentual) (FIRA 2019).....	5
<b>Figura 2.</b> Calendario de actividades de la prueba en plantas de tomate.....	32

<b>Figura 3.</b> Esquema de la metodología para el análisis de expresión génica.....	40
<b>Figura 4.</b> Análisis electroforético de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 15 ddt. ....	44
<b>Figura 5.</b> Análisis electroforético de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 57 ddt. ....	45
<b>Figura 6.</b> Análisis electroforético de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 60 ddt. ....	46
<b>Figura 7.</b> Prueba de temperaturas de anillamiento para los genes actina, PR1 y JA. ....	47
<b>Figura 8.</b> Curvas de fusión de productos de PCR. a) gen PR1, b) JA. ....	48
<b>Figura 9.</b> Curva relativa estándar para los genes PR1, JA y Actina. ....	49
<b>Figura 10.</b> Análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 15 ddt. ....	50
<b>Figura 11.</b> Análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 57 ddt. ....	52
<b>Figura 12.</b> Análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 60 ddt. ....	54
<b>Figura 13.</b> Análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 15 ddt. ....	56
<b>Figura 14.</b> Análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 57 ddt. ....	57
<b>Figura 15.</b> Análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 60 ddt. ....	58

## RESUMEN

Las plantas durante su crecimiento y desarrollo constantemente se encuentran expuestas a condiciones de estrés. Ante estas condiciones las plantas cuentan con diversas defensas que pueden ser constitutivas o inducibles con la finalidad de limitar y hacer frente al estrés. Se conocen tres tipos de respuestas de defensa en las plantas, en las cuales se encuentran la resistencia sistémica inducida (RSI), la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la resistencia mediada por ácido abscísico (ABA). Las fitohormonas ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ), han sido de relevancia, pues se sabe que el AS es el principal mediador de la RSA activando genes como PR1. Y la respuesta mediada por AJ se atribuye a la defensa de la RSI. El tiempo en generar la respuesta de defensa es esencial para lograr limitar la invasión y el daño de los diferentes patógenos y sus diferentes formas de ataque. Por lo tanto, se ha realizado la búsqueda e identificación de inductores capaces de activar la señalización de defensa, estos inductores son llamados elicitores.

El siguiente estudio tuvo como objetivo estudiar la expresión de genes relacionados con la resistencia al estrés biótico mediados por la vía del AS y AJ relacionados a la RSA y RSI, respectivamente, en una cinética de tiempo, a través de la inoculación de *Fusarium oxysporum* (FOL) y la aplicación de dos elicitores. Los tratamientos evaluados fueron: (FOL) inoculación con FOL, (E1) inoculación con FOL más la aplicación del elicitor 1. (E2) inoculación con FOL más la aplicación del elicitor 2 y (TA) tratamiento testigo absoluto. La expresión de genes se evaluó a los 15, 57 y 60 ddt (días después de trasplante). La aplicación de los elicitores activó la expresión de los genes, así como también la inoculación con FOL. La mayor expresión del gen PR1 a los 15 y 57 ddt se presentó en el tratamiento E2 (9.39 y 27.07 veces más que el TA), a los 60 ddt el tratamiento FOL presentó la mayor expresión (8.04 veces más que el TA). La mayor expresión del gen JA a los 15 ddt se presentó en el tratamiento E2 (0.38 veces más que el TA) y a los 57 y 60 ddt el tratamiento FOL fue el de mayor expresión (6.48 y 23.69 veces más que el TA). La aplicación del elicitor E2 (extracto natural) sobreexpresó el gen PR1 activando el sistema de defensa de la RSA.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate es de suma importancia tanto a nivel nacional como internacional, en México en el 2017 la producción de tomate fue de 3.47 millones de toneladas, según Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA 2019).

La producción de tomate en México se realiza principalmente bajo dos sistemas de producción, a cielo abierto y bajo invernaderos. El sistema implementado influye fuertemente en el rendimiento de la producción. En invernadero la producción ofrece grandes ventajas debido a que permite minimizar los daños por fenómenos meteorológicos, sin embargo, no solo el sistema implementando influirá sobre la producción, por otro lado, la presencia y presión de factores bióticos y abióticos también es de gran importancia en el éxito del sistema de producción (De Alba et al. 2015; Torres 2017).

Al conjunto de factores tanto abióticos como bióticos que afectan los cultivos y que tienen efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas, se le conoce como estrés, ya que son condiciones no óptimas para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Squeo y Cademil 2007).

El estrés puede dividirse en abiótico y biótico, el primero se manifiesta debido a factores como la luz, la radiación, bajas y altas temperaturas, altas condiciones de salinidad, pH etc. De forma opuesta el estrés biótico se manifiesta por acción de seres vivos como nematodos, insectos, bacterias y hongos (Benavides 2002).

Uno de los hongos de mayor importancia que afecta los cultivos es *Fusarium oxysporum*, ya que se conocen más de 78 especies, además de tener una amplia distribución geográfica y efectos devastadores en los cultivos logrando reducir la producción o en casos extremos tener pérdidas totales (Torres 2000).

En el cultivo de tomate *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) es un hongo responsable de causar la enfermedad de la marchitez vascular, considerada una de las más devastadoras, ocasionando pérdidas mayores del 50%, además que

su control se ve limitado debido a las pocas opciones para su manejo y las razas presentes de FOL cada vez más agresivas (Norvinyeku et al. 2019).

Las plantas cuentan con diferentes mecanismos de defensa para enfrentarse a los diversos tipos de estrés, este tipo de defensa se puede dividir en: defensa pasiva y defensa activa. La defensa pasiva actúa como la primera línea de defensa, donde se encuentra la defensa preexistente buscando evitar la entrada o la invasión de organismos patogénicos, se encuentra conformada por defensas estructurales y bioquímicas (Agrios 2005).

La defensa activa, recibe el nombre debido a que es necesario la interacción de un estímulo hacia la planta, para que manifieste una respuesta de defensa, debido al reconocimiento esta puede activar sus defensas estructurales o bioquímicas (Dotor y Cabezas 2014).

En la defensa activa bioquímica destacan dos mecanismos de defensa llamados resistencia sistémica inducida (RSI) y resistencia sistémica adquirida (RSA) (Camarena y De La Torre 2007; Samaniego et al. 2017).

La RSA es un mecanismo de defensa reconocido por actuar sobre el estrés de tipo biótico, actúa sobre una amplia gama de organismos y realiza una defensa localizada que luego se extiende al resto de la planta y puede mantenerse activa. Es necesario el estímulo de moléculas llamadas elicitores para dar inicio a este sistema controlado por vías de señalización, que activaran la expresión de genes de defensa por los cuales se llevara la síntesis de proteínas relacionadas a la patogenicidad (Li et al. 2019a).

Se ha determinado que fitohormonas como el ácido jasmónico, el etileno y el ácido salicílico desempeñan un papel importante en la respuesta de defensa de las planta mediante la resistencia sistémica (Laredo et al. 2017).

La restricción del uso de fungicidas convencionales y la resistencia que ocasiona por el uso indiscriminado de estos productos contribuyen a la limitación de opciones para el control de FOL, por lo tanto el uso de la activación de mecanismos

de resistencia sistémicos es una prometedora alternativa para su control (Akkopru y Demir 2005).

## **Objetivo**

Estudiar la expresión de genes relacionados con la resistencia al estrés biótico (*Fusarium oxysporum*) en plantas de tomate.

## **Objetivos específicos**

1. Analizar la expresión de genes relacionados con la resistencia sistémica adquirida (vía ácido salicílico) en plantas de tomate en una cinética de tiempo.
2. Analizar la expresión de genes relacionados con la resistencia sistémica inducida (vía ácido jasmónico) en plantas de tomate en una cinética de tiempo.

## **Hipótesis**

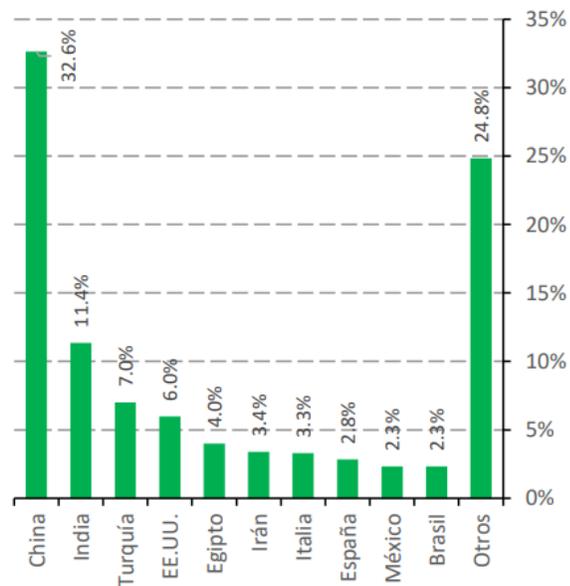
Las plantas de tomate bajo estrés biótico por *Fusarium oxysporum* y con la aplicación de elicitores causará una expresión diferencial de los genes relacionados con la resistencia al estrés biótico.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Importancia económica del tomate

El tomate es una hortaliza de suma importancia a nivel mundial, debido a su elevada aportación alimenticia, ya que posee una mezcla de minerales, vitamina C y E, carotenos y flavonoides (Luna y Delgado 2014).

A nivel mundial ocupó el primer lugar en la producción de hortalizas en el año 2017. En este mismo año China fue el primer país productor de tomate, seguido por la India y Estados Unidos, México se encontró posicionado en el noveno lugar obteniendo una producción aproximada de 2.3 millones de toneladas (Figura 1) (FIRA 2019).



**Figura 1.** Principales países productores de tomate en el año 2017 (Participación porcentual) (FIRA 2019).

En el año 2017, se registró una comercialización de 7.3 millones de toneladas de tomate rojo, donde México para este mismo año se posicionó en el primer lugar como exportador, con una cantidad de 1.7 millones de toneladas (SAGARPA, 2017; CIMA 2019).

De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en México en el mes de febrero de 2018, la producción de tomate fue de 3 millones 186 mil toneladas, obteniendo un incremento del 8% en contraste de lo que se obtuvo en el mes de febrero del año 2017, con la cosecha acumulada en una superficie de casi 48 mil hectáreas (SIAP, 2018).

Los precios de esta hortaliza en el mercado nacional difieren significativamente respecto a las variedades de tomate, durante el año del 2015 las variedades saladette y bola, producidos bajo un sistema de cielo abierto registraron en promedio de \$5,245 y \$3,685 pesos por tonelada respectivamente, sin embargo los precios del tomate no solo difieren en la variedad, si no también bajo el sistema de producción, dichas variedades obtuvieron incrementos del 29 y 44% respectivamente por tonelada en el mismo año, bajo un sistema de producción en invernadero (FIRA 2016).

### **Sistemas de producción en tomate**

En México la agricultura protegida ha contribuido significativamente a la producción de alimentos, de tal forma que en los últimos años este sistema se ha desarrollado en forma acelerada, permitiendo obtener productos de calidad para mercado nacional como de exportación (López et al., 2011).

La agricultura protegida es un sistema de producción llevado a cabo a partir de estructuras con la finalidad de proteger los cultivos, buscando minimizar los efectos que imponen los fenómenos climáticos, por lo que es considerado un sistema tecnológico que permite mejorar las condiciones para el desarrollo de las plantas (Moreno et al., 2011), obteniendo como resultado un incremento en la productividad,

calidad de la cosecha, así como una oportunidad en el mercado, por mencionar algunas de sus múltiples ventajas.

Entre las principales especies cultivadas bajo este sistema se encuentra principalmente hortalizas como tomate, pimiento morrón, melón, pepino, lechuga y plantas ornamentales.

En México para el año 2014, bajo este sistema se logró cosechar a 350 toneladas por hectárea en el cultivo de tomate, para el mismo año bajo un sistema de cielo abierto se cosechó aproximadamente de 30 a 40 toneladas por hectárea.

La producción de tomate se verá influenciada sobre los sistemas de producción aplicados así como el manejo del cultivo frente a factores ambientales adversos, debido al gran impacto que tienen sobre las fases de desarrollo del cultivo, estos diferentes factores son conocidos como estrés (Santiago y Borrego 2016).

### **Estrés en plantas**

Larcher en 1995 define al estrés como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida. Condiciones responsables de ocasionar cambios en todos los niveles funcionales de los organismos. Por lo tanto, en el estado fisiológico de las plantas el estrés se podría explicar como un conjunto de respuestas químicas o fisiológicas estableciendo un estado del organismo diferente al observado bajo en condiciones óptimas (Basurto et al. 2008).

Una planta en condiciones óptimas presentaría un estrés 0, esto implicaría que todos los factores donde se desarrolla serían los ideales, lo cual sería improbable por las condiciones en las que se desarrolla la planta (Schulze et al. 2002). Ya que las plantas cultivadas en alguna fase de su desarrollo se verán sometidas a distintos tipos de estrés ya sea por un factor ambiental biótico o abiótico afectando negativamente al organismo, sin embargo, la desviación de algún factor óptimo no implica un estrés, ya que el estrés es la limitación o fluctuación impuesta al organismo ocasionando lesiones, enfermedades o una fisiología inusual en la planta,

viéndose expuestas a algunas tensiones como: bajas y altas temperaturas, sequía, salinidad, estrés oxidativo, toxicidad de metales pesados y estrés biótico durante su desarrollo (Jaleel et al. 2009). Incluso cuando el cultivo se desarrolla bajo un sistema de producción de agricultura protegida se presenta el estrés abiótico y biótico disminuyendo su producción (Febres 2019).

## **Tipos de estrés**

Diversos agentes o factores son los que inducen el estrés en las plantas, por lo tanto, dichos factores son categorizados en dos grandes grupos de estrés: abiótico y biótico.

Estos grupos son categorizados de acuerdo al agente causante del estrés (Larcher 2003), es decir el estrés abiótico es aquel ocasionado por factores físicos – químicos, entre ellos se encuentran el estrés hídrico, por alta y baja temperatura, alta y baja irradiación, por alta y baja radiación ultravioleta (UV), estrés por salinidad, por encharcamiento (anaerobiosis), por toxicidad de metales pesados así como por deficiencias nutricionales (Tambussi 2004).

Tales estímulos ambientales no favorables para la planta han sido responsables de grandes pérdidas para la agricultura en todo el mundo, debido a la limitante de recursos en la actualidad a nivel mundial; la falta de recursos hídricos y el constante incremento de salinización en el agua como en los suelos, han representado ser el estrés de mayor importancia dentro del estrés abiótico (Vinocur y Altman 2005).

Dichas condiciones causan restricciones en el rendimiento y la productividad de la planta, consecuentemente siendo responsables de pérdidas agrícolas representadas económicamente de \$ 14-19 millones aproximadamente cada año en todo el mundo (Martínez et al; 2018).

Estas pérdidas en el rendimiento son resultado a que cuando la planta se encuentra sometida a un estrés hídrico, la excesiva evaporación inhibirá la

fotosíntesis y se verá limitada la función estomática viéndose afectado el crecimiento de la planta (Brodrigg y Holbrook 2003). Un ejemplo de ello es lo ocurrido bajo condiciones de estrés salino, viéndose reducida la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de proteínas (perturba los ácidos nucleicos), también disminuirá la absorción de elementos como: K, Mg, Ca y consecuente causara la inhibición de crecimiento y desarrollo de los cultivos (Sairam et al. 2002).

### **Estrés Biótico**

El estrés biótico es causado por la acción de otros seres vivos: animales, (herbívoros; vertebrados e invertebrados), otras plantas (por competencia, alelopatía, parasitas, etc.), y microorganismos fitopatógenos como nematodos, bacterias, virus y hongos (Montoliu 2010).

Dichos organismos se encuentren dentro o fuera de las plantas, viven de ellas para poder obtener su alimento, reproducirse o desarrollarse. Generalmente en la etapa de inoculación estos organismos entran en contacto con el hospedero ya sea por penetración directa por medio de estructuras especializadas para realizar dicha acción o indirectamente por aberturas naturales (estomas, hidátodos, lenticelas, nectarios), incluso por heridas.

A continuación, ocurre la etapa de infección en la cual el patógeno se encuentra en contacto con las células del hospedero o tejidos susceptibles del mismo. Los patógenos se alimentan, se reproducen o se desarrollan de su hospedero causando una invasión (Agrios 2005).

Como consecuencia se provocarán alteraciones en las funciones sistémicas en la planta, limitando el desarrollo y crecimiento. En algunos casos puede llegar a ocasionar la muerte de la planta, dependiendo de la severidad y patogenicidad del organismo.

Los principales agentes que causan estrés biótico en el cultivo de tomate son:

*Bactericera cockerelli*: Este insecto es responsable de causar dos tipos de daños, el daño directo se ve relacionado a las ninfas ya que estas inyectan toxinas cuando se alimentan de la planta ocasionando un amarillamiento en las hojas, mientras que el daño indirecto, está relacionado con la transmisión de fitoplasmas ocasionando en cultivo la enfermedad del permanente de tomate asociada a *Candidatus Liberibacter solanacearum* (OIRSA 2015).

Mosca Blanca: *Bemisia tabaci* causa un daño directo debido a que se alimenta del floema de la planta y un daño indirecto debido a que se considera que es transmisor del virus del rizado amarillo (TYLCV), que afecta el rendimiento de la planta como la calidad de los frutos (Basu 1995).

Por otro lado, larvas del orden lepidóptero son responsables de causar severos daños en la planta de tomate, principalmente organismos del género *Heliothis*, *Helicoperva*, *Spodoptera* y *Tuta*, ya sea porque algunas especies se alimentan de tejidos vegetales como brotes, ramas y hojas, siendo o no específicos en etapas fenológicas dependiendo de la especie, de tal manera que logran ocasionar severos daños a la planta, además de afectar significativamente la calidad del fruto (Urretabizkaya et al. 2010).

Las bacterias fitopatógenas en las plantas de tomate ocasionan síntomas vasculares como pudriciones, marchitez y finalizan con el colapso, para este caso, algunas de las responsables son *Clavibacter michiganensis* y *Ralstonia solanacearum*. También pueden provocar síntomas foliares como manchas, pústulas o lesiones superficiales como lo hace *Pseudomas syringae* y *Xhantomonas vesicatoria* (Cai et al. 2019; Morcillo et al. 2019).

Los hongos fitopatógenos son organismos que en su mayoría pasan parte de su ciclo biológico en las plantas, ya que estas les sirven como hospedero. Diferentes hongos son los que crecen en las plantas de tomate causando un estrés en las mismas y con ello ocasionando altas perdidas en rendimiento y calidad del cultivo (Martinez et al. 2016). Su reproducción puede ser de forma sexual y asexual, por

medio de esporas o fragmentos de los mismos, su supervivencia se ve afectada por las condiciones del ambiente como la temperatura y humedad.

Dentro de los agentes fungosos responsables de las grandes pérdidas se encuentran:

*Phytophthora infestans* es responsable de ocasionar en el cultivo de tomate la enfermedad conocida como tizón tardío, es una enfermedad devastadora por el gran impacto que tiene sobre el cultivo, debido a que logra infectar a toda la parte aérea de la planta. Su sintomatología inicia en los bordes de las hojas creando un aspecto de color verde – oscuro que cambiará a una tonalidad café conforme la infección de la enfermedad esté avanzando. Este hongo se desarrolla en condiciones en una temperatura óptima de un rango de 18 a 22°C y a una humedad relativa de 91 a 100% (Cardona et al. 2016).

*Alternaria solani* es responsable de causar la enfermedad llamada tizón temprano, afecta de manera significativa al cultivo del tomate como de la papa. Los conidios y micelios se pueden encontrar en el suelo, así como en residuos del cultivo para después en las condiciones ideales afectar la parte aérea de las plantas, la temperatura ideal para el desarrollo del hongo es alrededor de 15 a 28°C y de una humedad relativa superior al 90%. Se producen lesiones en las hojas de una coloración negra a un negro parduzco, es visible la formación de anillos de color amarillo. Conforme avanza la severidad de síntomas en el área foliar, se puede llegar a ocasionar la defoliación de la planta. En el fruto también puede presentar un daño considerable, principalmente en el cáliz, además puede notarse de una lesión hundida, la cual se puede presentar incluso en el almacenaje del fruto (Soto 2017).

La antracnosis es producida por los hongos del género *Colletotrichum*, los cuales afectan a diversos cultivos entre ellos el tomate. Tienen la capacidad de infectar hojas, tallos, frutos y raíces, estas últimas se verán altamente dañadas. En los frutos puede estar presente pero sus daños se mostrarán cuando este se encuentre maduro, se puede observar una lesión circular ligeramente inmersa con la formación de anillos. En la parte foliar se mostrarán lesiones de coloración café

rodeadas de halos amarillos. En las raíces afectadas se muestra una coloración marrón en conjunto de micro esclerocios en las partes superficiales, este síntoma es conocido como podredumbre negra de raíz (Blancard et al. 2011).

La marchitez causada por *Fusarium* se considera una enfermedad de importancia mundial, debido a la severidad y por la deficiencia de acciones para poder contrarrestar su infección (Vásquez y Castaño 2017).

### ***Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (marchitez vascular)**

Dentro de los factores que limitan el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomate se encuentran los agentes infecciosos, lo cuales son responsables de ocasionar importantes enfermedades en el cultivo afectando sus rendimientos y su rentabilidad, en su mayoría estas enfermedades son ocasionadas por hongos (Martinez et al. 2016).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) es el agente patógeno responsable de ocasionar la marchitez vascular en el cultivo de tomate, la enfermedad fue reportada por primera vez en Inglaterra en 1895 (Millas y France 2017), y fue considerada una de las enfermedades de mayor importancia, debido a lo devastadora que puede llegar a ser.

Se considera que puede llegar a ocasionar pérdidas a un porcentaje mayor al 50% (Apodaca et al. 2004) y estas pérdidas pueden ser ocasionadas en los diferentes sistemas de producción de tomate, afectando el cultivo a campo abierto, en invernaderos y cultivos hidropónicos (García 2012).

FOL al pertenecer al grupo de *Fusarium oxysporum* cumple con las característica de esta comunidad al ser un hongo que se trasmite por el suelo (Turlier et al. 1994).

Es un organismo hemibiotrófico con la capacidad de sobrevivir durante largos periodos en la materia orgánica que se encuentra en el suelo o en la rizosfera de algunas plantas (Núñez 2011). El hongo produce tres tipos de esporas distintas:

microconidias, macroconidias y clamidosporas (Cardona y Castaño 2019). Katan, Shlevin y Katan (1977) atribuyen que las macroconidias son estructuras relacionadas a la diseminación aérea en las plantas, Sin embargo, las clamidosporas también representan ser estructuras de suma importancia debido a que son responsables de dar la habilidad de supervivencia al hongo por un largo tiempo (Torres 2000).

Estas estructuras se forman a partir de una transformación de las células de las hifas o de las células conidiales, con el atributo de tener paredes extremadamente gruesas, teniendo la capacidad de resistencia a condiciones desfavorables en el medio ambiente en el que se encuentren, incluso a la falta de un hospedero. Cuando se encuentran en condiciones que le favorecen comienza la germinación del hongo (Hutson y Smith 1980; Torres 2000).

En la actualidad, se reconoce que la enfermedad corresponde a tres tipos de razas: 1, 2 y 3 que son distinguidas por su grado de virulencia ante las variedades de tomate que infectan, lo cual ocasiona que su manejo se considere extremadamente difícil (Lagopodi et al; 2001).

Cuando comienza la aparición de los síntomas causados por FOL, el principal síntoma de la enfermedad se observa en las hojas, es notable la presencia de una clorosis principalmente en las hojas más viejas de la planta (Cárdenas, 2000). Posteriormente las lesiones comienzan a oscurecerse y terminan secándose, así continua la infección en el resto de la planta, amarillando el resto de las hojas, presentando en algunas ocasiones una clorosis que se observa en un solo lado de las hojas o de un solo lado de la planta (Vásquez *et al* 2017).

En ocasiones se puede observar un oscurecimiento en la zona cercana al peciolo, sin embargo, en la misma hoja al lado opuesto no se observan síntomas de marchitez (Sánchez, 1998).

En el tallo como en los peciolos se muestra una necrosis, al realizar un corte transversal es notable un anillamiento color café extendiéndose al resto de la planta, dicho síntoma dependerá de la severidad de la enfermedad en la planta.

## **Respuesta de defensa en las plantas**

Durante el crecimiento y desarrollo de la planta, continuamente se verá afectada de factores exteriores o debido a la presencia de organismos patogénicos que se encuentran en el medio ambiente en que estas se desarrollan. A pesar de ello en ocasiones las plantas logran mantener un equilibrio y mostrarse sanas, dado a que las plantas por sí mismas tienen la capacidad de defenderse, ya que disponen de mecanismos de defensa, lo que les brinda la habilidad de contrarrestar, obstaculizar o detener el ataque de organismos patógenos (Mittler et al. 1997; Ruz et al. 2004).

El mecanismo de defensa constitutivo o preexistente, que se caracteriza por ser la primera línea de defensa, se ubica generalmente en la superficie de la planta, ésta defensa se encuentra de forma permanente de manera que estos mecanismos están activos en todo el ciclo biológico de la planta (Guest y Brown 1997; Agrios 2005).

### **Sistema de defensa constitutivo o pasivo estructural**

Pertencientes a este grupo se encuentran las defensas estructurales, las cuales desempeñan la función de barrera a la entrada de patógenos, entre estas estructuras destacan las ceras cuticulares, cutícula, estomas, tricomas y algunas células especializadas como la esclerénquima y lignificada (Riveros, 2010).

La primera línea de defensa desempeña un papel importante debido a que el patógeno tiene que penetrar a la planta para iniciar con la fase de infección. El grosor de la cutícula puede presentar una resistencia a aquellos organismos que necesitan penetrar directamente a través de ella, de igual manera la cantidad de la cera cuticular y la calidad de la misma, debido a que tiene una reacción de tipo hidrófoba, por lo tanto, no permite la acumulación de agua en la superficie de la planta y disminuirá o evitará ofrecer las condiciones ideales para el desarrollo de agentes fitopatógenos como hongos y bacterias (Serrano et al. 2014).

Sin embargo, es importante mencionar que esto dependerá de una especie de plantas a otras. La dificultad de la entrada de los organismos también se verá afecta

por la conformación de las células especializadas; es decir, células de tipo esclerénquima darán como resultado paredes más gruesas, así como células lignificadas (Vandana et al. 2019).

Algunos organismos patogénicos usan aberturas naturales para lograr penetrar a la planta e iniciar su fase de infección. La forma y el tamaño de estomas y lenticelas pueden interactuar para dificultar o de forma opuesta facilitar la entrada, esto debido a que si se mantienen abiertas y se encuentra una película de agua facilitará la entrada de bacterias. Sin embargo, éstas se pueden mantener cerradas en cierto tiempo para evitar la entrada de organismos no benéficos (Preuss Da Cruz et al. 2019).

### **Sistema de defensa bioquímico constitutivo o pasivo**

En la defensa pasiva, además de su defensa estructural se une el grupo de la defensa bioquímica preexistente, debido a que las plantas de manera natural en su ambiente constantemente liberan exudados a través de sus diferentes órganos. Dichas sustancias pueden estar almacenadas o encontrarse de manera activa.

Se habla de compuestos tóxicos para organismos patógenos, un ejemplo de estos compuestos son los péptidos y las proteínas, reconocidos por actuar contra organismos invasores, principalmente por su efecto antimicrobiano (Pelegri y Franco, 2005), en esta categoría también se incluyen a algunos metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos que produce la planta, no tienen una función primaria en el crecimiento y desarrollo de las mismas, más sin embargo, desempeñan un papel importante en la defensa (Wianowska y Gil 2019).

Estos pueden estar clasificados en cuatro grupos: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides. Por sus diversas funciones en la defensa pueden interactuar en la defensa preexistente cuando se encuentran almacenados en los diferentes

órganos, pero en la interacción de la planta con patógenos pueden producir mayores concentraciones y de algunas sustancias en específico como las fitoalexinas, que destacaran por su rol en la defensa inducida (Pérez y Ávalos 2009).

En sus funciones de forma general, estos compuestos se caracterizan por funcionar como antimicrobianos y como antifúngicos (Verpoorte et al. 1999).

### **Sistema de defensa inducida**

El mecanismo de defensa inducida, opuesto al constitutivo, actúa en relación del reconocimiento del patógeno por la planta. Por lo tanto, en este mecanismo es necesario cambios claros en el metabolismo consecuente a la expresión diferencial de genes. Este mecanismo actúa en la intervención de reconocimiento específico, a través de ello la planta es capaz de reconocer la presencia del patógeno (Hutcheson 1998).

Dangl y Jones (2001) plantean que esta red de señales otorga la activación de toda una batería de mecanismos de defensa; en las que se incluye desde barreras físicas y bioquímicas, con la finalidad de activar sustancias y compuestos tóxicos, buscando inhibir la penetración, infección y colonización del organismo patógeno en la planta.

Para activar este mecanismo de defensa algunas sustancias como carbohidratos, proteínas y pequeñas moléculas son responsables de interactuar como inductores de defensa (Hutcheson 1998).

La inducción de la reacción de defensa de una manera específica ha sido observada en las interacciones del tipo raza-cultivar, donde el proceso de reconocimiento del patógeno por parte de la planta parece estar determinado por genes correspondientes y presentes tanto en el patógeno como en la planta.

## **Sistemas de defensa estructurales inducidos o activos**

Los mecanismos preexistentes ayudan a evitar y retardar la entrada o la proliferación de los agentes patogénicos, sin embargo, es posible que logren burlar dichos mecanismos de defensa, por lo cual, la planta para contrarrestar el ataque, se ve obligada a inducir otros mecanismos de defensa, las respuestas estructurales forman tejidos para la defensa y son llamadas estructuras histológicas de defensa (Horsfall 2012).

En la estructura histológica de defensa se encuentran la formación de capas de corcho, donde, a partir de la infección de los patógenos, se lleva a cabo la formación de varias capas de células, con el propósito de evitar la invasión del agente a otras células, además de inhibir las sustancias producidas por el patógeno, privando al organismo de nutrientes y agua, limitando de nutrición al patógeno (Agrios 2005).

Otras estructuras de este mismo tipo son la formación de capas de abscisión que se forma en las células foliares, se trata de la formación de dos capas alrededor del foco de infección donde gradualmente esta zona se secará hasta llegar a la muerte, al finalizar ésta caerá junto al invasor (Maâtaoui et al. 1990).

En los vasos xilemáticos, la formación de las estructuras de defensa es por medio de la formación de tálides, donde ocurre una formación excesiva de protoplastos en la célula del parénquima, de esta manera las formaciones se encontrarán dirigidas hacia el centro de los vasos, donde se obstruirá parcial o completamente el transporte del patógeno a través de los vasos. También se conoce el depósito de sustancias gomosas formando una barrera impermeable a los patógenos (Hutson y Smith 1980).

## **Sistema de defensa bioquímico inducido o activo**

Con el propósito de contrarrestar la invasión, la defensa bioquímica inducida producirá condiciones adversas para los organismos fitopatógenos. Puede iniciar de

manera local y dependiendo del tipo de respuesta puede asignarse una defensa en la totalidad de la planta (Garcion et al. 2014).

La formación de compuestos fenólicos se mantiene presente en la planta cuando inicia la interacción planta-patógeno o ante algunos factores de estrés abiótico como altas radiaciones, cambios de temperatura o heridas (González et al. 2017).

Las fitoalexinas comienzan a sintetizarse en las células sanas cercanas a las células dañadas, cuando su acumulación es abundante trabajarán para poder inhibir al invasor. Son conocidas por actuar como sustancias tóxicas para bacterias, nematodos, hongos entre otros (García y Pérez 2003). Pueden ser reprimidas por sustancias formuladas por los patógenos, ocasionando un resultado no favorable (Ahuja et al. 2012)

La respuesta hipersensible en las plantas funciona para limitar la invasión por patógenos, las plantas en sus diferentes mecanismos activos muestran la muerte celular programada, ésta actúa después de un reconocimiento específico de moléculas asociadas a patógenos también conocidas como (Avr), para después desencadenar una respuesta de hipersensibilidad (HR). La respuesta es local, aumentando la respiración, dando lugar a la oxidación y alta acumulaciones de compuestos fenólicos. Las células infectadas presentan una sintomatología necrótica, de tal forma que los organismos patogénicos se verán limitados para continuar la infección. Este mecanismo de respuesta protege a las células cercanas que se encuentren sanas, con el inconveniente de sacrificar células del hospedero (Del Pozo y Lam 1998).

Además de las respuestas de defensa mencionadas, las plantas cuentan con mecanismos de defensa sumamente complejos y especializados, donde es indispensable la interacción de factores externos para la estimulación de respuesta de defensas y así dar aviso que la planta está siendo atacada dando respuesta a la resistencia sistémica inducida y adquirida (Ryals et al. 1996b)

## **Inducción de resistencia en plantas**

Como se ha mencionado anteriormente, las plantas han desarrollado diversas formas de defensa, desde las barreras estructurales, mecanismos bioquímicos y algunos más complejos como la activación de defensas. A lo largo de los años se han estudiado los mecanismos de defensa como la resistencia sistémica inducida y la resistencia sistémica adquirida. Gracias a herramientas tecnológicas, bioquímicas y genómicas, en los últimos años fue posible el desarrollo de distintas metodologías para llevar a cabo el conocimiento de genes que son responsables de codificar y activar los reguladores de resistencia para la tolerancia de enfermedades y el proceso que se lleva a cabo durante la activación de las defensas (Li et al. 2019b).

### **Resistencia sistémica inducida (RSI)**

La RSI es un tipo de defensa activa y requiere una estimulación para ser activada y dar respuesta en su señalización. De forma general se conoce que la activación de la RSI es activada principalmente por cepas bacterianas correspondientes a rizobacterias, las cuales se desarrollan en el suelo colonizando las raíces de las plantas. De tal forma que se ha tratado de estimular la RSI por medio de distintos géneros de rizobacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum* y *Azotobacter* (Ochoa et al. 2010; Pieterse et al. 2014).

Estos inductores conformados por compuestos bacterianos como de flagelos, restos de la pared celular y metabolitos que serán responsables de desencadenar de manera prolongada una inmunidad a ciertos organismos que generan daños en las plantas, esto dependiendo estrechamente de una interacción de la relación del reconocimiento de bacterias y la planta huésped (Kloepper et al. 2004).

En este proceso se manifiesta de manera significativa con la interacción del etileno y ácido jasmónico, cuando se encuentra acumulación de estas moléculas dará lugar a una respuesta de defensa.

El etileno (ET) es un compuesto químico orgánico, su estructura química se caracteriza por la unión de dos carbonos en un doble enlace ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), y pertenece a la familia de los hidrocarburos insaturados.

El ET se produce de forma natural en las plantas, y forma parte del grupo de las fitohormonas, estas son moléculas que son sintetizadas por las plantas y son responsables de regular algunos procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas (Evans 1984). Esta molécula puede ser producida en cualquier parte de la planta, su efecto en procesos fisiológicos es efectuando la maduración de los frutos, en la senescencia de los órganos, participa en la tigmomorfogénesis, estimula la germinación y promueve la floración. Por otra parte, este también desempeña un rol importante en la RSI al ser activada su ruta de señalización.

Los receptores de ET logran activar las quinasas, por lo tanto, esta señal será transmitida al gen de Et-2 (*EIN2*) dando lugar a la transcripción de respuesta de *ERF1*, responsable de responder al ataque de patógenos por medio de la regulación de genes (Lorenzo et al. 2003).

Las vías de señalización de ácido jasmónico (AJ) y ET pueden ser activadas por un inductor de tipo abiótico, en contraste al ácido salicílico (AS), que generalmente es activado por inductores de tipo biótico. Así mismo, el AS está altamente relacionado con la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) en cambio AJ y ET no lo están (Xu et al. 1994).

El AJ es una fitohormona que interviene en la senescencia y la defensa en plantas, pertenece al grupo de los jasmonatos y correspondiente a los octadecanoides, la cual es derivada de lípidos presentes en el desarrollo y respuesta de estrés. Se ha mostrado que bajo estrés el AJ interacciona en dicho suceso aumentando sus niveles endógenos en las plantas. Esta reacción puede ser desencadenada por la infección de organismos fitopatógenos necrotrofos, infestación de herbívoros o daños mecánicos (Koo y Howe 2009).

La biosíntesis de AJ, llamada ruta de los octadecanoides inicia en los cloroplastos por la liberación mediada por la enzima lipasa de ácido  $\alpha$ -linolénico ( $\alpha$ -

LeA) de galactolípidos<sup>1</sup>. Teniendo lugar principalmente en las hojas de las plantas, pero puede sintetizarse en toda la planta (Wasternack y Hause 2019).

En la ruta de señalización de AJ se encuentran dos ramificaciones las cuales son antagónicas en la regulación transcripcional. Estas ramificaciones corresponden a MYC. La cual puede llegar a ser activada durante la alimentación de herbívoros debido al daño ocasionado. Y la rama ERF la cual es activada por medio de una infección de patógenos necrotróficos (Chico et al. 2008).

Los factores de transcripción de ERF activaran a genes regulados por AJ, para la expresión de la rama ERF es necesario la actividad conjunta de las vías de señalización de AJ y ET (Wasternack y Hause 2013).

### **Resistencia sistémica adquirida**

La resistencia sistémica adquirida (RSA) es una defensa inducida (Walters et al. 2013) y actúa como respuesta de resistencia por parte de la planta hacia el patógeno. Tiene como objetivo proteger y contrarrestar el ataque de este, por lo tanto su mecanismo inicia de manera local y luego será extendido al resto de la planta otorgando inmunidad, además puede proteger de un ataque secundario (Ryals et al. 1996a; Camarena y De La Torre 2007).

La RSA es un tipo de defensa con una reconocida función sobre el estrés biótico, actuando contra una amplia gama de patógenos al ser activada y permanecer así durante un largo plazo, otorgando una respuesta a la planta para que pueda protegerse ante patógenos e insectos. Esto debido a que activa proteínas responsables de regular la expresión de genes para la defensa (Díaz et al. 2018).

No obstante, en la actualidad se reconoce que la RSA puede ser estimulada por la infección de organismos patógenos, sino también por la interacción de agentes no patogénicos, organismos simbiotes y saprófitos, por metabolitos microbianos, incluso por inductores de tipo abiótico, lo que permite estimular a la planta para su

defensa contra patógenos, este tipo de moléculas son llamadas elicitores (Conrath 2006a).

El ácido salicílico (AS) es un compuesto fenólico que se manifiesta ampliamente en las plantas, esta molécula es de importancia dentro de la agricultura debido a sus propiedades y a la participación en diferentes procesos fenológicos de las plantas.

Desempeña un papel importante en la termogénesis, la apertura y cierre de estomas, sobre la inducción de floración, desarrollo de raíz y en la absorción de nutrimentos, así como a la tolerancia de sequía y en la resistencia de enfermedades. Aunque su interacción en estos procesos puede ser de forma directa o indirecta (Squeo y Cademil 2007; Alcántara et al. 2019).

En el cultivo de tomate, se propone su uso debido a que es un biorregulador importante ya que se le atribuye participar para obtener altos rendimientos, el incremento de fenoles y antioxidantes (Vázquez et al. 2016).

Además de sus beneficios como hormona vegetal, el AS desempeña un papel importante en la RSA, puesto que, como otras moléculas como el AJ, ET y el ácido abscísico tienen una función de transductor de señales. El AS se caracteriza por ejercer como un regulador principal en la expresión de genes altamente relacionados con la respuesta al estrés biótico de las plantas (Ding et al. 2018).

En diferentes estudios se reveló que la concentración del AS se encuentra estrechamente relacionada con la inducción de la RSA. Puesto que dicha molécula desempeña un papel importante para la activación de las vías de señalización mediante la proteína PR-1 (NPR1) (Li et al. 2019a).

NPR1 se sitúa en el citoplasma y cuando se encuentra presente el AS, NPR1 se monomeriza de tal forma que puede transportarse para concentrarse en el núcleo, en donde NPR1 promoverá la concentración de diversos factores de tipo transcripción que corresponderán a promotores del AA, así como el ordenamiento de la expresión de genes PR (Castelló et al. 2018).

La interacción del AS con las diferentes hormonas y sus rutas de señalización es complejo, debido a que conllevan una participación estrecha en la defensa de las plantas causada por estrés de tipo biótico o abiótico, ya sea que estas diferentes hormonas trabajen en conjunto o totalmente de manera opuesta siendo unas antagonistas de otras (Rangel Sánchez et al. 2010).

De manera general se considera que el AS participa de manera primaria ante el ataque de patógenos de tipo de biotróficos y hemibiotróficos. Y ante al ataque de organismos necróticos se considera que se tiende a tener una respuesta principal de AJ y ET (Bigeard et al. 2015).

## **Elicitores**

Los elicitores o moléculas señalizadoras, desarrollan un papel importante para la protección de las plantas contra una amplia gama de patógenos, ya que tienen la capacidad de desencadenar mecanismos defensivos en las plantas. Se pueden clasificar en tres grupos: Bióticos, abióticos y hormonas vegetales (Nürnbergger et al. 2004; Sabater 2013).

Los elicitores bióticos son producidos de forma natural por organismos. Como ejemplo son los polisacáridos que componen la pectina y la celulosa; lipolisacaridos, quitina, oligosacáridos, extractos de levaduras, proteínas, además de los compuestos de las estructuras de los organismos patogénicos como esporas, micelio de hongos o la pared microbiana (Enríquez et al. 2010). Entre ellos pueden destacarse los que están considerados como los patrones moleculares asociados, es decir compuestos que se encuentran asociados a microbios (MAP) y que son liberados por organismos benéficos, como rizobacterias (PGPR) y hongos (PGPF) promotores de crecimiento de las plantas.

Los elicitores de naturaleza abiótica pueden responder a estímulos de factores ambientales; radiación UV, temperaturas extremas, estrés por salinidad, y estrés por sequía. Las sustancias que trabajan como elicitores para estos estímulos pueden ser

las sales orgánicas como el cloruro de calcio, sulfato de cobre, cloruro de mercurio, algunos productos químicos como el ácido acético, el silicio, selenio etc. (Castellanos et al. 2009; Castaño Monsalve et al. 2015; Rivera 2015).

Dentro de las hormonas vegetales que cumplen la función como elicitores destacan el ácido jasmónico, metil jasmonato, ácido salicílico, metil salicilato, etilenos, citocininas y giberelinas (Angelova et al. 2006).

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMs) son liberados por los propios agentes patógenos. Las plantas por sí mismas cuentan con patrones moleculares endógenos los cuales se encuentran asociados al daño o al peligro (DAMP) (Castro y García 2009).

Dentro de la membrana celular se lleva a cabo el reconocimiento de los patrones moleculares (PAMP, DAMs, entre otros). Ya que en ella se encuentran los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los PRR al detectar los patrones asociados, inician la acumulación de proteínas de estos y son responsables de iniciar una respuesta al ser reconocidos. Iniciando la activación de cascadas de respuestas con la función de defensa (Ojito y Portal 2010; Zipfel 2014).

Los PRR al ser activados, liberan la quinasa, la cual activa a los factores de transcripción, los cuales viajan hasta llegar al núcleo para poder desencadenar la programación de la transcripción de genes de respuesta. Por lo tanto, los PRR están basados en mecanismos de señalización para iniciar la respuesta de defensa. Donde puede dar inicio a diferentes reacciones como el incremento de flujo de  $Ca^{2+}$ , la activación de ROS, genes de defensa, producción de compuestos antimicrobianos o la activación de cascadas de MAPKs (Jones y Dangl 2006).

Cuando se efectúa la respuesta de defensa de estos elementos, se produce una respuesta de hipersensibilidad, con la finalidad de interrumpir el crecimiento, reproducción o la invasión del patógeno generando una muerte celular localizada, resultado de una interacción incompatible de un patógeno avirulento – planta resistente (Chern et al. 2005).

De forma opuesta cuando se establece una interacción compatible de un patógeno virulento – planta susceptible. La planta por medio de otros tipos de mecanismos logra percibir a los organismos invasivos, como lo son el reconocimiento de evocadores; el cual consiste en el reconocimiento por parte de la planta ante exudados y compuestos químicos, por ejemplo, oligosacáridos, glicoproteínas, lípidos y proteínas de patrón exógeno o endógeno. Sin embargo, este mecanismo a pesar de lograr una resistencia, no es de tipo específico (Bray Speth et al. 2007).

Otro tipo de mecanismo es el modelo gen por gen, este tipo de mecanismo es sumamente específico, en el cual la interacción es de un producto codificado de un gen avirulento y un producto codificado por un gen de resistencia (Keen 1990; Van Der Biezen y Jones 1998).

Las MAPKs son proteínas específicas durante la señalización en células eucarióticas, responsables de realizar la transducción de los estímulos reconocidos por los PRR, aunque para lograr ser activados influyen elementos secundarios. Siendo imprescindible reacciones de fosforilación, de tal forma que la MAPK puede fosforilar las proteínas de forma directa. Siendo la fosforilación del sustrato efectuándose en el citoplasma o en el núcleo. Esta señalización será responsable de la expresión de genes para la defensa de la planta, además de amplificar la inducción de resistencia (Morrison 2012; Chen et al. 2019).

En los estudios realizados para el conocimiento del desarrollo de la RSA se ha definido que durante la transducción de señales por reguladores específicos inicia una acumulación de proteínas de tipo PR, por medio del AS (Spoel 2019).

En respuesta al reconocimiento del patógeno se encuentra la acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), que son responsables de liberar moléculas, también inducen la defensa de la planta. Las PR se encuentran en el espacio intracelular como en las vacuolas. Dentro de ellas se consideran diez, las cuales están divididas en cinco grupos principales: PR1, PR2, PR3, PR4, PR5 (Sels et al. 2008).

La concentración de una proteína PR en específico dependerá de la especie, es decir en especies como *Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicum* la proteína PR1 es la más abundante.

### **Expresión génica en eucariotas**

Las eucariotas se caracterizan por poseer un núcleo definido del cual en su interior contiene el material genético del organismo, por otra parte, en las procariotas su material genético se encuentra disperso en el citoplasma (Pettinari 2010).

En los organismos eucariontes los genes comprenden un sistema sumamente complejo, donde la organización y la regulación tratan de una actividad muy organizada (Cabrejos et al. 2001).

La regulación génica juega un papel importante en este punto, ya que esta responde a la forma en que la célula lleva el control sobre que gen estará activo. Sin embargo, son diversos los factores que pueden interactuar para la activación de genes en las células. La expresión génica puede ser influenciada por medio de dos condiciones de información, la interna y exterior. En la primera será heredada de la célula madre. En la exterior corresponderá por medio de señales químicas o físicas de otras células (Lugo y Trijillo 2009; Pierce 2009).

La expresión de genes consiste en una serie de pasos; iniciando por la accesibilidad a la cromatina (Targa 2002). La cromatina es responsable de compactar al ADN y ordenarlo de tal forma que este pueda integrar al núcleo de la célula (Martínez Frías 2010). Después se iniciara la transcripción, el cual es un proceso clave para poder llegar posteriormente a la producción de proteínas, dicho proceso sucede por medio de la síntesis de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) dado a partir de ADN, es decir se transcribe una secuencia de ADN de un gen a una molécula de ARN. Esto contribuye a que si un gen es transcrito es posible sea usado para formar una proteína (Gómez 2009).

Durante el proceso de transcripción están implicados los factores de transcripción, estos son proteínas que se encargan de unirse a secuencias de ADN específicas, regulando la expresión génica en el núcleo. Estas proteínas pueden estimular o reprimir al unirse a regiones promotoras específicas incluso pueden activar o desactivar vías de señalización (García et al. 2013).

A pesar que la transcripción es un paso importante para la expresión génica, esta dependerá también de otras fases como el procesamiento de ARN (Burdisso 2013).

Posteriormente de la transcripción, se obtendrá un ARNm primario, por lo que requiere pasar por ciertas modificaciones para poder transformarse en un ARNm maduro (Frechtel 2005).

El ARNm pasa por un proceso de corte y empalme alternativo, debido a que el ADN está conformado por exones (parte codificante del ADN) y de intrones, estos últimos no son capaces de codificar la proteína. De tal forma que se eliminan los intrones, lo que permite usar diferentes fracciones de exones, permitiendo hacer el ARNm maduro (Ramírez et al. 2013).

El ARNm sale del núcleo, buscando poder ser traducido, sin embargo, esto dependerá de otros factores como su afinidad con el proceso de traducción, así como el tiempo que pasa la molécula de ARNm en el citosol. En los diferentes ARN se han encontrado unos con la capacidad de silenciar genes, por ejemplo los microARNs, éstos desarrollan un papel importante en reducir la expresión de genes blancos (Ambros 2004).

La viabilidad del ARNm, así como su estabilidad es importante para poder iniciar con la traducción. La traducción es la etapa donde el ARNm es traducido para así poder formar una proteína (Molero y Utate 2020).

La forma en que el ARN es decodificado por las células es por codones, un codón es la secuencia de tres nucleótidos, dando 64 posibilidades y en su mayoría estos corresponden a un aminoácido específico de 20 que de forma general se encuentran en las proteínas. Por lo tanto, la secuencia de codones podrá determinar

el orden de los aminoácidos de las proteínas. Como codón de inicio es AUG y servirá para señalar el comienzo la formación de la proteína (Pierce 2009).

El código genético son las instrucciones de cómo se formará una proteína, debido a que a partir de los nucleótidos que conforman el ARNm será traducido a los aminoácidos que conformaran una proteína específica. Los nucleótidos están compuestos de cuatro bases nitrogenadas: citosina (C), adenina (A), uracilo (U) y guanina (G) en ARN. Para ADN se encuentra: citosina (C), adenina (A), timina (T) y guanina (G) (Martínez Frías 2010; Herráez 2012).

El avance en la ciencia y la tecnología ha permitido que se conozca el código genético de las plantas, los procesos y mecanismos que la planta realiza para crecer, desarrollarse y defenderse en el medio en que se desarrolla, el entendimiento y uso de esta información ha permitido lograr un incremento de los rendimientos en los cultivos al dar herramientas de manejo ante las diferentes condiciones de estrés que se presentan en las plantas.

Además, de que a través de los años se han realizado diversos estudios para controlar el estrés biótico en las plantas, debido a que el uso convencional de plaguicidas de un modo irracional ha tenido efectos sobre el medio ambiente y la salud humana, así mismo el aumento de la resistencia de plagas y enfermedades. Sin embargo, para algunos casos como en FOL los recursos para su control son limitados. En la búsqueda de otras alternativas se encuentra la aplicación de elicitores exógenos que han mostrado ser efectivos para activación de defensa de las plantas mediante la expresión de genes (García et al. 2018).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Localización del sitio experimental

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Departamento de Horticultura ubicado dentro del campus de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, situada en Buenavista, Saltillo, Coahuila. Con coordenadas 25°21'21.6" de latitud norte y 101°02'10.3" longitud oeste con una altura de 1742 msnm.

La investigación fue dividida en dos etapas para su realización. La primera etapa del estudio consistió en la instalación del experimento en el invernadero para la obtención del material vegetal. La segunda etapa consistió en la realización del análisis de expresión génica.

## Etapa 1

### Material vegetal

La primera etapa de este experimento fue realizada en un invernadero tipo túnel de mediana tecnología, perteneciente al Departamento de Horticultura, en el cual se llevó a cabo la siembra de semillas de tomate de la variedad Rio grande en charolas de 200 cavidades. El llenado de las charolas se implementó usando sustrato tipo peat-moss en combinación del sustrato perlita, tal mezcla tuvo una relación de 1:1 (v/v). Se colocó una semilla por cavidad y las charolas se dejaron en la cámara bioclimática para su germinación con una temperatura de 23°C y un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad. A los 25 días después fueron trasladadas al invernadero para su acondicionamiento y posterior trasplante a bolsas negras de polietileno de 10 L con mezcla de peat moss- perlita (1:1 v/v). La nutrición fue provista a través de una solución Steiner (Steiner 1984), de acuerdo a la etapa fenológica.

## Descripción de los tratamientos

El estudio consistió en la evaluación de cuatro tratamientos designados de la siguiente manera: Testigo absoluto (TA), que fueron plantas crecidas bajo condiciones normales; testigo de FOL (FOL), plantas inoculadas con el patógeno *F. oxysporum*; Elicitor 1 (E1), plantas inoculadas con FOL y tratadas con un elicitor formulado a partir de extractos de algas. Elicitor 2 (E2), plantas inoculadas con FOL y la aplicación de un elicitor a base de extractos de plantas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Descripción de los tratamientos aplicados.

Nombre del tratamiento	Descripción
TA	Testigo absoluto
E1	Extracto de algas + inoculación con FOL
E2	Extracto de plantas + inoculación con FOL
FOL	Inoculación con FOL

La aplicación de los elicitores se realizó a los 7 y 14 días después del trasplante (ddt) (previo a la inoculación del patógeno) y a los 56 ddt (posterior a la inoculación del patógeno) para lo cual dichos elicitores se prepararon en solución acuosa y fueron asperjados a las hojas de las plantas.

Las dosis usadas fueron de 3.75 mL L<sup>-1</sup> para E1 y de 1.5 mL L<sup>-1</sup> para E2, los productos evaluados son formulaciones prototipo de la empresa Arysta LifeScience y las dosis aplicadas son las recomendadas por la empresa.

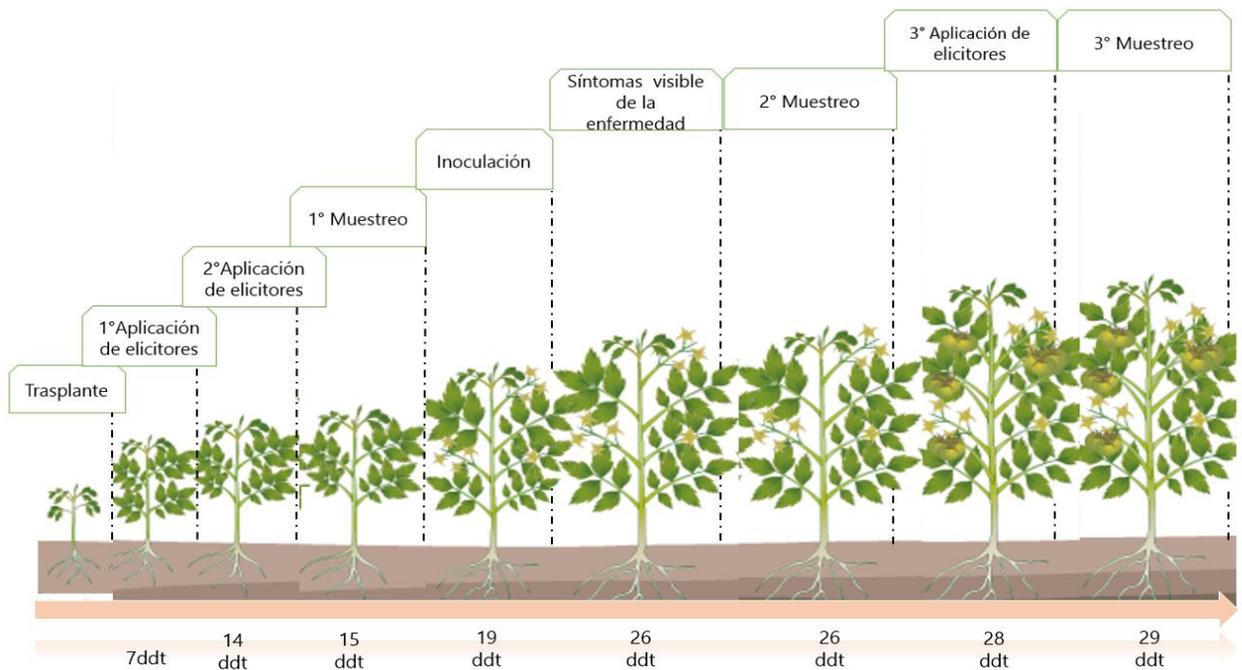
## **Inoculación de FOL**

La cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se aisló de raíces de plantas de tomate con síntomas de marchitez vascular. El aislado se propagó en medio sólido papa dextrosa agar (PDA) y se dejó crecer por 10 días. Para la obtención del inóculo se llevó a cabo la reproducción del patógeno en cultivo sumergido, usando como medio de cultivo el medio papa dextrosa. La inoculación del medio se realizó tomando con un asa un poco del crecimiento del hongo del medio sólido. El medio inoculado se colocó en un agitador orbital a una temperatura de 28°C, agitación de 200 rpm y sin presencia de luz. Después de 14 días de que se inoculó el medio se determinó la concentración de esporas usando una cámara de Neubauer. La concentración de esporas se estandarizó en  $1 \times 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup>. Posteriormente el inóculo se llevó al invernadero, donde se realizaron heridas a las raíces de las plantas con ayuda de unas tijeras. Se midieron 50 mL del inóculo y se agregaron sobre el sustrato. La inoculación del patógeno se realizó a los 19 ddt.

## **Toma y almacenamiento de muestras**

La colecta de muestras fue una actividad esencial para poder continuar con la segunda etapa del estudio, la toma de muestra se realizó tomando tejido foliar de la tercera hoja fisiológicamente madura debajo del ápice, llevándose a cabo con el uso de guantes.

Previamente fueron elaborados sobres de aluminio, rotulados con datos sobre el tratamiento, repetición y número de muestreo, en donde fueron colocadas las muestras. Enseguida de tomar cada muestra, el sobre fue colocado en nitrógeno líquido. Al término de la colecta, las muestras fueron llevadas a almacenar al ultra congelador (-80°C) hasta su procesamiento. Las muestras fueron colectadas a los 15 ddt (24 hrs después de la segunda aplicación de los elicitores), 57 ddt (cuando las plantas presentaron síntomas claros de la marchitez por FOL) y a los 59 ddt (24 hrs posteriores a la tercera aplicación de los elicitores) (Figura2). Finalizando la fase 1, del experimento, e iniciando la fase 2 (Figura 3).



**Figura 2.** Calendario de actividades de la prueba en plantas de tomate.

## Etapa 2

### Extracción de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo con la metodología de Chomczynski *et al.*, (1973). La cual se dio inicio tomando las muestras de tejido vegetal y macerando en un mortero con nitrógeno líquido. Tubos de 2 mL fueron enfriados en nitrógeno líquido para pesar 100 mg de muestra, posteriormente se le agregó 1 mL de Trizol (Tri reagent®) agitándolo suavemente con la mano para homogenizar. La mezcla se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió 200 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente con ayuda de un vortex hasta que mostró aspecto lechoso.

La mezcla obtenida se llevó a centrifugar a 12,000 rpm durante 15 minutos a temperatura de 4°C. Al finalizar la centrifugación fue removida la fase acuosa, la cual fue colocada en un nuevo tubo de 2 mL. En seguida fueron agregados 500 µL de isopropanol frío y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se sometió a una centrifugación de 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Al terminar este proceso fue removido el sobrenadante y fue lavada la pastilla de ARN con 1 mL de etanol frío al 70% realizando inmersiones suaves. Nuevamente se sometió a una centrifugación a 7,500 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente fue removido el sobrenadante dejando secar la pastilla por 15 minutos a temperatura ambiente. Las gotas de etanol que quedaron fueron removidas cuidadosamente con papel secante. La pastilla de ARN se resuspendió con 50 µL de agua DEPC a 60°C durante 15 minutos para después llevar a almacenar las muestras a una temperatura de - 80°C.

### **Tratamiento con DNasa**

Para evitar la contaminación de las muestras de ARN con ADN se realizó un tratamiento con una DNasa. Para lo cual en un tubo estéril se agregó 1 µL de DNasa II, 1 µL de buffer de reacción 10x y 8 µL de ARN, posteriormente se mezcló suavemente y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al término se agregó 1 uL de solución stop para unir los iones de Ca y Mg e inactivar la DNasa. La mezcla fue sometida a una temperatura de 70°C durante 10 minutos para desnaturalizar la DNasa. Por último, se dejó enfriar en hielo.

### **Cuantificación de ARN**

Para determinar la cuantificación de ARN se utilizó un espectrofotómetro (marca Thermo), en este proceso se midió un blanco donde se colocó agua DEPC en una microceldilla tomándolo como referencia. A cada muestra se agregó 2 µL de

ARN más 198  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, mezclando suavemente. Se tomaron lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm, así como el valor de R.

Para calcular la concentración de ARN se utilizaron las siguientes formulas:

$$\mu\text{g/mL} = (A_{260}) (100) (50) \quad \mu\text{g totales} = (\mu\text{g/mL}) (0.05)$$

Concentración de ADN en  $\mu\text{g/mL}$  =  $A_{260}$  corregido  $\times$  100 (factor de dilución)  $\times$  50 (factor de conversión).

### **Calidad ARN**

Para determinar la calidad del ARN extraído se llevó a cabo una electroforesis desnaturante con gel de agarosa. Para preparar el gel de agarosa al 1.3% se utilizaron 1.04 g de agarosa y 50 mL de agua DEPC. La mezcla se colocó a 240°C con agitación y se dejó hervir hasta que la agarosa se disolvió (mezcla completamente cristalina).

La agarosa disuelta se llevó a la campana de extracción, donde se le añadieron 16 mL de MOPS 5X y 14 mL de formaldehído. Inmediatamente se colocó la mezcla en el portagel donde ya estaba ubicado el peine, durante el vaciado se tuvo cuidado de no formar burbujas en el gel.

Para llevar a cabo la solidificación del gel, se dejó reposar por 30 minutos sin utilizar el flujo de extracción.

El gel solidificado se sumergió en la cámara de electroforesis para ARN y se agregó solución MOPS 1X hasta la marca. Se retiró el peine para cargar las muestras en los pozos formados. Las muestras antes de ser colocadas en el pocillo del gel primero fueron preparadas, para lo cual se utilizaron tubos de 0.6 mL en el cual se añadieron 2 mg de muestra, 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (1900  $\mu\text{L}$  de formamida, 0.0025 g de azul de bromofenol, 2  $\mu\text{L}$  de EDTA (0.5 M), 0.0050 g de SDS, 5  $\mu\text{L}$  de

bromuro de etidio, 93  $\mu\text{L}$  de agua grado BM) y agua DEPC para aforar a 10  $\mu\text{L}$ . Las muestras se llevaron a un proceso de incubación de 60°C durante 10 minutos, al terminó se dio lugar a un enfriamiento a 4°C y posteriormente fueron colocadas en cada uno de los pocillos. Después se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder, y se dejó correr a 70 volts por 1 hora.

Al finalizar la corrida, se sacó el portagel de la cámara y fue colocado en el transiluminador donde se tomó la fotografía del gel para apreciar las bandas de ARN con la aplicación de luz UV.

### **Síntesis de cDNA**

La síntesis de cDNA se realizó utilizando un kit comercial de marca Bionline, donde la preparación del master mix se realizó en hielo. La mezcla fue elaborada agregando 1  $\mu\text{g}$  de ARN, 4  $\mu\text{L}$  de TransAmp Buffer 5x, 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa inversa y completando a 20  $\mu\text{L}$  con agua grado biología molecular, se mezcló por medio de pipeteo.

Cada una de las mezclas se colocó en termociclador, el cual fue programado con las condiciones mostradas en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Programación del termociclador para la síntesis de cDNA de las muestras.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
25°C	10 minutos
42°C	15 minutos
48°C	15 minutos
85°C	5 minutos
4°C	Hold

La muestra obtenida se almacenó en el congelador a -20°C hasta su uso.

### Hidratación de iniciadores y preparación de soluciones de trabajo

Se realizó el análisis de expresión de dos genes de estudio (PR1 y JA), utilizando un gen endógeno (Actina1). Los iniciadores fueron diseñados en los softwares AMPLIFIX, OLIGOANALIZER y PRIMERS BLAST como se describen en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Descripción de los iniciadores utilizados.

Nombre	ACTINA	PR1	JA
Secuencia forward	CCCAGGCACACAGGTGTTAT	AAGTAGTCTGGCGCAACTCA	TGGTTCGTCGACTTCGTCAT
Secuencia reverse	CAGGAGCAACTCGAAGCTCA	GTCCGATCCAGTTGCCTACA	CTCGGCCTTGAGAGAGTTCA
Temperatura de anillamiento	60°C	60°C	60°C
Producto de amplificación (pb)	150	108	109

### Prueba de temperatura de anillamiento

Para determinar la temperatura de anillamiento de cada par de iniciadores se implementó una prueba de PCR punto final con un barrido de temperaturas. Tomando las temperaturas cercanas a las recomendadas en la ficha técnica del proveedor para cada iniciador. Se preparó un coctel de reacción en un tubo de 0.6 mL, tomando los reactivos y considerando las cantidades necesarias para la PCR punto final (Cuadro 4), las muestras fueron colocadas en el termociclador punto final con gradientes (marca Axygene) usando el programa mostrado en el Cuadro 5.

**Cuadro 4.** Mezcla de reacción de PCR para la prueba de temperatura de anillamiento.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (1 muestra)</b>
Agua DEPC	18 µL
Buffer para PCR 10X	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5 µL
dNTPS (25 mM)	0.2 µL
Primer 5'-3' (15 pM)	0.83 µL
Primer 3'-5' (15 pM)	0.83 µL
Enzima Taq-Polimerasa (5 U/mL)	0.2 µL
<b>Total</b>	<b>24 µL</b>

**Cuadro 5.** Programa del termociclador para la prueba de temperatura de anillamiento de los iniciadores.

<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>
95°C	10 min 30 CICLOS:
95°C	30 seg
60°C	30 seg (temperatura de anillamiento del primer)
72°C	1 min
72°C	10 min
4°	HOLD

## **Prueba de concentración de iniciadores para qPCR**

Al finalizar la determinación de la temperatura de anillamiento adecuada para los iniciadores, se dio continuidad a realizar las pruebas de concentración de primers para la qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, la q es de cuantitativa, también se le llama PCR en tiempo real). Dichas pruebas se realizaron a partir de una concentración equimolar 100 nM, según los resultados obtenidos se probaron concentraciones equimolares menores o el ajuste en concentración del iniciador forward o reverse.

De tal forma que se seleccionaron aquellas concentraciones donde se mostró tener un buen producto de amplificación sin tener la formación de estructuras inespecíficas (dímeros u horquillas).

## **Validación de genes**

Esta actividad se realizó para probar que los productos de PCR a medir (gen endógeno y genes problema) mostraran tener una amplificación con la misma eficiencia, de tal forma conocer la eficiencia de amplificación con diferentes cantidades de cDNA (diluciones seriales 1:5 a partir de un stock). Por lo tanto, se llevó a cabo la preparación de estándares donde se rotularon 5 microtubos para cada una de las concentraciones. En las cuales se agregaron 32  $\mu\text{L}$  de agua y 8  $\mu\text{L}$  de cDNA esto para el primer estándar. Después se mezcló para obtener 8  $\mu\text{L}$  y así formar el siguiente estándar, este proceso se repitió hasta obtener los 5 estándares requeridos. Luego fue preparado un coctel mix el cual no se incluyó el cDNA. Se tomaron tres réplicas para cada estándar y control negativo para cada gen. El coctel mix fue fraccionado en 5 microtubos de la siguiente manera: se utilizó 46  $\mu\text{L}$  de coctel mix para 3 reacciones incluyendo un poco de exceso (1  $\mu\text{L}$ ) se adicionaron 15  $\mu\text{L}$  de cDNA por cada estándar, se tomó el sobrante del coctel y fue usado para formar los

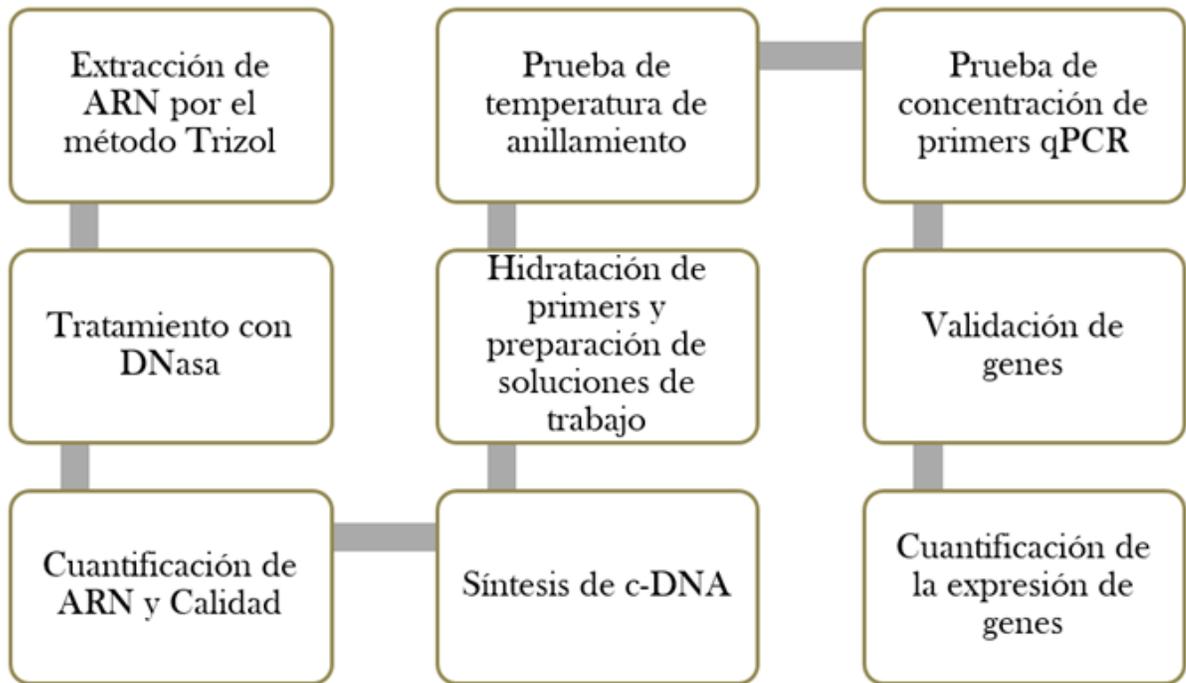
NTC (control negativo sin cDNA). Por último, se dispensaron 20 µL de la mezcla a cada pozo de la placa de reacción para correr la qPCR en las condiciones ya seleccionadas para cada gen en un Termociclador de tiempo real (marca Applied Biosystem, modelo Step One).

### **Cuantificación de expresión de genes**

La evaluación de expresión de genes fue mediante el método de curva relativa estándar, de esta forma para cada análisis de cuantificación se realizó una curva estándar por gen. Se elaboró un coctel mix para cada uno de los genes, previamente se preparó una curva estándar a continuación fueron aplicadas las muestras a evaluar se dio inicio a correr la prueba qPCR aplicando la siguiente programación del termociclador mostrado en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Programación del termociclador para prueba qPCR para la cuantificación de la expresión de genes.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>HOT STAR</b>	95°C	10 min
	40 ciclos	
<b>PCR</b>	95°C	
	Temperatura del iniciador	15 seg
		60 seg
<b>MELTING</b>	95°C	15 seg
	60°C	1 min
	95°C	15 seg



**Figura 3.** Esquema de la metodología para el análisis de expresión génica.

## RESULTADOS

### Rendimiento de ARN

En los resultados obtenidos de rendimiento de ARN de tejido foliar de plantas de tomate del primer muestreo a los 15 ddt (Cuadro 7), se encontró que la extracción de ARN de las muestras fue exitosa. La evaluación de las muestras dio como resultado una relación de pureza (R) de 2.343 a 3.945, con rendimientos de 52.8 a 349.8 ug totales de ARN.

**Cuadro 7.** Rendimiento de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 15 ddt.

Tratamiento	Repetición	A260	A280	R	ug/mL	ug totales
TA	1	0.610	0.196	3.112	3050	152.5
TA	2	0.748	0.266	2.812	3740	187.0
TA	3	0.616	0.214	2.879	3080	154.0
TA	4	1.010	0.387	2.587	5050	252.5
TA	5	0.211	0.007	3.014	1055	52.8
E1	1	0.833	0.299	2.786	4165	208.3
E1	2	0.903	0.349	2.587	4515	225.8
E1	3	0.522	0.154	3.390	2610	130.5
E1	4	0.736	0.258	2.853	3680	184.0
E1	5	0.714	0.244	2.926	3570	178.5
E2	1	1.007	0.391	2.575	5035	251.8
E2	2	0.584	0.198	2.949	2920	146.0
E2	3	1.399	0.597	2.343	6995	349.8
E2	4	0.642	0.217	2.959	3210	160.5
E2	5	0.458	0.163	2.810	2290	114.5
FOL	1	0.823	0.307	2.681	4115	205.8
FOL	2	0.554	0.178	3.112	2770	138.5
FOL	3	0.869	0.327	2.657	4345	217.3
FOL	4	0.432	0.125	3.456	2160	108.0
FOL	5	0.434	0.110	3.945	2170	108.5

Para el segundo muestreo, realizado a los 57 ddt (Cuadro 8), se obtuvo que la extracción de ARN de las muestras fue exitosa. El análisis de las muestras dio como resultado una relación de pureza (R) de 1.493 a 2.015, presentando rendimientos de 29.75 a 74.25 ug totales de ARN.

**Cuadro 8.** Rendimiento de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 57 ddt.

Tratamiento	Repetición	A260	A280	R	ug/mL	ug totales
TA	1	0.222	0.117	1.897	1110	55.5
TA	2	0.252	0.160	1.575	1260	63
TA	3	0.269	0.153	1.758	1345	67.25
TA	4	0.220	0.124	1.774	1100	55
TA	5	0.166	0.095	1.747	830	41.5
E1	1	0.119	0.075	1.587	595	29.75
E1	2	0.200	0.134	1.493	1000	50
E1	3	0.161	0.091	1.769	805	40.25
E1	4	0.202	0.110	1.836	1010	50.5
E1	5	0.208	0.125	1.824	1040	52
E2	1	0.215	0.129	1.667	1075	53.75
E2	2	0.135	0.067	2.015	675	33.75
E2	3	0.253	0.146	1.733	1265	63.25
E2	4	0.297	0.171	1.737	1485	74.25
E2	5	0.207	0.113	1.832	1035	51.75
FOL	1	0.206	0.124	1.661	1030	51.5
FOL	2	0.188	0.112	1.679	940	47
FOL	3	0.133	0.062	1.823	665	33.25
FOL	4	0.255	0.161	1.584	1275	63.75
FOL	5	0.205	0.117	1.752	1025	51.25

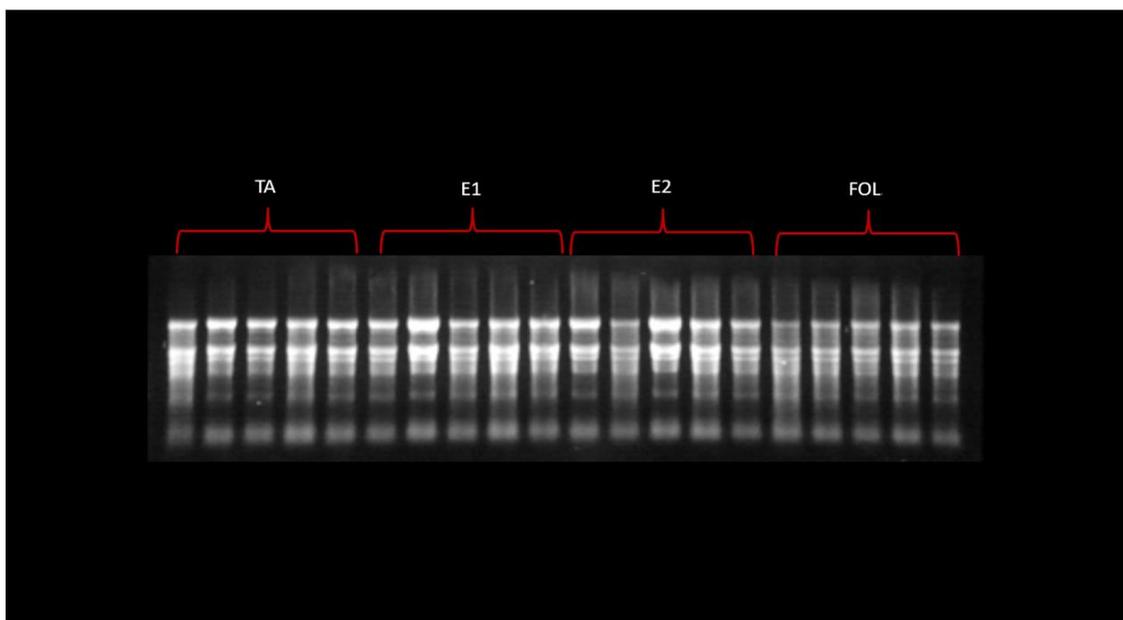
En el tercer muestreo (Cuadro 9), la extracción de la mayoría de las muestras fue exitosa dando como resultado una relación de pureza (R) de 1.500 a 4.000, con rendimientos de 24.8 a 83.8 ug totales de ARN. Para la muestra 4 del tratamiento TA no se observó una buena cuantificación de ARN, por lo que se realizó una segunda extracción obteniéndose nuevamente una baja cuantificación.

**Cuadro 9.** Rendimiento de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 60 ddt.

Tratamiento	Repetición	A260	A280	R	ug/mL	ug totales
TA	1	0.236	0.116	2.034	1180	59.0
TA	2	0.335	0.060	2.550	1675	83.8
TA	3	0.123	0.035	3.514	615	30.8
TA	4	0.072	0.050	1.440	360	18
TA	5	0.103	0.057	1.807	515	25.8
E1	1	0.254	0.100	2.540	1270	63.5
E1	2	0.200	0.069	2.899	1000	50.0
E1	3	0.174	0.100	1.740	870	43.5
E1	4	0.208	0.086	2.419	1040	52.0
E1	5	0.185	0.077	2.403	925	46.3
E2	1	0.240	0.117	2.051	1200	60.0
E2	2	0.208	0.138	1.507	1040	52.0
E2	3	0.250	0.044	1.500	1250	62.5
E2	4	0.204	0.108	1.889	1020	51.0
E2	5	0.108	0.027	4.000	540	27.0
FOL	1	0.174	0.098	1.776	870	43.5
FOL	2	0.099	0.049	2.020	495	24.8
FOL	3	0.173	0.094	1.840	865	43.3
FOL	4	0.263	0.148	1.777	1315	65.8
FOL	5	0.279	0.162	1.722	1395	69.8

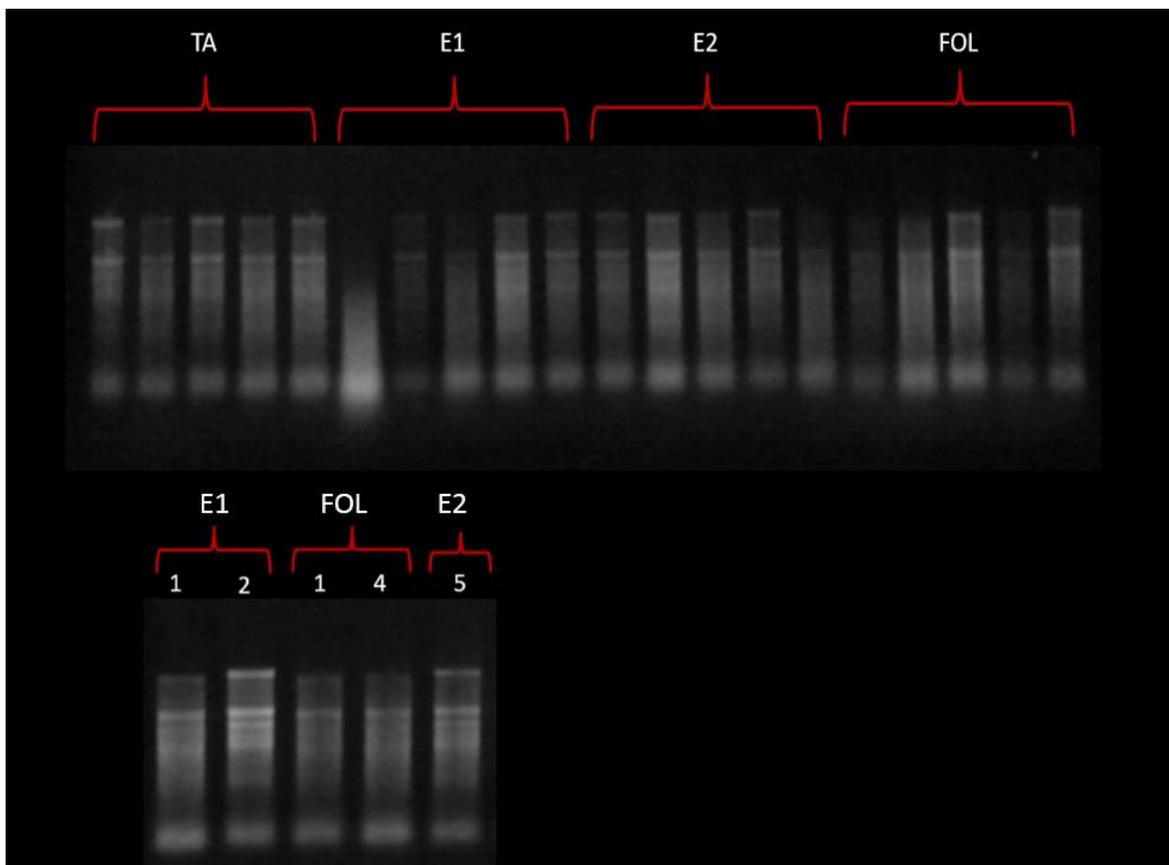
### Calidad de ARN

De acuerdo con el análisis electroforético realizado a las muestras de ARN a los 15 ddt se observó una buena calidad de ARN, por la separación de las bandas de los diferentes ARN's en todos los tratamientos (Figura 4).



**Figura 4.** Análisis electroforético de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 15 ddt.

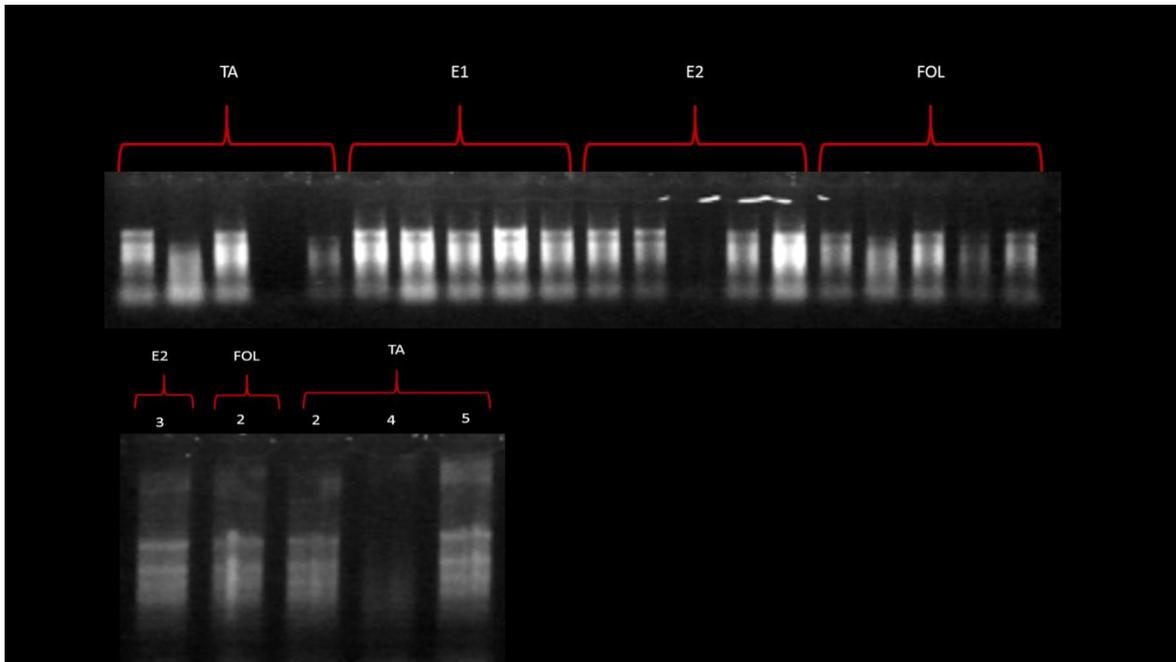
En el segundo análisis electroforético de ARN para la mayoría de las muestras se obtuvo una buena calidad del ARN, en las muestras 1 y 2 del tratamiento E1, la muestra 5 del tratamiento E2 y las muestras 1 y 4 del tratamiento FOL no presentaron integridad de ARN, por lo que se repitieron los análisis de extracción, cuantificación y calidad de ARN. Para este segundo análisis se observó buena calidad de ARN (Figura 5).



**Figura 5.** Análisis electroforético de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 57 ddt.

En el tercer muestro a los 60 ddt, se observó buena calidad de ARN en las muestras (Figura 6), a excepción de las muestras 1 y 2 del tratamiento E1, la muestra 5 del tratamiento E2 y en el tratamiento FOL las muestras 1 y 4, que presentaron baja calidad de ARN, por lo tanto se repitió los análisis de extracción, cuantificación y calidad de ARN, en este segundo análisis la muestra 4 del tratamiento TA siguió mostrando tener baja integración de ARN por lo cual esta muestra fue descartada.

Una vez que se verificó la calidad de ARN de todas las muestras, fueron utilizadas para realizar la síntesis de c-ADN.

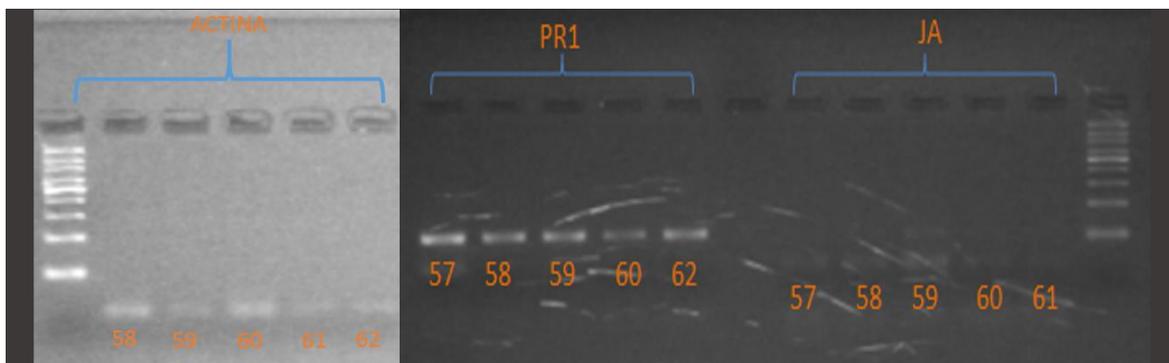


**Figura 6.** Análisis electroforético de ARN de tejido foliar de plantas de tomate a los 60 ddt.

### Iniciadores

El gen endógeno a utilizar fue el gen actina y los genes problema fueron PR1 y JA. En la prueba de temperatura de anillamiento se obtuvo que el gen endógeno actina y los genes problema PR1 y JA amplificaron a todas las temperaturas probadas.

Por lo cual se decidió que la temperatura a utilizar para qPCR fuera a 60°C, ya que a esta temperatura se observó una buena amplificación para los 3 genes (Figura 7).

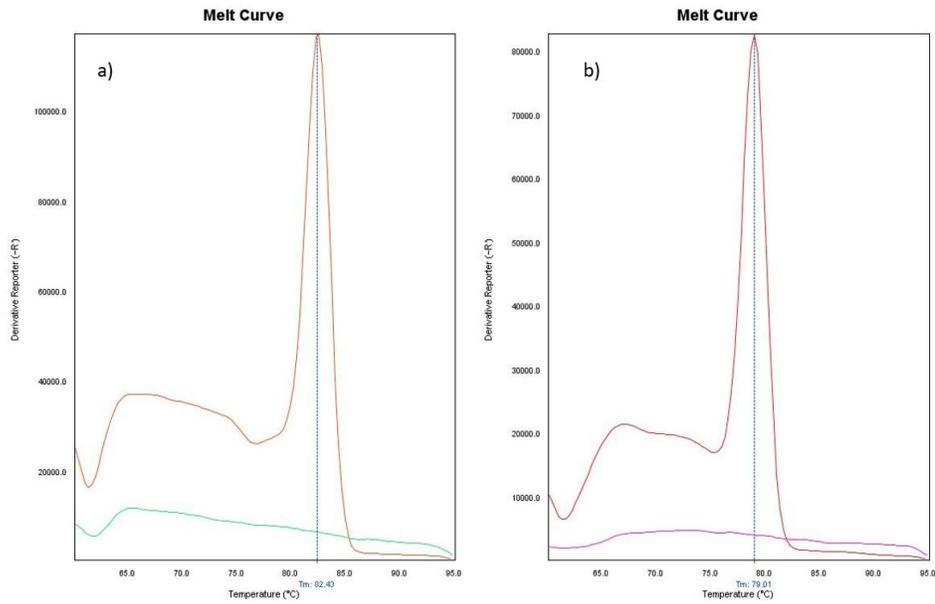


**Figura 7.** Prueba de temperaturas de anillamiento para los genes actina, PR1 y JA.

Una vez elegida la temperatura de anillamiento se procedió a realizar la prueba de concentración de iniciadores que nos permitió estandarizar la concentración de los iniciadores forward y reverse a utilizar en la qPCR (Cuadro 10), dado que en estas condiciones no se presentó la formación de productos inespecíficos (Figura 8). Por lo que se prosiguió a realizar la validación de los genes.

**Cuadro 10.** Parámetros utilizados para la cuantificación de genes PR1 y JA.

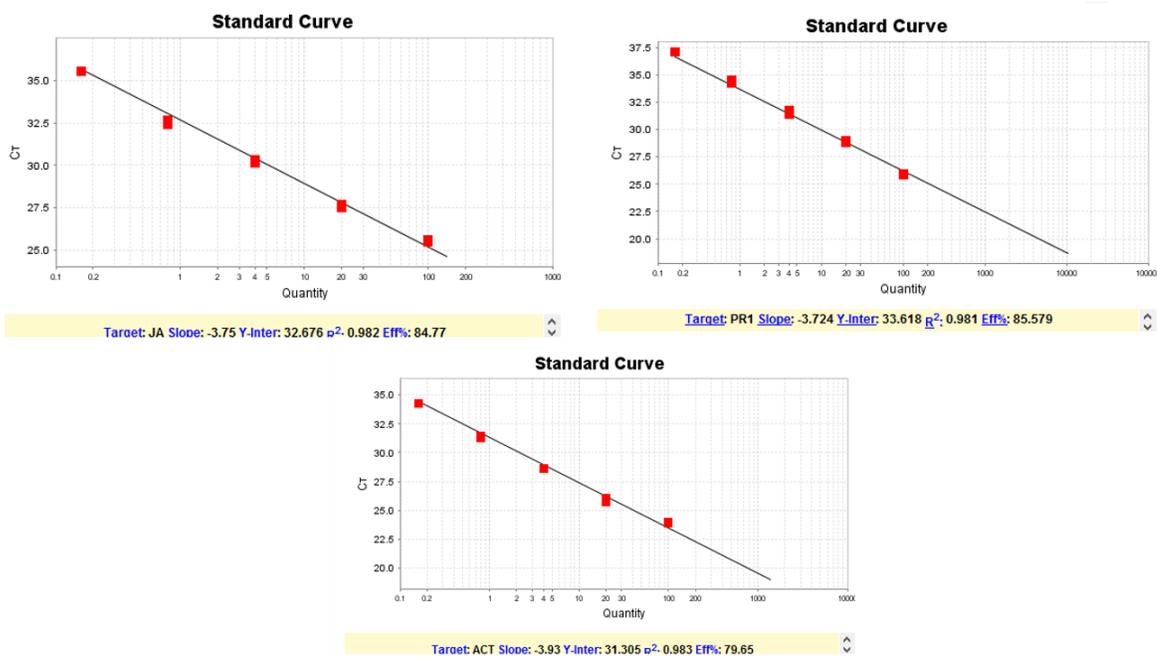
Gen	Concentración primer Foward	Concentración primer Reverse	Temperatura	DNA
ACTINA	72 nM	60 nM	58-62°	4 ul
PR1	20 nM	40 nM	60°	4 ul
JA	40 nM	60 nM	60°	4 ul



**Figura 8.** Curvas de fusión de productos de PCR. a) gen PR1, b) JA.

### Validación de genes

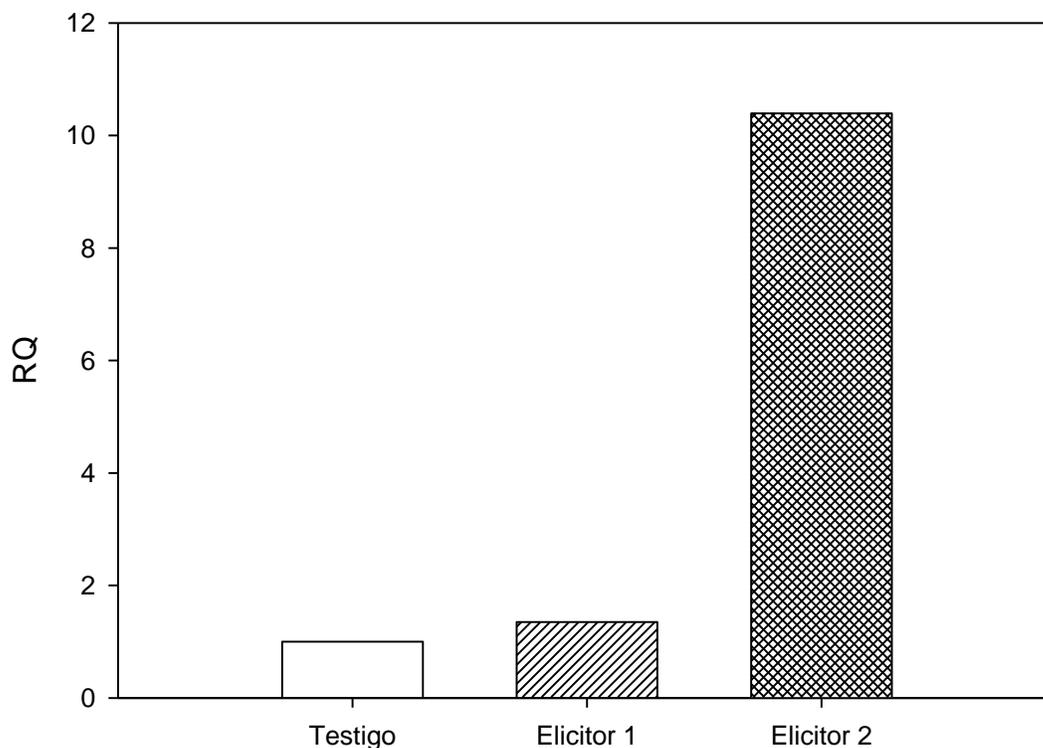
De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de validación de genes, se eligió el método de curva relativa estándar (Figura 9) para realizar la cuantificación de los genes, obteniéndose la gráfica de expresión de genes y los valores de  $R^2$ , para cada uno los genes estudiados.



**Figura 9.** Curva relativa estándar para los genes PR1, JA y Actina.

### Expresión del gen PR1

La aplicación de los elicitores naturales a plantas de tomate, así como la inoculación de FOL indujo una sobre expresión del gen PR1. Después de realizar la aplicación de los elicitores en el análisis de expresión del gen PR1 realizado a los 15 ddt, se observó que este gen se sobreexpresó 0.35 veces más en las plantas que fueron tratadas con E1 y en las plantas tratadas con el E2 la sobreexpresión del gen fue de 9.39 veces más en comparación con el testigo absoluto (Figura 10).



**Figura 10.** Análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 15 ddt.

**Cuadro 11 .** Resumen del análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 15 ddt.

Sample	Target	CT Mean	RQ	RQ Min	RQ Max
Testigo	PR1	16.925	1	0.35	2.858
Elicitor 1	PR1	16.484	1.351	0.5	3.652
Elicitor 2	PR1	13.452	10.394	6.145	17.581

Se sabe que algunas fitohormonas como el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA) desempeñan un papel muy importante en las vías de señalización del estrés biótico y abiótico (Fujita et al. 2006).

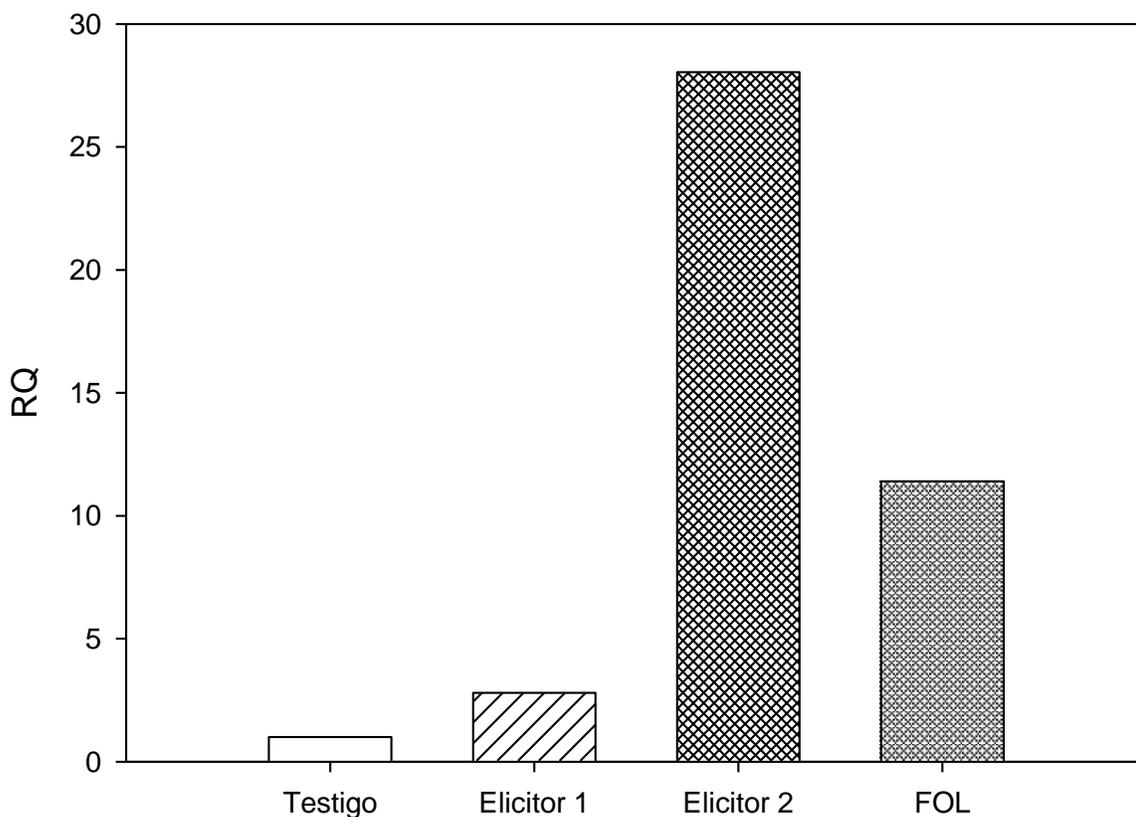
Las plantas al encontrarse en condiciones adversas para su desarrollo y crecimiento han desarrollado mecanismos complejos para defenderse ante dichas situaciones responsables que causan estrés en ellas (Basurto et al. 2008).

El uso de sustancias derivadas de productos naturales como los extractos naturales, aplicados en a la agricultura pueden interferir en aspectos fisiológicos de las plantas, incluso estimular el metabolismo de defensa de las mismas debido a su función como elicitores (Hassini et al. 2019).

Tanto como la inoculación de FOL, como el uso de elicitores naturales activan el sistema de defensa en las plantas de tomate, los cuales influirán en la síntesis de fitohormonas reguladoras de la defensa, debido a que estas realizan un papel importante en las vías de señalización en el sistema de defensa ante el estrés de tipo biótico y abiótico (Takken Flw et al. 2012). De tal forma después de realizar las aplicaciones de los extractos vegetales en este experimento en las plantas de tomate se logró observar un estímulo en los genes de defensa (Cuadro 11).

La expresión de los genes PR tiene un alto nivel de respuesta de defensa en las plantas ante el estrés biótico y abiótico, activados por diferentes cascadas de señalización. El gen PR1 se encuentran principalmente relacionados al sistema de defensa de la RSA debido a que son utilizados como genes marcadores respondiendo contra una amplia gama de patógenos en diferentes especies de plantas (Mitsuhara et al. 2008).

Se ha demostrado que el ácido salicílico es una molécula de señalización. Involucrado tanto en las reacciones de defensa local en los sitios de infección como en la resistencia sistémica (Conrath 2006b).



**Figura 11.** Análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 57 ddt.

**Cuadro 12.** Resumen del análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 57 ddt.

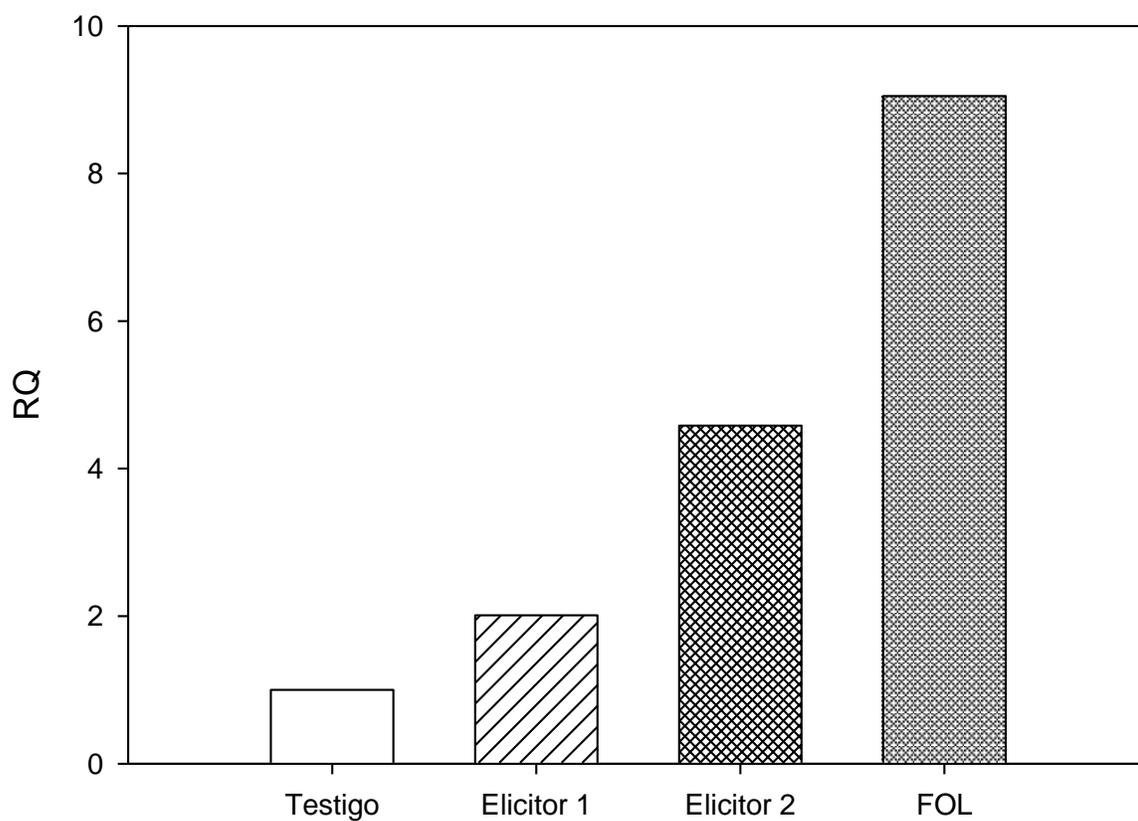
Sample	Target	RQ	RQ Min	Rq Max
Testigo	PR1	1	0.035	28.963
Elicitor 1	PR1	2.795	1.171	6.673
Elicitor 2	PR1	28.04	0.065	12 129.021
FOL	PR1	11.398	4.051	32.069

La expresión anticipada de PR1 en los tratamientos E1 y E2, funciona efectivamente como protección a las plantas ya podría anticipadamente activar el sistema de defensa mediada por la RSA, pudiendo estar activa antes de la

inoculación del patógeno, contrarrestando su invasión y daño en la planta (Pandey et al. 2012).

Se obtuvieron resultados similares, al realizar una prueba de aplicación exógena de AS en plantas de tomate inoculados con FOL, donde se afirma que las plantas de tomate con niveles significativos de AS podían inducir resistencia contra FOL a causa de la activación de la RSA que trabajo de forma dependiente de AS (Mandal et al. 2009).

A los 60 ddt se observó que en las plantas tratadas con E1, el gen PR1 se sobreexpresó 1.01 veces más que el tratamiento TA, en el tratamiento E2 se presentó un incremento de 3.58 veces más y en FOL se observó que tuvo 8.04 veces más que TA (Figura 12). A los 60 ddt se observó un aumento en la expresión de PR1 en el tratamiento FOL respecto a E1 y E2. Esto pudo deberse a que en este punto la infección de FOL en las plantas de tomate ya se encontraba en una etapa avanzada, ya que ya se presentaban síntomas visibles de la enfermedad.



**Figura 12.** Análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 60 ddt.

**Cuadro 13.** Resumen del análisis de expresión de gen PR1 en plantas de tomate a los 60 ddt.

Sample	Target	Ct Mean	RQ	RQ Min	RQ Max
Testigo	PR1	10.236	1	0.02	49.654
Elicitor 1	PR1	7.807	2.011	0.919	4.398
Elicitor 2	PR1	8.182	4.582	0.825	25.45
FOL	PR1	7.768	9.049	2.988	27.401

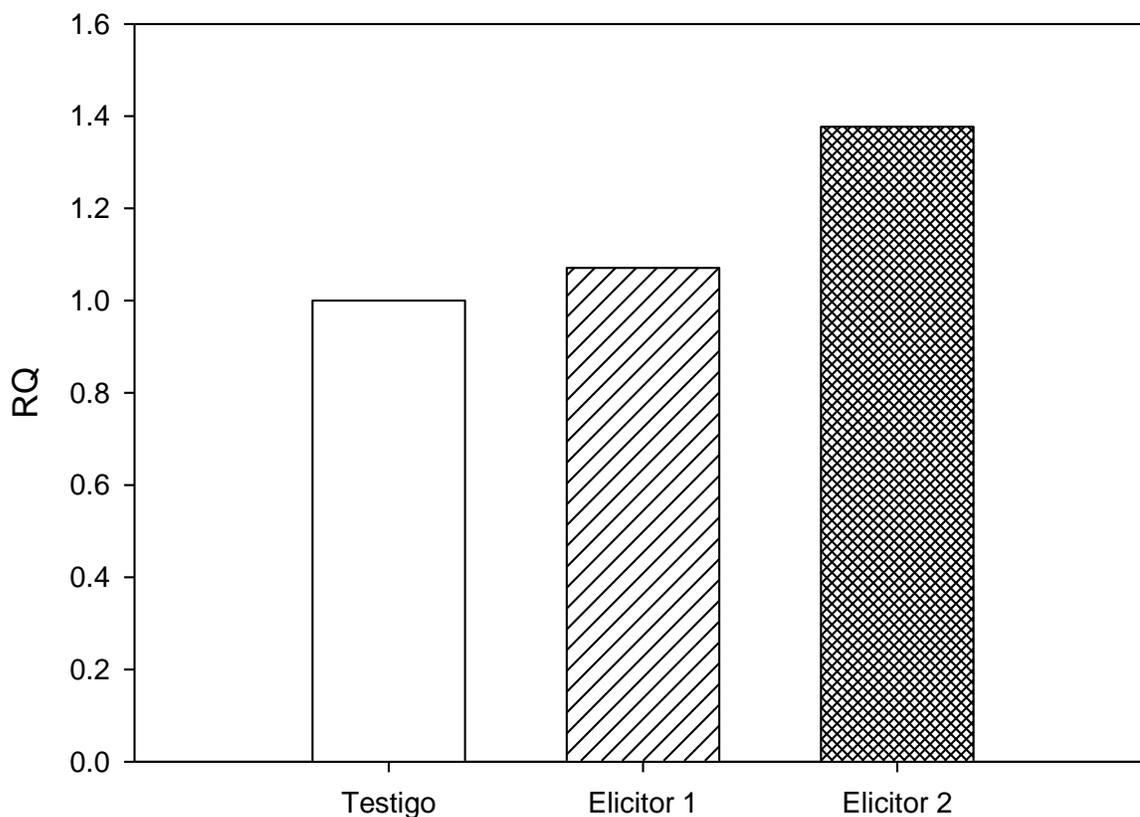
La interacción del SA con las diferentes hormonas y sus rutas de señalización presenta una complejidad debido a que conllevan una participación estrecha en la defensa de las plantas causada por estrés de tipo biótico o abiótico, ya sea que estas diferentes hormonas trabajen en conjunto o totalmente de manera opuesta siendo unas antagonistas de otras (Rangel Sánchez et al. 2010).

De manera general se considera que AS participa de manera primaria ante el ataque de patógenos de tipo biotróficos. Y ante al ataque de organismos necróticos se considera que se tiende a tener una respuesta principal de JA y ET (Bigeard et al. 2015).

### **Ácido Jasmónico**

FOL es un organismo hemibiotrófico, donde en sus primeras fases este actúa como biotrófico, responsable de estimular la acción de AS de forma mayoritaria a comparación de AJ. Cuando este pasa a su fase necrótico será necesario la expresión de los genes relacionados a AJ para la defensa de la planta (Zhang et al. 2017)

Esto concuerda con los resultados obtenidos en este ensayo donde se observó que el análisis de expresión del gen JA realizado a los 15 ddt, E1 tuvo una expresión de 0.07 veces más que el tratamiento TA y E2 0.37 veces más que las plantas TA (Figura 13).



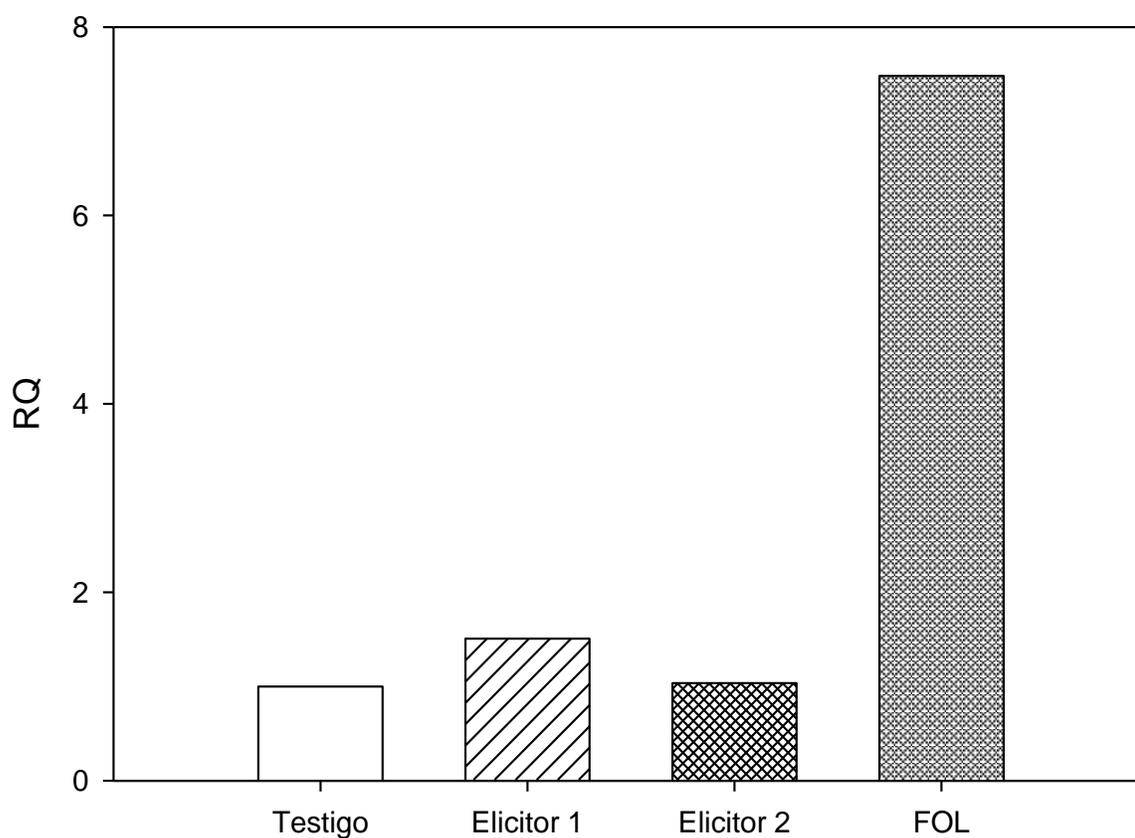
**Figura 13.** Análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 15 ddt.

**Cuadro 14.** Resumen del análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 15 ddt.

Sample	Target	CT Mean	RQ	RQ Min	RQ Max
Testigo	JA	24.8310	1	0.686	1.45
Elicitor 1	JA	24.9160	1.071	0.802	1.43
Elicitor 2	JA	24.6530	1.377	1.267	1.49

Al realizar el segundo análisis de expresión para el gen JA a los 57 ddt inoculadas con el patógeno en comparación al primer análisis de expresión del gen JA se observó que en todos los tratamientos hubo un incremento en la expresión del gen JA alcanzando una sobreexpresión en el tratamiento E1 de 0.50 veces más que

el tratamiento TA. En el tratamiento E2 se sobreexpresó 0.03 veces más y FOL mostró tener un incremento de 6.48 veces más que el tratamiento testigo (Figura 14, Cuadro 15).

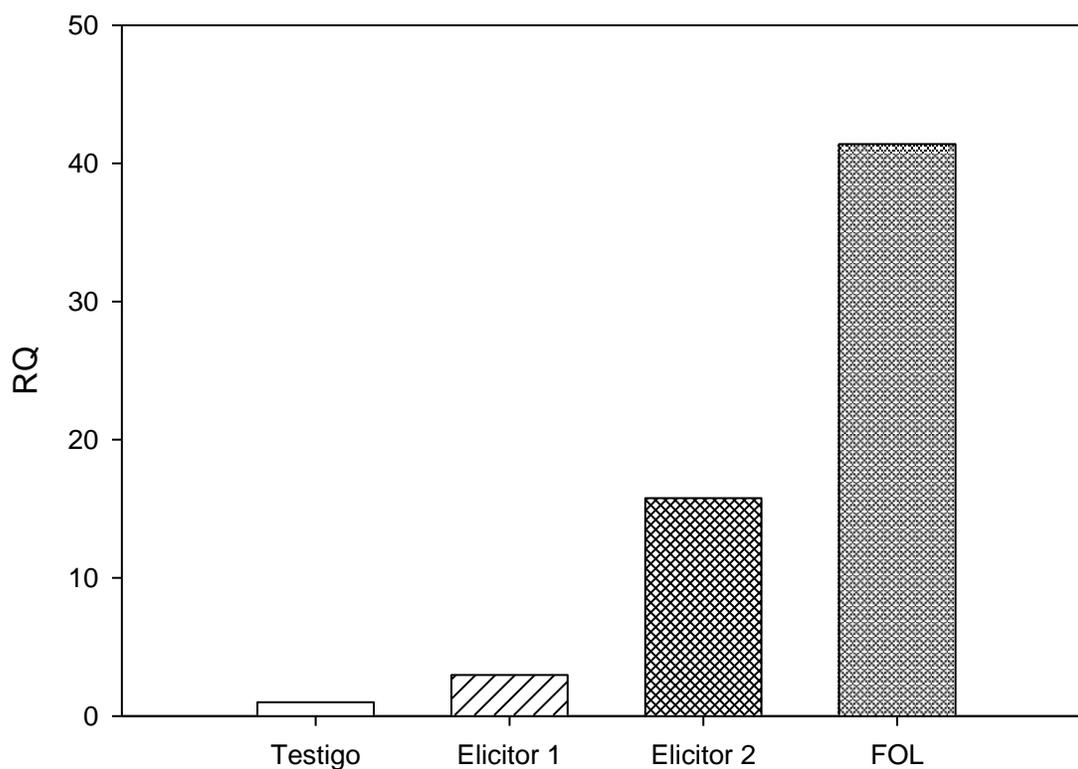


**Figura 14.** Análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 57 ddt.

**Cuadro 15.** Resumen del análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 57 ddt.

Sample	Target	CT Mean	RQ	RQ Min	RQ Max
Testigo	JA	22.699	1	0.619	1.616
Elicitor 1	JA	22.237	1.508	0.65	3.5
Elicitor 2	JA	22.929	1.036	0.248	4.335
FOL	JA	20.86	7.481	2.458	22.767

El gen JA para el tercer análisis a los 60 ddt se observó una sobreexpresión de 1.96 veces más en el tratamiento E1, 14.77 veces más en el tratamiento E2 y 40.4 veces más en el tratamiento FOL en comparación al testigo absoluto (Figura 15, Cuadro 16).



**Figura 15.** Análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 60 ddt.

**Cuadro 16.** Resumen del análisis de expresión de gen JA en plantas de tomate a los 60 ddt.

Sample	Target	CT mean	RQ	RQ Min	RQ Max
Testigo	JA	24.279	1	0.191	5.235
Elicitor 1	JA	21.527	2.968	1.611	5.468
Elicitor 2	JA	20.353	15.771	4.92	50.557
FOL	JA	19.119	41.4	24.691	69.416

En el análisis de la expresión de genes PR1 se observó que en las plantas tratadas con E1 a partir de la inoculación del patógeno se incrementó la expresión del gen PR1, en el tercer análisis de la expresión del gen mostró que este se decrementó, este mismo comportamiento se observó en los tratamientos E2 y FOL .

En cambio, el análisis de expresión de gen JA se observó un comportamiento opuesto al gen PR1, ya que al segundo análisis de expresión del gen JA a partir de la inoculación del patógeno en todos los tratamientos se observó que tuvieron un incremento en la sobreexpresión del gen, al realizar el tercer análisis de expresión del gen JA se mostró que en todos los tratamientos continuaron incrementando.

El mayor cambio de sobreexpresión para el gen PR1 se observó en las plantas tratadas con el E2 en el muestreo realizado a los 57 ddt. Para el gen JA ocurrió con el tratamiento FOL en el muestreo realizado a los 60 ddt.

Diferentes estudios afirman que el aumento de la sintonización de JA en las plantas está relacionado a la señalización percibida por estas ante condiciones adversas principalmente al estrés causado por patógenos de tipo necrotrófico e insectos herbívoros (Di et al. 2016).

En el tratamiento inoculado con FOL se observa un aumento constante del gen relacionado a JA, esto siendo visible después de los 15 ddt, 57ddt y los 60ddt.

Por lo tanto, esto podría indicarnos que el aumento de AJ en el tratamiento de FOL se debe a que las plantas de tomate se encuentran bajo un estrés causado por el patógeno en la planta. Aumentando la actividad hormonal por el daño de la invasión y crecimiento necrotrófico del hongo. Lo que podrá resultar de forma negativa para la defensa dependiente de SA) ya que puede ser inhibida por AJ a través de la expresión regulada por NAC TFs, ANAC019 ANAC055 y ANAC072 (Zhang et al. 2017).

## **CONCLUSIÓN**

La aplicación de elicitores en plantas de tomate inoculadas con FOL generó una expresión diferencial de los genes PR1 y JA relacionados a los diferentes sistemas de defensa RSA y RSI, por medio de sus respectivas vías de señalización en los tres diferentes tiempos de muestreo. En el caso del gen PR1 a los 15 DDT se incrementó más del doble el tratamiento E2, y a los 57 y 60 DDT los tratamientos E1, E2 y FOL. Con el gen JA a los 15 DDT no se incrementó a más del doble ningún tratamiento, sin embargo, para el día 57 DDT se incrementó el tratamiento FOL y el día 60 DDT los tratamientos E1, E2 y FOL.

La aplicación de los elicitores pudieron desencadenar la activación de la defensa en las plantas, activando la RSA y RSI dando como resultado una mayor tolerancia de las plantas a la enfermedad.

## LITERATURA CITADA

- Agrios G (2005) Plant Pathology, 5.<sup>a</sup> edn. Elsevier Academic Press., New York, USA
- Ahuja I, Kissen R, Bones AM (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. Trends Plant Sci. 17:73-90.
- Akkopru A, Demir S (2005) Biological Control of Fusarium Wilt in Tomato Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some Rhizobacteria. J Phytopathol 153:544-550. doi: 10.1111/j.1439-0434.2005.01018.x
- Alcántara CJS, Acero GJ, Alcántara CJD, Sánchez MRM (2019) Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. doi: 10.1016/J.MI
- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. Nature 431:350-355.
- Angelova Z, Georgiev S, Roos W (2006) Elicitation of Plants. Biotechnol Biotechnol Equip 20:72-83. doi: 10.1080/13102818.2006.10817345
- Apodaca SÁM, Mejía ZE, Osada KS, et al (2004) Hospedantes Asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México.
- Basu AN (1995) Bemisia Tabaci (Gennadius): crop pest and the principal whitefly vector of plant viruses.  
<https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=xSeNDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT11&dq=bemisia+tabaci++virus+&ots=DP6CNr3rG5&sig=nh4wV0llp6EeiuDWFzFnbWa4e4#v=onepage&q=bemisia+tabaci+virus&f=false>. Accessed 4 dic 2019
- Basurto SM, Núñez BA, Pérez LR, Hernández ROA (2008) Fisiología del estrés ambiental en plantas. Aventuras pensamiento Ed Fac de Ciencias Agrotecnológicas 48:5.
- Benavides MA (2002) Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas, 1.<sup>a</sup> edn.

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

- Bigeard J, Colcombet J, Hirt H (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant* 8:521-539. doi: 10.1016/j.molp.2014.12.022
- Blancard D, Laterrot H, Marchoux G, Candresse T (2011) Enfermedades del tomate : identificar, conocer, controlar, 2 Edición. Mundi prensa libros
- Bray Speth E, Lee YN, He SY (2007) Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:580-586.
- Brodribb TJ, Holbrook NM (2003) Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. doi: 10.1104/pp.103.023879
- Burdisso P (2013) Bases estructurales del reconocimiento ARN-proteína en el procesamiento de pequeños ARNs en plantas. Universidad Nacional De Rosario
- Cabrejos MME, Tamayo CE, Maldonado ME (2001) Análisis molecular del proceso de transcripción de genes en eucariontes. *Rev Chil pediatría.* doi: 10.4067/s0370-41062001000500002
- Cai J, Gao Y, Wang M, et al (2019) Antibacterial Activity of Polygonum Orientale Extracts Against *Clavibacter Michiganensis* subsp. *michiganensis*, the Agent of Bacterial Canker of Tomato Disease. *Brazilian Arch Biol Technol.* doi: 10.1590/1678-4324-2019180021
- Camarena GG, De La Torre AR (2007) Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Rev Chapingo Ser Ciencias For y del Ambient* 13:157-162.
- Cardona PLF, Castaño ZJ (2019) Comparison of inoculation methods of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Sacc. (Snyder & Hansen), the causal agent of the vascular wilt of tomato. *Rev la Acad Colomb Ciencias Exactas, Fis y Nat* 43:227-233. doi: 10.18257/raccefyn.854
- Cardona PLF, Castaño ZJ, Ceballos AN (2016) Epidemiología del tizón tardío [*Phytophthora infestans* (mont.) De bary] en quince introducciones de tomate silvestre. *Rev UDCA Actual Divulg Científica* 19:54.

- Castaño Monsalve JI, Guillermo Ramírez Gil JI, Fernando Patiño Hoyos LI, Gonzalo Morales Osorio JI (2015) Alternativa para el manejo de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en *Solanum betaceum* Cav. mediante inductores de resistencia. *Rev Protección Veg* 30:204-212.
- Castellanos GL, De Mello PR, Silva CC (2009) El Silicio en la resistencia de los cultivos. *Cultiv Trop* 30:00-00.
- Castelló MJ, Medina Puche L, Lamilla J, Tornero P (2018) NPR1 paralogs of *Arabidopsis* and their role in salicylic acid perception. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0209835
- Castro ME, García PE (2009) La inmunidad innata en las plantas: una batalla molecular entre receptores y estimuladores | *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*.  
<https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=53&path%5B%5D=53>. Accessed 16 ene 2020
- Chen, Nelson, Ávila, Cubero (2019) Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) and Cholangiocarcinoma: The Missing Link. *Cells* 8:1172. doi: 10.3390/cells8101172
- Chern M, Fitzgerald HA, Canlas PE, et al (2005) Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:511-520. doi: 10.1094/MPMI-18-0511
- Chico JM, Chini A, Fonseca S, Solano R (2008) JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:486-494.
- CIMA (2019) Reporte del mercado de tomate rojo.  
[https://www.cima.aserca.gob.mx/work/models/cima/pdf/cadena/2019/Reporte\\_mercado\\_tomate\\_rojo\\_031019.pdf](https://www.cima.aserca.gob.mx/work/models/cima/pdf/cadena/2019/Reporte_mercado_tomate_rojo_031019.pdf). Accessed 13 mar 2020
- Conrath U (2006a) Systemic acquired resistance. *Plant Signal Behav* 1:179-84.
- Conrath U (2006b) Systemic acquired resistance. *Plant Signal Behav* 1:179-184. doi: 10.4161/psb.1.4.3221

- De Alba K, Juárez A, Zermeño G, et al (2015) Análisis de crecimiento del cultivo de tomate en invernadero.
- Del Pozo O, Lam E (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol* 8:1129-1132. doi: 10.1016/S0960-9822(98)70469-5
- Di X, Takken FLW, Tintor N (2016) How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *fusarium oxysporum*. *Front. Plant Sci.* 7:170.
- Díaz MF, De León GC, Nava DC (2018) Induced resistance to *Puccinia sorghi* and tar spot complex (*Phyllachora maydis* and others) in maize (*Zea mays*). doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1807-6
- Ding Y, Sun T, Ao K, et al (2018) Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell* 173:1454-1467.e10. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.044
- Dotor RY, Cabezas GM (2014) Mecanismos de resistencia sistémica en plantas. *Acta Iguazu* 3:1-19.
- Enríquez GE, Aispuro HE, Arispuro VI, Martínez TM (2010) Oligosacarinas derivadas de la pared celular: Actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de las plantas. *Rev Mex Fitopatol* 28:61-63.
- Evans ML (1984) Functions of Hormones at the Cellular Level of Organization. En: *Hormonal Regulation of Development II*. Springer Berlin Heidelberg, pp 23-79
- Febres AME (2019) Respuesta de quinua (*Chenopodium quinoa*) al estrés de sequia y calor bajo condiciones de la molina. Universidad Nacional Agraria La Molina
- FIRA (2019) Panorama Agroalimentario, Tomate rojo 2019. <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2019/06/Panorama-Agroalimentario-Tomate-rojo-2019.pdf>.
- FIRA (2016) Panorama Agroalimentario: Tomate Rojo. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama\\_Agroaliment](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama_Agroaliment)

ario\_Tomate\_Rojo\_2016.pdf.

Frechtel G (2005) El ARN de interferencia. *Bioquímica* 30:99-100.

Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, et al (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* 9:436-442. doi: 10.1016/j.pbi.2006.05.014

García EEL, Robledo OA, Benavides MA, et al (2018) Efecto de elicitors de origen natural sobre plantas de tomate sometidas a estrés biótico. *Rev Mex Ciencias Agrícolas* 4110200. doi: 10.29312/remexca.v0i20.991

García JA (2012) Desinfestación de sustrato y solución nutritiva contaminados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Universidad Autónoma Chapingo

García MR, Pérez LR (2003) Fitoalexinas: Mecanismo de defensa de las plantas. *Rev Chapingo Ser Ciencias For y del Ambient* 9:5-10.

García MS, Gómez MF, Trejo TL, Herrera CÉ (2013) Factores de transcripción involucrados en respuestas moleculares de las plantas al estrés osmótico. *Rev Fitotec Mex* 33:100.

Garcion C, Lamotte O, Cacas JL, Métraux JP (2014) Mechanisms of Defence to Pathogens: Biochemistry and Physiology. En: *Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection*. Wiley Blackwell, pp 106-136

Gómez GB (2009) Inestabilidad genética asociada a transcripción. Universidad de Sevilla

González STE, Moreno RL, Troncoso RR, et al (2017) Inoculación de *Trichoderma longibrachiatum* en algodón transgénico: Cambios en compuestos fenólicos y enzimas de estrés oxidativo. *Idesia* 35:19-24. doi: 10.4067/S0718-34292017005000005

Guest D, Brown J (1997) *Plant pathogens and plant diseases*, 1.<sup>a</sup> edn. Rockvale Publication, Australia

- Hassini I, Rios JJ, Garcia-Ibañez P, et al (2019) Comparative effect of elicitors on the physiology and secondary metabolites in broccoli plants. doi: 10.1016/j.jplph.2019.05.008
- Herráez SA (2012) Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética : conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud, 2 Edition. Elsevier
- Horsfall JG (2012) Plant Pathology V1: The Diseased Plant, Edition 1. Elsevier Science
- Hutson RA, Smith IM (1980) Phytoalexins and tyloses in tomato cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* or *Verticillium albo-atrum*. *Physiol Plant Pathol* 17:245-257. doi: 10.1016/s0048-4059(80)80018-x
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, et al (2009) Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *Int J Agric Biol* 11:1560-8530.
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329. doi: 10.1038/nature05286
- Keen NT (1990) Gene-For-Gene Complementarity in Plant-Pathogen Interactions. *Annu Rev Genet* 24:447-463. doi: 10.1146/annurev.ge.24.120190.002311
- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. En: *Phytopathology*. American Phytopathological Society, pp 1259-1266
- Koo AJK, Howe GA (2009) The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* 70:1571-1580.
- Larcher W (2003) Ecophysiology and stress physiology of functional. En: *Physiological plant ecology*. pp 1-6
- Laredo AEI, Martínez HJL, Iliná A, et al (2017) Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*

8:673. doi: 10.29312/remexca.v8i3.40

Li N, Han X, Feng D, et al (2019a) Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/Jasmonate in plant defense: Do we understand what they are whispering? *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms20030671

Li N, Han X, Feng D, et al (2019b) Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/Jasmonate in plant defense: Do we understand what they are whispering? *Int. J. Mol. Sci*. 20:

Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *Plant Cell Online* 15:165–178. doi: 10.1105/tpc.007468.

Lugo TÁ, Trijillo MK del C (2009) MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Rev Med Univ* 44:187.192.

Luna GML, Delgado AA (2014) Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Av en Investig Agropecu* 18:17.

Maâtaoui M EL, Espagnac H, Michaux-ferrière N (1990) Histology of Callogenesis and Somatic Embryogenesis Induced in Stem Fragments of Cork Oak (*Quercus suber*) Cultured In Vitro. *Ann Bot* 66:183-190. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a088014

Mandal S, Mallick N, Mitra A (2009) Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiol Biochem* 47:642-649. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.03.001

Martinez E, Cervantes DL, Ail CC, et al (2016) Fitopatógenos asociados al tomate en la zona árida del noroeste de México, hongos importancia de su diagnóstico. doi: 10.19044/esj.2016.v12n18p232

Martínez Frías ML (2010) Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *Semergen* 36:273-277. doi:

10.1016/j.semerg.2009.12.014

Millas PO, France ÁI (2017) Marchitez vascular en tomate, 73.<sup>a</sup> edn. Sanidad vegetal, Chile

Mitsuhara I, Iwai T, Seo S, et al (2008) Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Mol Genet Genomics* 279:415-427. doi: 10.1007/s00438-008-0322-9

Mittler R, Del Pozo O, Meisel L, Lam E (1997) Pathogen-induced programmed cell death in plants, a possible defense mechanism. *Dev Genet* 21:279-289. doi: 10.1002/(SICI)1520-6408(1997)21:4<279::AID-DVG5>3.0.CO;2-4

Molero T, Utate J (2020) Aportes a la teoría del diseño inteligente desde los contenidos curriculares de la genética molecular. *Apunt Univ* 10:1-13. doi: 10.17162/au.v10i1.414

Montoliu VA (2010) Respuesta fisiológica de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos. UNIVERSITAT JAUME I Escola

Morcillo RJL, Zhao A, Tamayo-Navarrete MI, et al (2019) Tomato root transformation followed by inoculation with *Ralstonia solanacearum* for 2 straightforward genetic analysis of bacterial wilt disease. doi: 10.1101/646158

Morrison DK (2012) MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a011254

Norvienyeku J, Wang Z, Yun Y, et al (2019) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* C2H2 transcription factor FolCzf1 is required for conidiation, fusaric acid production, and early host infection. 65:773-783. doi: 10.1007/s00294-019-00931-9

Núñez PR (2011) Efectos del etileno sobre la expresión génica en *Capsicum chinense* durante la interacción planta-patógeno. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198:249-266.
- Ochoa MS, Madrigal, Pedraza R, Trujillo MM, Abud YC (2010) Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12:65-71.
- OIRSA (2015) El psílido de la papa y tomate *Bactericera* (=Paratrioza) *cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae): ciclo biológico; la relación con las enfermedades de las plantas y la estrategia del manejo integrado de plagas en la región del OIRSA, 1.<sup>a</sup> edn. Corporativo Editorial Tauro S.A. de C.V
- Ojito RK, Portal O (2010) Introducción al sistema inmune en plantas. *Biotecnol Veg* 2:17.
- Pandey N, Biswas S, Mohd R (2012) Inductions of Defense Response in Tomato against *Fusarium Wilt* through Inorganic Chemicals as Inducers. *J Plant Pathol Microbiol.* doi: 10.4172/2157-7471.1000128
- Pérez UCE, Ávalos GA (2009) Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA* 2:61-107.
- Pettinari MJ (2010) Las bacterias y nosotros, tan diferentes... y tan parecidos Mitos y verdades de las diferencias entre eucariotas y procariotas. *QuímicaViva* 9:10. doi: 1666-7948
- Pierce BA (2009) *Genética: Un enfoque conceptual*, 3.<sup>a</sup> edn. Editorial Médica Panamericana
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, et al (2014) Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52:347-375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340
- Preuss Da Cruz M, Mazaro SM, Bruzamarello J, et al (2019) Bioactive Compounds of *Ganoderma lucidum* Activate the Defense Mechanisms of Soybean Plants and Reduce the Severity of Powdery Mildew. *J Agric Sci.* doi: 10.5539/jas.v11n13p99

- Ramírez BJ, Vargas AG, Tovilla ZC, Fragoso JM (2013) Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas.
- Rangel Sánchez G, Mercado EC, Beltran Peña E, et al (2010) El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* 12:90-95.
- Rivera FE (2015) Uso de silicio e inductores de resistencia en relación a huanglongbing (HLB) en limón persa (*Citrus latifolia*) y limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). Universidad de Guadalajara
- Ruz L, Badosa E, Montesinos E (2004) Las proteínas de estrés en las plantas. *Cent Innovación y Desarrollo en Sanidad Vegetal Inst Tecnol Agroaliment* 159:49-51.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, et al (1996a) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, et al (1996b) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.
- Sabater JAB (2013) Estudio de las respuestas de defensa inducidas por elicitores de cultivos de células vegetales. Universidad de Murcia
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural P y A (2017) Jitomate Mexicano: Planeación agrícola nacional 2017- 2030. *Planeación Agrícola Nacional* 2017-2030 1:20.
- Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci* 163:1-10.
- Samaniego BY, Reyes A, Moreno OA, Tun JM (2017) Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Rev Protección Vegetal* 32:2224-4697.
- Santiago J, Borrego F (2016) Evaluación de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) en invernadero: criterios fenológicos y fisiológicos. *Agron Mesoam* 9:59. doi:

10.15517/am.v9i1.24633

Schulze ED, Beck E, Møller HK (2002) Plant ecology, 1.<sup>a</sup> edn. Springer Berlin Heidelberg, Germany

Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, et al (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. Plant Physiol. Biochem. 46:941-950.

Serrano M, Coluccia F, Torres M, et al (2014) The cuticle and plant defense to pathogens. Front Plant Sci 5:274. doi: 10.3389/fpls.2014.00274

Soto SIA/ LP (2017) Fitopatología- enfermedades en hortalizas: Alternaria en tomate.

Spoel SH (2019) Signal transduction in systemic immunity. Plant Cell 31:1412-1413.

Squeo FA, Cademil L (2007) Fisiología vegetal, Edition 1. Universidad de La Serena

Steiner AA (1984) The universal nutrient solution, 6.<sup>a</sup> edn. Lunteren, Netherlands.

Takken Flw, Di X, Gomila J (2012) Involvement of salicylic acid, ethylene and jasmonate acid signaling pathways in susceptibility of tomato for Fusarium oxysporum. doi: 10.1002/art.

Tambussi EA (2004) Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. Universidad de Barcelona

Targa RF (2002) El control de la expresión genética en su contexto natural. Ciencia-Acad Mex Ciencias 53:84-91. doi: 1405-6550

Torres A (2017) Manual de cultivo del tomate bajo invernadero, 12.<sup>a</sup> edn. Instituto de Investigaciones Agropecuarias

Torres GA (2000) Algunos aspectos de los hongos del genero Fusarium y de la especie Fusarium oxysporum. Agron Colomb 17:6.

Turlier M-F, Eparvier A, Alabouvette C (1994) Early dynamic interactions between Fusarium oxysporum f.sp. lini and the roots of Linum usitatissimum as revealed by transgenic GUS-marked hyphae. Can J Bot 72:1605-1612. doi: 10.1139/b94-198

- Urretabizkaya N, Vasicek A., Saini E (2010) Insectos perjudiciales de importancia agropecuaria: 1. Lepidópteros, 1.<sup>a</sup> edn. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, Buenos Aires
- Van Der Biezen EA, Jones JDG (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* 23:454-456. doi: 10.1016/S0968-0004(98)01311-5
- Vandana V V., Suseela Bhai R, Ramakrishnan Nair R, Azeez S (2019) Role of cell wall and cell membrane integrity in imparting defense response against *Phytophthora capsici* in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Eur J Plant Pathol* 154:359-375. doi: 10.1007/s10658-018-01661-3
- Vásquez RLM, Castaño ZJ (2017) Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión.
- Vázquez DDA, Salas PL, Preciado RP, et al (2016) Efecto del ácido salicílico en la producción y calidad nutracéutica de frutos de tomate. *Resvista Mex Ciencias Agrar* 17:11.
- Verpoorte R, Van Der Heijden R, Ten Hoopen HJG, Memelink J (1999) Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol. Lett.* 21:467-479.
- Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol* 16:123-132. doi: 10.1016/j.copbio.2005.02.001
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *J. Exp. Bot.* 64:1263-1280.
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* 111:1021-58. doi: 10.1093/aob/mct067

- Wasternack C, Hause B (2019) The missing link in jasmonic acid biosynthesis. *Nat Plants* 5:776-777. doi: 10.1038/s41477-019-0492-y
- Wianowska D, Gil M (2019) Critical approach to PLE technique application in the analysis of secondary metabolites in plants. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 114:314-325.
- Xu YI, Chang P-FL, Liu D, et al (1994) Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *Plant Cell* 6:1077-1085. doi: 47907-1 165
- Zhang L, Zhang F, Melotto M, et al (2017) Jasmonate signaling and manipulation by pathogens and insects. *J Exp Bot* 68:1371-1385. doi: 10.1093/jxb/erw478
- Zipfel C (2014) Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol* 35:345-351. doi: 10.1016/j.it.2014.05.004