



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL



**CUANTIFICACIÓN DE LOS GENES QUITINASA Y FENILALANINA AMONIO
LIASA (PAL) EN PLANTAS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)
TRATADOS CON BIOPROTECTORES.**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

EK XIU EDUARDO ADRIAN



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

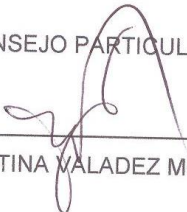
Chapingo, Estado de México, Noviembre de 2014

La tesis titulada **"Cuantificación de los genes quitinasa y fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratados con bioprotectores."**, fue realizada por Eduardo Adrian Ek Xiu bajo la dirección de la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, ha sido revisada por el H. Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

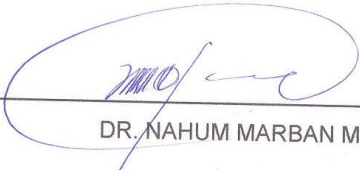
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR


DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR


DR. NAHUM MARBAN MENDOZA

ASESOR


DRA. NORMA MARINA ALARCÓN RODRIGUEZ

Chapingo, Estado de México. Noviembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional en todo momento. Mi madre Elizabeth quien en todo momento me ha brindado su apoyo.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, por haber permitido realizar mi maestría.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por dirigir la presente investigación, por su confianza, sabiduría y su amistad.

A la Dra Norma Marina Alarcón Rodríguez y al Dr. Nahúm Marbán Mendoza por su colaboración y asesoría durante el trabajo práctico de esta investigación.

Al departamento de Parasitología Agrícola, en especial al M.C. Camilo Hernández Juárez por permitirnos usar el termociclador en tiempo real del laboratorio de Virus.

Al CONACyT por la beca brindada para poder realizar los estudios de maestría.

A mis hermanos Luis, Andrés y Gustavo.

A mis amigos de la generación 51 de la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal por brindarme su amistad su apoyo y su compañerismo durante este tiempo con ellos.

A todos mis amigos de las demás generaciones a Marisol, Luisa, Edith, Marco, Lalin, Moy, Rafa, Mario y todos los demás que me faltó por mencionar.

A todos los profesores que en este camino compartieron sus conocimientos para enriquecer los míos.

DEDICATORIA

Dedicado con mucho cariño a mi madre Elizabeth Candelaria Xiu Dzul porque siempre he tenido su apoyo.

A mis hermanos, Luis, Andrés y Gustavo por ser mis primeros amigos en la vida y por todo lo que hemos pasado juntos.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de esta tesis nació en Hecelchakan, Campeche el 22 de marzo de 1988, estudió la primaria en la escuela “Carlos R. Menéndez” de la misma comunidad. Los estudios de secundaria los realizó en la Escuela Secundaria General N° 1 “Cabalan Macari” del Hecelchakan, Campeche.

El bachillerato lo realizó en el COBACH de Hecelchakan “José Ortiz Ávila” y tiene el título de Ingeniero Agrónomo del Instituto Tecnológico de Chína. Sus estudios de Maestría en Protección Vegetal fueron en la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
DATOS BIOGRÁFICOS.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
a) General.....	4
b) Específicos.....	4
3. HIPÓTESIS.....	5
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. El cultivo de jitomate.....	6
4.1.1. Generalidades.....	6
4.1.2. Botánica.....	7
4.1.3. Principales plagas en jitomate.....	8
4.1.4. Principales enfermedades en jitomate.....	10
4.2. Mecanismos de defensa de las plantas.....	13
4.2.1. Estructurales.....	14
4.2.2. Bioquímicos.....	15
4.3. Proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs)	15
4.3.1. Quitinasa (PR4)..	19
4.3.2. PAL.....	20
4.4. PCR en tiempo real.....	21
4.4.1. Generalidades de la técnica de PCR en tiempo real,.....	21
4.4.2. Fluoróforos.....	23
4.4.3. Genes endógenos.....	25
4.4.4. Gen GAPDH.....	26

4.5.	Expresión génica.....	26
4.5.1.	Método de ddCt.....	28
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1.	Lugar de trabajo.....	29
5.2.	Tratamientos.....	29
5.3.	Aplicación de tratamientos.....	31
5.4.	Riego y fertilización.....	32
5.5.	Toma de muestras.....	33
5.6.	Extracción y purificación de RNA.....	34
5.7.	Síntesis de cDNA.....	36
5.8.	Q-PCR.....	37
5.9.	Expresión génica por el método ddCt.....	40
6.	RESULTADOS.....	41
6.1	Cts de Quitinasa y PAL.....	41
6.2	Expresión de los genes de PAL y quitinasa.....	42
6.3	Porcentaje de sobre-expresión de Quitinasa y PAL.....	46
6.4	Expresión génica de Quitinasa y PAL por tratamiento.....	48
7.	DISCUSIÓN.....	49
8.	CONCLUSIONES.....	52
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Figura 1. Ruta de la actividad bioquímica para la expresión de las Proteínas Relacionadas a la Patogénesis. Fuente: Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, Camarena y De la Torre, 2007.	17
Figura 2. Ruta de los fenilpropanoides para la expresión de metabolitos secundarios. Fuente: Universidad de Antioquia, Aragon, 2010.	21
Figura 3. Actividad de la sonda para la detección de la fluorescencia. 1) desnaturalización: el primer y la sonda identifican la región del RNA alineado donde se unirán. 2) Unión del primer y de la sonda a la región del RNA identificado: la polimerasa empieza su actividad hacia la sonda. 3) Extensión: la polimerasa retira los nucleótidos de la sonda, conforme los va retirando el fluoróforo (F) se acerca al quencher (Q), este acercamiento hace perder energía al fluoróforo y produce la fluorescencia que el termociclador en tiempo real detecta. Fuente: www.biotalde.com	25
Figura 4. Plántulas de jitomate desarrolladas en condiciones de invernadero. Cada maceta tiene cinco plantas que conforman la unidad experimental.	31

Figura 5. Extracción de RNA. a) Muestras de hoja de cada tratamiento. b) Procesamiento de muestras. c) Separación de fases por centrifugación. d) Lavado de pastilla de RNA. e) Centrifugación. f) Resuspensión de pastilla de RNA en agua libre de nucleasas.

35

Figura 6. Síntesis de cDNA. a) 1000 nanogramos de RNA para empezar la síntesis de cDNA. b) Kit ImProm II™ Reverse Transcription System, de Promega para la síntesis de cDNA. c) Termoblock para las incubaciones a temperaturas altas. d) Gradilla con muestras para el Termociclador.

37

Figura 7. Q-PCR. a) Termociclador tiempo real BIO RAD CFX96™. b) Termociclador abierto para introducir las muestras. c) Colocación de las muestras en el orden requerido. d) Programación del termociclador desde la computadora.

39

Figura 8. Salida del equipo de Q-PCR para la interpretación de datos. Las curvas sigmoides son las muestras que salieron correctamente las otras aunque el equipo nos da un valor Ct pero no se usan, se tienen que repetir. En las celdas se muestra el diseño de la plaque en el que se colocaron las muestras. En la tabla de excel se muestran los valores Cts.

40

Grafica 1. Expresión génica de quitinasa ante todos los tratamientos.

44

<i>Grafica 2.</i> Expresión génica de PAL ante todos los tratamientos.	45
--	----

<i>Grafica 3.</i> Expresión génica de quitinasa y PAL por tratamiento. 3a Mas expresión de PAL con Oxicom Pre Plus Seco. 3b Mas expresión de quitinasa con Protecto RZH. 3c Mas expresión de PAL con la mezcla de Oxicom Pre Plus Seco mas Protecto RZH. 3d Mas expresión de PAL con Oxicom AG. 3e Mas expresión de quitinasa con Oxicom Pre Plus.	48
--	----

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1.</i> Principales plagas en jitomate. Fuente: Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C.	8
--	---

<i>Cuadro 2.</i> Principales enfermedades en jitomate. Fuente: Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C.	10
--	----

<i>Cuadro 3.</i> Clasificación de proteínas PR en diferentes plantas (Van Loon <i>et al.</i> , 2006).	18
---	----

<i>Cuadro 4.</i> Número de plántulas, tratamientos y aplicaciones.	30
--	----

<i>Cuadro 5.</i> Cálculos de los tratamientos para la primera aplicación.	32
---	----

<i>Cuadro 6.</i> Cálculos de los tratamientos para la segunda aplicación.	32
---	----

<i>Cuadro 7.</i> Cálculos de los tratamientos para la tercera aplicación.	32
---	----

<i>Cuadro 8.</i> Mix para síntesis de cDNA.	36
---	----

<i>Cuadro 9.</i> Temperaturas, tiempo y ciclos para la síntesis de cDNA.	36
--	----

<i>Cuadro 10.</i> Condiciones de reactivo para el PCR tiempo real.	38
<i>Cuadro 11.</i> Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos para el PCR tiempo real.	39
<i>Cuadro 12.</i> CTs del gen quitinasa y PAL comparados con su respectiva muestra del gen GAPDH.	41
<i>Cuadro 13.</i> Medias de expresión génica de quitinasa.	43
<i>Cuadro 14.</i> Medias de la expresión génica de PAL.	45
<i>Cuadro 15.</i> Porcentaje de sobre expresión de PAL, tomando el valor del testigo como el 100%. Los números negativos indican que no hubo sobre-expresión.	46
<i>Cuadro 16.</i> Porcentaje de sobre expresión de quitinasa, tomando el valor del testigo como el 100%. Los números negativos indican que no hubo sobreexpresión.	47

Cuantificación de los genes quitinasa y fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratados con bioprotectores

Quantification of chitinase genes and phenylalanine ammonia lyase in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) treated with bio-protectors

Eduardo Adrian Ek Xiu¹ y Ernestina Valadez Moctezuma²

RESUMEN

El cultivo de jitomate tiene gran cantidad de plagas, entre las que se incluyen bacterias, virus, hongos e insectos. Cuando la planta es atacada por estos patógenos se activan sus mecanismos de defensa. La aplicación de un tipo de sustancia bioprotectora puede inducir la producción de genes relacionados a la patogénesis los cuales protegen a las plantas contra patógeno y estrés biótico de diferente tipo. Se sembraron plantas de jitomate de la variedad SUN F1 en charolas de unicel, a los 20 días fueron trasplantadas 5 plantas en cada maceta, el sustrato usado fue Peat moss y agrolita en una proporción 2:1. Se realizaron 3 aplicaciones de 2500 ppm de bioprotectores, en total fueron 6 tratamientos. Los productos que se usaron fueron Oxycom Prep Plus seco (T1), Protecto RZH (T2), Oxycom Prep Plus seco+ Protecto RZH (T3), Oxycom Ag (T4) y Oxycom Prep Plus (T5), se usó agua como testigo (T6). Los riegos se realizaron cada tercer día con solución nutritiva Steiner 50%. Se tomaron muestras compuestas de hoja de cada maceta, las cuales se lavaron con agua destilada. Se obtuvo RNA total utilizando el protocolo de extracción de RNA con Trizol. La calidad y cantidad del RNA se cuantificó y verificó en un ND 1000 Spectrophotometer. Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA utilizando el kit ImProm IITM Reverse Transcription System.

La Q-PCR se realizó con un termociclador tiempo real BIO RAD CFX96TM, como endógeno se usó el gen GADPH y el fluoróforo fue FAM. Se realizó el análisis de la información y se obtuvieron los valores de expresión génica con el método ddCt. La aplicación de bioprotectores indujo en plantas de jitomate mayor expresión de genes de quitinasa y PAL, la mezcla de dos de ellos, Oxycom Pre Plus Seco más Protecto RZH fue la que mejor estimuló la expresión en PAL y para el caso de quitinasa el mejor tratamiento fue Oxycom Pre Plus.

Palabras clave: mecanismos de defensa, bioprotectores, proteínas relacionados a la patogénesis, Q-PCR, quitinasa, PAL.

1 Tesista

2 Director

ABSTRACT

Tomatoes are attacked by a large number of pests including bacteria, viruses, fungi and insects. When the plant is attacked by these pathogens, the plant's defense mechanisms are activated. The application of a bio-protective compound may induce the production of *pathogenesis-related genes* which protect plants against pathogens and biotic stress of different types.

Tomato plants of the variety SUN F1 were sown in *styrofoam seedling trays*, and 20 days later the seedlings were transplanted to pots, five seedlings per pot. The substrate used was Peat moss and perlite (2:1). Three applications at a rate of 2500 ppm of bioprotectors were performed, for a total of six treatments. The products used were Oxycom Prep Plus Dry (T1), Protecto RZH (T2), Oxycom Prep Plus Dry + Protecto RZH (T3), Oxycom Ag (T4) and Oxycom Prep Plus (T5), and water as a control (T6). Irrigation was done every other day with *Steiner's nutrient solution* at 50%. *Composite leaf samples* from each pot were taken and then washed with distilled water. Total RNA was extracted using the *RNA extraction protocol with Trizol*. The quality and quantity of RNA were quantified and verified on a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

Subsequent cDNA synthesis was performed using *The ImProm-IITM Reverse Transcription System kit*. RT-PCR was made using a BIORAD Real-Time thermal cycler CFX96TM, GADPH was used as an *endogenous* gene and fluorophore was FAM. Information was analyzed and gene expression was obtained using DDCT method.

The application of bio-protectors in tomato plants induced increased expression of chitinase genes and PAL, the mixture of two of bio-protectors; Oxycom PrePlus Dry+Protecto RZH produced an increase in PAL expression and Oxycom Pre Plus produced the highest expression of *chitinase*.

Keywords: mechanisms of defense, bio-protectors, *pathogenesis-related genes*, Q-PCR, chitinase, PAL.

1. INTRODUCCION

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los principales cultivos de hortalizas a nivel mundial, pertenece a la familia de las solanáceas, que incluye otras especies cultivadas de gran importancia como pimiento, patata, berenjena y tabaco. Las estadísticas de la FAO sitúan al tomate en el décimo puesto en la producción mundial de productos alimentarios y agrícolas en el 2010 con una producción de más de ciento cuarenta mil millones de toneladas al año.

El tomate representa un alto porcentaje de las plantas comerciales cultivadas en nuestro país. Este cultivo tiene una gran demanda entre los consumidores aunque su producción se ve afectada por una gran cantidad de plagas, entre las que se incluyen bacterias, virus, hongos e insectos.

Existen algunos mecanismos en las plantas para evitar la infección de las plagas, estos sistemas de defensa son los denominados activos y pasivos. Los sistemas pasivos se identifican porque la planta acumula sustancias tóxicas para protegerse del ataque de patógenos (Zhang *et al.*, 2003). Los sistemas activos se caracterizan por presentar una serie de eventos bioquímicos que activan y desactivan genes desencadenando la expresión de los mismos, los cuales se denominan genes de defensa (Van Ooijen *et al.*, 2007).

Es necesario generar tecnologías viables que permitan minimizar el problema de una manera eficaz. Es importante que estas tecnologías sean económicamente viables, para que el costo de su desarrollo no altere el precio final del producto. Estas tecnologías además deben ser seguras para que no

afecten a la salud de los productores y consumidores y que no generen impacto sobre el medio ambiente.

Es por ello, que la investigación biotecnológica en el campo de la biología molecular e ingeniería genética ha incursionado en el estudio de las técnicas para el análisis de expresión génica. El conocimiento de estos niveles de expresión es de gran interés, pues son útiles para deducir los procesos fisiológicos que involucran a las células y determinar su normal funcionamiento (Gachon *et al.*, 2004).

Conociendo el patrón de expresión génica, basado en la cantidad de transcrito detectado, podemos determinar si el comportamiento de la planta estudiada (en este caso el jitomate), es influenciado por un factor biótico o abiótico y de qué manera éste afecta al desarrollo de la planta y en consecuencia, a la producción.

Uno de los grupos de proteínas PR más importantes es el grupo de las PR-1, las cuales constituyen aproximadamente el 2% de las proteínas totales de la hoja. Sin embargo, estas proteínas son interesantes desde el punto de vista bioquímico, ya que su función es aún desconocida (Edreva, 2005).

Es así, que las proteínas PR (Pathogenic-Related) se sobreexpresan en las plantas en caso de infección patogénica (Kauffman *et al.*, 1987; Legrand *et al.*, 1987; Woloshuk *et al.*, 1991; Alexander *et al.*, 1993; Niderman *et al.*, 1995; Edreva, 2005).

Esta sobreexpresión es desencadenada por la acumulación del Ácido Salicílico mediante el llamado SAR (Systemic Acquired Resistance) (Ryals *et al.*, 1995; Ryals *et al.*, 1996).

Estudios previos sobre estas proteínas han reportado actividad antifúngica e inhibitoria contra *Phytophthora infestans* (Niderman *et al.*, 1995), lo cual puede ser de importancia para estudios de resistencia.

El control de plagas en el cultivo de tomate es un aspecto muy importante a tener en cuenta, pues el uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura es perjudicial, tanto para los agricultores como para los consumidores.

Es así que, el correcto uso de estos agentes químicos en adición a la respuesta defensiva natural de las plantas puede generar una producción más limpia. El conocimiento de este tipo de regulación hace posible el desarrollo de programas de mejoramiento genético, promoviendo el cruzamiento de las variedades con mejor respuesta a este tipo de estrés con variedades que presenten otro tipo de características económicamente aprovechables.

2. OBJETIVOS

a. General

Cuantificar la expresión de los genes quitinasa (PR4) y PAL a partir de plantas de jitomate expuestas a aplicaciones múltiples de Oxycom Prep Plus seco, Protecto RZH, Oxycom Prep Plus seco+ Protecto RZH, Oxycom Ag y Oxycom Prep Plus, para conocer qué tratamiento induce la mayor expresión de genes.

b. Específicos

- 1). Desarrollar plántulas de jitomate en condiciones de invernadero para someterlas a diferentes tratamientos con bioprotectores.
- 2). Colectar muestras de hoja de las plantas de jitomate previo y después de cada aplicación para obtener RNA total.
- 3). A partir del RNA purificado sintetizar cDNA para realizar Q-PCR
- 4). Cuantificar la expresión génica con el método ddCt de los genes correspondientes a quitinasa y PAL con la técnica de Q-PCR en tiempo real expuestos a los tratamientos con bioprotectores.
- 5). Graficar y analizar cuáles bioprotectores indujeron mayor expresión de los genes de quitinasa y PAL.

3. HIPÓTESIS

- La aplicación de bioprotectores induce en jitomate sobre-expresión de los genes de quitinasa y PAL.
- Con la aplicación de bioprotectores en plantas de jitomate sanas, se podrá conocer la expresión génica inicial y las variaciones que por efecto de diferentes bioprotectores aplicados se pudieran presentar.
- La aplicación de un tipo de sustancia bioprotectora puede incrementar la expresión de genes de defensa para la protección de las plantas; sin embargo, es posible que al combinar diferentes sustancias bioprotectores puedan estimular en mayor cantidad de genes y en su momento brindarle mayor protección a los cultivos.

4. REVISION DE LITERATURA

4.1 El cultivo de jitomate

4.1.1 Generalidades

El jitomate es una planta originaria de la planicie costera occidental de América del Sur, aunque se considera a México como su centro de domesticación. Según la FAO (2001) es la hortaliza que ocupa mayor superficie sembrada en todo el mundo, con alrededor de 3,593,490 ha, con una producción de 53,857,000 ton. En México se siembran alrededor de 80,000 ha con un rendimiento promedio de 28.7 ton/ha., por lo cual es la segunda hortaliza más importante por la superficie sembrada que ocupa; la más importante por su volumen en el mercado nacional, y la primera por su valor de producción (Nieto y Velasco, 2006).

En condiciones de campo abierto, se cultivan alrededor de 70, 000 ha, siendo los estados de Sinaloa, Morelos, San Luis Potosí, Baja California Norte y Michoacán los principales productores (Espinosa, 2004). Comercialmente se producen 45 millones de toneladas de jitomate por año en 2.2 millones de hectáreas (Rojop, 2008). Según la SAGARPA (2004) la demanda de jitomate en México es de 2.1 millones de toneladas, y la superficie cosechada en México es de 121,688 ha.

La oferta de jitomate aumenta continuamente, principalmente por el aumento de rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie

cultivada. El aumento de la producción en muchos países no ha correspondido, en muchos casos al mejoramiento del manejo de poscosecha y modernización del procesamiento en forma adecuada; el jitomate en fresco se consume principalmente en ensaladas, cocido o frito y en la actualidad este fruto es procesado para la elaboración de refrescos, homogenizando la pulpa con agua y azúcar, para la producción de salsas, purés, zumos, concentrados, conservas, como aderezo para la elaboración de determinados platos y en menor escala como encurtido (Rojop, 2008).

4.1.2 Botánica

Solanum lycopersicum L. (Solanales: Solanaceae)

Planta: Porte erecto o semierecto, arbustivo, cultivo de tipo anual. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas).

Fruto: El fruto es una baya ovalada, redonda o periforme. Su tamaño va desde pequeños frutos del tamaño de una cereza, hasta enormes frutos de 750 gr.

Flores: son radiales y tienen 5 estambres. Presenta ovario súpero, bicarpelar y contiene varios primordios seminales. Los carpelos se presentan en posición oblícua con respecto al plano de la flor (Nuez, 2001). Está formada por un pedúnculo corto, el cáliz es gamosépalo y la corola gamopétala con los estambres adheridos a la corola con las anteras que forman un tubo.

4.1.3 Principales plagas en jitomate

Cuadro 1. Principales plagas en jitomate. Fuente: Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C.

Nombre común/científico	Características	Imagen
Pulgón saltador o psílido del jitomate <i>Bactericera cockerelli</i> Sulc.	Insecto succionador de savia y transmisor de fitoplasmas, causa la enfermedad conocida como “permanente” en chile, jitomate y tomate de cáscara, así como “punta morada” en papa.	
Mosquita blanca/ <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood), <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius).	La importancia de esta plaga se debe a la gran capacidad de reproducción, en un corto periodo alcanza poblaciones de más de mil adultos por planta y la principal es la transmisión de virus.	
Trips/ <i>Thrips tabaci</i> Linderman y <i>Frankliniella occidentalis</i> Pergande.	Provocan daño directo al alimentarse ya que raspan la superficie de las hojas lo que ocasiona que la planta no realice adecuadamente la fotosíntesis, se deshidrate y puedan entrar enfermedades.	
Pulgones/ <i>Myzus persicae</i> Sulzer y <i>Aphis gossypii</i> Glover.	Ocasionan daños directos al succionar la savia provocando debilitamiento, pérdida de vigor, amarillamiento y deformaciones, excretan mielecilla la cual ocasionando la atracción del hongo <i>Capnodium</i> sp (fumagina) que reduce la fotosíntesis y calidad de frutos.	
Araña roja/ <i>Tetranychus urticae</i> Koch.	Ocasionan severos daños y cubre con telaraña al cultivo de jitomate, sobre todo en época seca y con alta temperatura. Tanto el adulto como las ninfas pican y absorben la savia de las hojas.	

Ácaro del bronceado/ <i>Aculops lycopersici</i> (Massee)	Afectan tallos, haz y envés de las hojas, éstas se tornan de color verde claro a un color café claro o bronceado, agrietan los frutos y la planta sufre una muerte descendente.	
Gusano soldado/ <i>Spodoptera exigua</i> (Hübner)	Se alimentan durante la noche devorando hojas y brotes tiernos y frutos.	
Gusano del fruto/ <i>Heliothis (=Helicoverpa) zea</i> (Boddie)	En jitomate las larvas se alimentan en sus primeros estadíos de follaje tierno del cultivo y conforme se van desarrollando llegan a dañar los frutos en formación.	
Gusano alfiler/ <i>Keiferia lycopersicella</i> (Walsingham)	El primer estado larvario comienza a perforar la hoja y es cuando se le confunde con los minadores, perfora frutos en el área del pedúnculo, son orificios pequeños poco notorios.	
Minador de la hoja/ <i>Liriomyza</i> sp	Las larvas perforan la lámina foliar y durante el proceso de la alimentación van formando galerías en forma de serpentinadas.	

4.1.4 Principales enfermedades en jitomate

Cuadro 2. Principales enfermedades en jitomate. Fuente: Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C.

Nombre común/científico	Características	Imágenes
Damping off/ <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora</i> sp, <i>Fusarium</i> sp	Esta enfermedad es muy común atacando plántulas de jitomate desde el vivero y primeras etapas de desarrollo en campo e invernadero. Los síntomas de esta enfermedad empiezan como plantas aisladas que después se extienden en manchones, las plántulas se entristecen como si fuera falta de agua pero al hacer una inspección minuciosa se encuentra tanto en la zona radicular como en el cuello al ras del suelo una pudrición acuosa y en algunos casos se puede observar el crecimiento de micelio del hongo.	
Pudrición radicular, marchitez causada por/ <i>Fusarium oxysporum</i> Schelecht	Ataca varias especies solanáceas. En plantas adultas de jitomate comienza con un amarillamiento de las hojas viejas que después se extiende a todas las hojas, después se marchitan y mueren aun adheridas al tallo. En un corte transversal se puede observar necrosis de color café rojizo en forma de anillo.	

Moho gris/ Botryotinia fuckeliana (De Bary) Whetzel (=Botrytis cinerea Pers.)	Este hongo infecta en cualquier etapa de desarrollo. Los daños pueden ser totales, considerada como una de las enfermedades importantes en invernadero. En hojas, tallos y flores produce tizones (polvo grisáceo) color café de forma irregular y anillos concéntricos.	
Tizón tardío/ <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) De Bary	Esta enfermedad ataca todos los tejidos aéreos de la planta, el síntoma típico en las hojas es la aparición de manchas irregulares de tamaño variable, son de color verde oscuro con los márgenes pálidos los cuales con alta humedad desarrollan esporulación blanquecina, después se vuelven de color café y pueden invadir toda la lámina foliar haciendo que el peciolo se doble hacia abajo, los frutos dañados presentan grandes manchas color café rojizo.	

Tizón temprano/ <i>Alternaria tomatophila</i> Simmons, y <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	Los primeros síntomas de la enfermedad se presentan en las hojas más viejas del cultivo en forma de lesiones irregulares de color café oscuro, en cuyo interior se forman anillos concéntricos que se rodean de un halo amarillo como consecuencia de la reacción del tejido sano a una toxina liberada por el desarrollo del hongo, al avanzar el proceso infectivo se forman puntos negros abultados que corresponden a la fructificación del hongo.	
Cenicilla polvorienta/<i>Leveillula taurica</i> (Lev.) Arnaud (Anamorfo: <i>Oidiopsis taurica</i> Tepper)	Los síntomas de la enfermedad aparecen primero como un polvillo de color blanco en el haz y envés de las hojas más viejas de la planta y en condiciones óptimas con alta presencia de inoculo ataca también las hojas jóvenes, mostrando manchas de color amarillo en el haz de las hojas, donde el hongo se reproduce y libera nuevas esporas.	

4.2 Mecanismos de defensa de las plantas.

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos. Bajo condiciones naturales, ellas interactúan además con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa. De acuerdo con los axiomas de resistencia planteados por Browning (1980), la resistencia y la avirulencia son la regla mientras que la susceptibilidad y la virulencia son la excepción. El autor propone además que la resistencia y la susceptibilidad son los extremos de un continuo y que la inmunidad es absoluta. Los genes que determinan la resistencia oligogenica y la susceptibilidad en la planta, son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno (Browning, 1980).

Las interacciones entre una planta y un microorganismo pueden mostrar varios tipos que van desde las relaciones altamente perjudiciales para el hospedante, hasta aquellas que benefician tanto al hospedante como al microorganismo. Como consecuencia de una estrecha co-evolución, muchos microorganismos se desarrollan de una forma patogénica solo en un ámbito limitado de hospedantes, frecuentemente a nivel de género, especie y subespecies. De forma similar, las especies y cultivares de plantas, por lo general son susceptibles solamente a pocas especies, aislamientos o razas de patógenos (Heath, 2000).

4.2.1 Estructurales.

Uno de los mecanismos de defensa más evidentes es la producción y deposición de sustancias que actúan como barreras físicas evitando el avance de patógenos. La lignificación puede ser una característica constitutiva en algunas especies pero también puede ocurrir como un proceso de refuerzo de los tejidos cuando están sujetos a daños físicos. La lignificación también se manifiesta durante la defensa a patógenos. La acumulación de lignina en grandes cantidades puede ocurrir de forma localizada en los tejidos atacados por patógenos. La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica; además la lignina es resistente a la degradación producida por muchos patógenos (Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

La síntesis de lignina, al igual que la síntesis de ciertas fitoalexinas, se deriva del metabolismo de los fenilpropanoides en donde la enzima PAL juega un importante papel regulador. Sin embargo, la síntesis *de novo* de otras enzimas, como la cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) y algunas peroxidasas, también ocurre durante la activación de la defensa contra los patógenos. Ciertas peroxidasas son encargadas de la polimerización de las unidades de fenilpropanoides que da lugar a la lignina (Barber *et al.*, 1997).

4.2.2 Bioquímicos.

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

4.3 Proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs).

Dentro de los sistemas activos se encuentra los denominados genes PR. Se afirma, por ejemplo que las proteínas PR ofrecen una resistencia contra el oomicete *Phytophthora infestans* en tabaco al provocar la desintegración de su pared celular evitando así su desarrollo (Woloshuk *et al.*, 1991).

Los genes PR se expresan de igual manera tanto en plantas resistentes como en susceptibles, constituyendo una barrera natural inicial para evitar la proliferación del patógeno (Edreva, 2005). Por lo que es de suma importancia estudiar la regulación y expresión de estos genes de defensa, puesto que

muchas de las características deseadas comercialmente se encuentran en plantas susceptibles, por ende las más afectadas.

Estas proteínas también llamadas *proteínas PR*, son un grupo variable que se acumulan en las plantas durante y después de la infección con patógenos. Las proteínas PR se identificaron inicialmente en tabaco durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco. Estas se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a las proteasas, de localización extracelular y con valores de pH extremos (Van Loon y Van Kammen 1970).

Las PR se acumulan después del ataque de un patógeno (virus, viroides, bacterias, hongos, oomicetos, insectos y herbívoros) y son activados por ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Sels *et al.*, 2008). Estas proteínas se han detectado e identificado en una amplia variedad de plantas y se clasifican de acuerdo a su actividad. En la Figura 1 se muestra la ruta de señalización que da lugar a la expresión de las proteínas PRs desde el ataque de un patógeno.

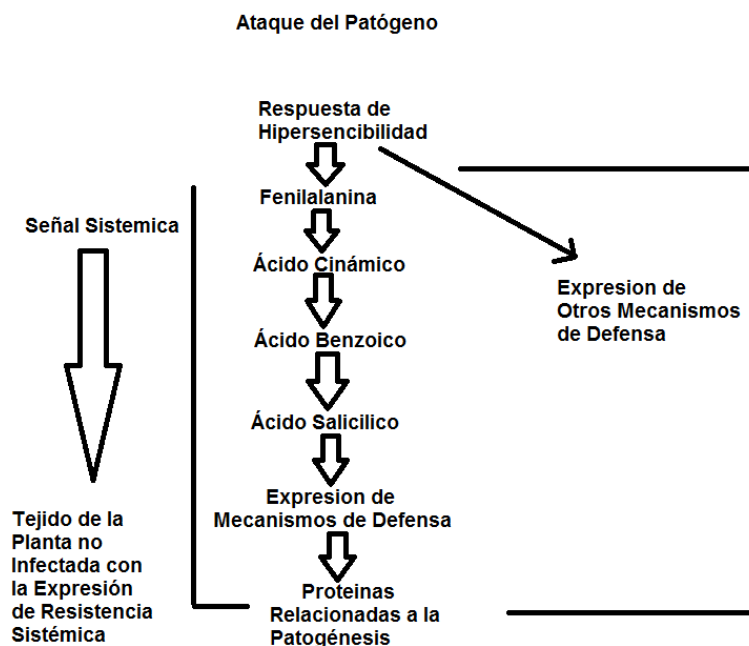


Figura 1. Ruta de la actividad bioquímica para la expresión de las Proteínas Relacionadas a la Patogénesis. Fuente: Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, Camarena y De la Torre, 2007.

La clasificación más simple se basa en los cinco grupos originalmente identificados para las proteínas PR de tabaco. Sin embargo, estas han sido identificadas tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas, lo que ha generado una nueva clasificación (Van Loon y Van Strien, 1999). A la fecha se conocen 17 grupos diferentes como se muestra en el Cuadro 3. Algunas de las proteínas PR poseen actividades definidas tal como las PR-2 (b-1,3-glucanasas) y PR-3 (quitinasas). Esto sugiere que la alta expresión de las glucanasas y las quitinasas durante la patogénesis tiene una función importante en la defensa contra patógenos que contienen b-1,3-glucano y quitina.

De hecho, plantas de trigo y arroz manipuladas genéticamente para sobre expresar ciertas quitinasas demostraron ser más resistentes a los hongos *Erysiphe graminis* y *Magnaporthe grisea* respectivamente (Bliffeld *et al.*, 1999; Nishizawa *et al.*, 1999).

A pesar de que algunas proteínas PR como las PR-2 y PR-3 poseen actividad antimicrobiana, aún se desconoce la función que tienen el resto de ellas durante las respuestas de defensa a patógenos y particularmente a patógenos virales.

Cuadro 3. Clasificación de proteínas PR en diferentes plantas (Van Loon *et al.*, 2006).

PR's	Planta en la que se detectó	Función
PR-1	Arroz, cebada, maíz, tomate, tabaco.	Engrosamiento de la pared celular
PR-2	Arroz, trigo, cebada, maíz, papa, tomate, tabaco, chile, frijol, soya, remolacha.	β , 1-3 glucanasa
PR-3	Arroz, maíz, tomate, chile, remolacha.	Quitinasa
PR-4	Tabaco, tomate, árbol de goma.	Quitinasa
PR-5	Arroz, trigo, cebada, avena, sorgo, papa, tomate, tabaco.	Alteración de la permeabilidad de la membrana del hongo.
PR-6	Cebada, tomate, papa, tabaco.	Inhibidor de proteinasa
PR-7	Tomate	Endoproteinasa
PR-8	Pepino	Quitinasa
PR-9	Tomate, arroz, tabaco, trigo.	Peroxidasa
PR-10	Papa, espárrago, guisante, frijol, arroz.	Ribonucleasa
PR-11	Tabaco	Quitinasa
PR-12	Arabidopsis, guisante, rabano.	Defensina
PR-13	Cebada	Tionina

PR-14	Cebada LTP4	Transferencia intracelular de lípidos
PR-15	Cebada	Oxalacetato oxidasa
PR-16	Cebada y trigo.	Parecida a oxalacetato oxidasa sin presentar esta actividad
PR-17	Trigo.	Peptidasa

4.3.1 Quitinasa (PR4)

La quitina es un polímero de Nacetilglucosamina (β 1.4- acetamida-D-glucosa), la cual está presente en los exoesqueletos de insectos, caparazones de crustáceos y en la pared celular de los hongos. La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Richard *et al.*, 2006).

La actividad de la quitinasa ha sido encontrada en numerosas bacterias y *Streptomicetos*, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados. Desempeña una función importante en el proceso de muda de los insectos y la digestión de alimentos quitinosos, y puede también servir como enzima potencialmente defensiva contra patógenos quitinosos (Trudel, 1989).

Varios derivados de la misma han recibido especial atención debido a su amplio rango de aplicaciones. Recientemente se demostró que oligómeros de quitina y el quitosano (quitina con baja acetilación) tienen actividades antitumorales, inmunoreguladoras, antibacterianas y antifúngicas (Shang *et al.*, 2004). Desde el punto de vista ambiental el polímero se ha utilizado para

remover un amplio intervalo de compuestos tóxicos como metales pesados y colorantes (Dao *et al.*, 2004).

4.3.2 PAL

En la actualidad se conoce que las plantas poseen una respuesta general a diferentes estreses, que involucran la activación de mecanismos de defensa tales como: el reforzamiento de la pared celular con formación de lignina, suberina, producción de compuestos antimicrobiales como fitoalexinas (Lange *et al.*, 2005)

La fenilalanina amonio liasa es una enzima de origen vegetal que degrada la fenilalanina a amonio y ácido transcinámico. La fenilalanina amonio-liasa (PAL) regularmente exhibe mayor actividad o síntesis *de novo* en los tejidos enfermos o en genotipos resistentes, y es precursora de la mayoría de los compuestos fenólicos (FEN), entre ellos las fitoalexinas y la lignina (Dixon y Harrison, 1991). La síntesis de estas sustancias se relaciona con el nivel de resistencia genética de la papa al oomiceto (Andreu *et al.*, 2000).

La fenilalanina amonioliase (PAL) pertenece a la clase de las liasas y cataliza la desaminación de la L-fenilalanina para producir ácido transcinámico y amonio, reacción que constituye el primer paso en la biosíntesis de los fenilpropanoides en plantas superiores, esta ruta de los fenilpropanoides se ilustra en la Figura 2 (Lister *et al.*, 1996). Mediante esta vía metabólica se

sintetizan compuestos como la lignina, suberina, fitoalexinas, flavonoides y compuestos fenólicos en general, cuya síntesis y acumulación es parte de la estrategia desarrollada por las plantas para evitar la infección de patógenos, por lo que la inducción de esta enzima es relevante en los mecanismos de defensa (Espinosa, 2004).

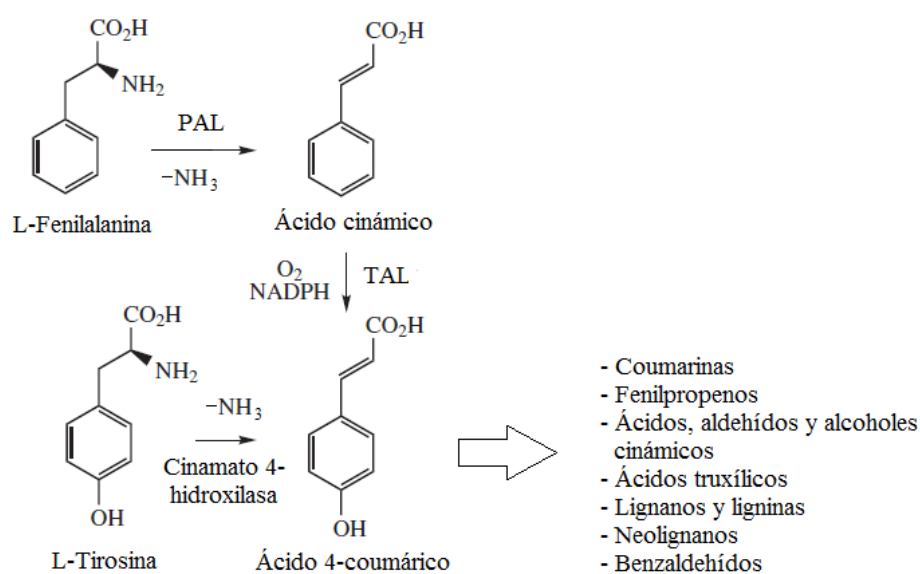


Figura 2. Ruta de los fenilpropanoides para la expresión de metabolitos secundarios. Fuente: Universidad de Antioquia, Aragon, 2010.

4.4 RT – PCR tiempo real

4.4.1 Generalidades

La PCR fue considerada como una revolución en la ciencia desde su invención por Kary Müllis en 1984 (Deepak *et al.*, 2007; Schaad y Frederick, 2002). A partir de allí y hasta el día de hoy la PCR ha experimentado grandes

avances, dentro de los cuales, la PCR en tiempo real constituye uno de sus más importantes.

La reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-PCR) es el método más sensible para la detección de ácido ribonucleico o RNA (Wang *et al.*, 1999). La reciente introducción de técnicas de fluorescencia a la PCR, en unión con la instrumentación capaz de amplificar, detectar y cuantificar los niveles de RNA, ha formado las bases de los ensayos cinéticos o los ensayos de RT-PCT en tiempo real (Holland *et al.*, 1991).

La PCR en tiempo real es uno de los mayores avances en el campo del desarrollo de la técnica, puesto que las aplicaciones de ésta abarcan desde la detección temprana de patógenos, pasando por estudios de discriminación alélica e identificación de genotipos, hasta los estudios de análisis de expresión de genes (Deepak *et al.*, 2007).

La PCR en tiempo real se divide en 4 fases principales: a) La fase inicial, en la cual la fluorescencia de los primeros ciclos es mínima y no rebasa el “*background*” del medio circundante. En esta fase se calcula la línea base; b) La fase exponencial temprana, en la cual la fluorescencia producida por el producto de PCR rebasa el umbral definido por el equipo, o por el investigador. El ciclo en el cual la fluorescencia ha alcanzado el umbral definido se conoce como *Ct* (*Cycle Threshold* o Ciclo umbral) (Applied Biosystems, 2009). Este

valor es representativo de la cantidad inicial de templado que hay en la reacción y es usado en los cálculos posteriores. Mientras más bajo es el valor de Ct, mayor es el número de copias del DNA templado en la reacción; c) La fase lineal, en la cual se alcanza un estado de amplificación óptima, en donde la cantidad de producto de PCR se dobla en cada ciclo y finalmente; d) La fase platea o estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha terminado (Wong y Medrano, 2005).

4.4.2 Fluoróforos

En los métodos de PCR “en tiempo real”, las moléculas del fragmento blanco que se amplifican se detectan al mismo tiempo que se generan (durante la fase exponencial de la amplificación), con base en varias estrategias que dependen de moléculas fluorescentes (fluoróforos) cuya emisión es proporcional al número de moléculas producidas, lo que permite hacer la prueba de forma cuantitativa (Qvarnstrom *et al.*, 2005). Un fluoróforo es una molécula que absorbe radiación de una longitud de onda determinada (luz UV o láser) y luego emite la energía absorbida en forma de luz de una longitud de onda determinada, pero diferente a la empleada para su excitación; esto hace posible su identificación. La utilización de fluoróforos también permite realizar reacciones de amplificación multiplex y detectar cada molécula blanco con un fluoróforo diferente (Wagenknecht, 2008).

El método más sencillo de detección de los productos de PCR en tiempo real es la aplicación de un fluoróforo marcador, como el SYBRgreen, el cual emite fluorescencia cuando se intercala en el surco mayor de la doble hélice del DNA. Otra forma de reconocer productos de PCR en tiempo real consiste en usar los *beacons* (“faros moleculares”). En este sistema se generan sondas que poseen un fluoróforo “principal” en el extremo 5’ (Reportero) y otro fluoróforo de menor intensidad en el extremo 3’ (*quencher*) con diferente espectro de emisión (*beacons*). Cuando estas sondas se encuentran como moléculas únicas se pliegan sobre sí mismas y la proximidad de los fluoróforos genera el efecto “FRET” (*fluorescence resonance energy transfer*), en el cual el fluoróforo secundario apaga la emisión del primario, en la Figura 3 se ilustra el mecanismo por el cual se produce la fluorescencia. Al ocurrir la reacción de PCR, el *beacon* forma parte de las moléculas amplificadas, con lo que el fluoróforo principal se separa del secundario y recupera su fluorescencia, de tal manera que la población de híbridos se puede medir porque su número es directamente proporcional a la magnitud de la fluorescencia. Los *beacons* pueden prepararse con diferentes fluoróforos, como SYBRgreen™, fluoresceína (FAM), Texas red, Rhodamina 6G, Cy3, Cy5, entre otros, y DABCYL como apagador, lo que posibilita realizar combinaciones para la detección multiplex (Wagenknecht, 2008; Espy, 2006).

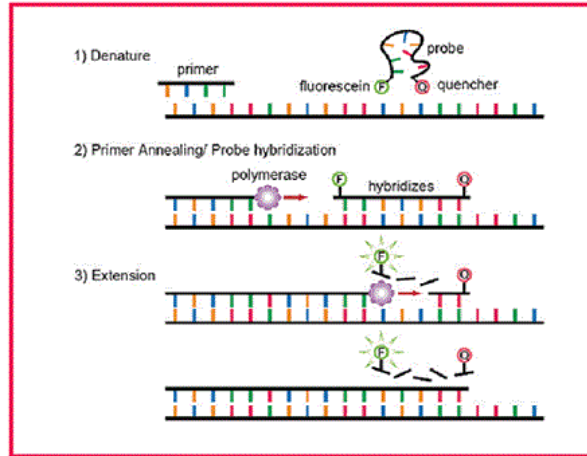


Figura 3. Actividad de la sonda para la detección de la fluorescencia. 1) desnaturalización: el primer y la sonda identifican la región del RNA alineado donde se unirán. 2) Unión del primer y de la sonda a la región del RNA identificado: la polimerasa empieza su actividad hacia la sonda. 3) Extensión: la polimerasa retira los nucleótidos de la sonda, conforme los va retirando el fluoróforo (F) se acerca al quencher (Q), este acercamiento hace perder energía al fluoróforo y produce la fluorescencia que el termociclador en tiempo real detecta. Fuente: www.biotalde.com

4.4.3 Genes endógenos

La medida de la expresión génica por medio de Q-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico, o normalizar respecto a la diferente concentración de RNA total de las muestras, ya que si la cantidad de control endógeno varia, es debido a cambios en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de cDNA, no a

cambios en su expresión. Los genes más utilizados como controles endógenos son: RNAr 18S, GAPDH, beta-actina, TBP, HPRT, beta-2-microglobulina, entre otros. No existe ningún gen cuya expresión no varía en ninguna de las condiciones, por lo que se debe valorar cual sería el control endógeno para el experimento (Vandesompele *et al.*, 2002).

4.4.4 Gen GAPDH

La Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima implicada en una de las reacciones más importantes de la glucólisis ruta de Embden-Meyerhof, puesto que cataliza un paso en el cual se genera el primer intermediario de elevada energía, y, además, genera un par de equivalentes de reducción (en forma de NADH). Químicamente, la reacción implica la oxidación del carbonilo del gliceraldehído-3-fosfato hasta un carboxilo, lo que es exergónico en condiciones estándar; en la reacción *in vivo*, en la que se aprovecha esta energía para generar un compuesto de alta energía, en cambio, la reacción es ligeramente endergónica, pues parte de esta energía queda almacenada en un grupo acil-fosfato, o anhídrido de ácido carboxílico-fosfórico. Además, la enzima requiere la coenzima NAD^+ a fin de rescatar los electrones producto de la oxidación del sustrato (Mathews y Van Holde, 2003).

4.5 Expresión génica

La expresión génica es un proceso biológico mediante el cual la célula transforma la información codificada en el DNA a proteínas a través de la

producción del RNA mensajero (RNAm) mediante el proceso de traducción. La expresión génica de un determinado gen en una célula puede ser cuantificada por la cantidad de proteína producida por la célula o, por la cantidad producida de RNAm del gen en estudio, la cual es la más utilizada actualmente. La cuantificación de la expresión génica mediante los métodos clásicos (*Northern Blot*) requiere de cantidades de RNAm difíciles de obtener cuando el número de muestras experimentales es limitado. Es por ello que el uso de la PCR en tiempo real ha resuelto estos inconvenientes reduciendo en gran medida la cantidad de RNAm utilizado (Rivas, 2010).

Existen principalmente dos métodos de cuantificación, dependiendo si la eficiencia de amplificación del gen objeto de estudio y el del gen de referencia son comparables: Método del ddCt, en el que se comparan directamente los Cts del gen testado y gen de referencia (dCt) en cada muestra, y posteriormente se comparan los dCt de la muestras experimental con respecto a la muestra control, para aplicar dicho método es necesario que las eficiencias de ambos genes sean similares. El otro método se basa en la utilización de una recta estándar a partir de cDNA de concentraciones conocidas, y extrapolar la concentración del gen en la muestra experimental a partir del Ct obtenido, posteriormente se calcularía la relación entre la cantidad del gen testado y el gen de referencia, y se compararía dicha relación entre las muestras (Pfaffl, 2001).

4.5.1 Método de ddCt

En los métodos de cuantificación relativa, se miden los cálculos de la expresión génica en función de un estándar externo o, una muestra de referencia, también conocida como calibrador (Wong y Medranno, 2005).

Para los cálculos de expresión relativa, es necesario el empleo de un gen de control interno o referencia. Los genes de referencia son genes cuya expresión es estable en las células, es decir, no varían su expresión bajo las condiciones experimentales. Muchos de estos genes son indispensables para la supervivencia celular y son utilizados para validar los estudios de expresión relativa (Rivas, 2010).

Se han desarrollado varios modelos matemáticos para el cálculo de la expresión génica relativa. Sin embargo, el método del ddCt (Livak y Schmittgen, 2001) es el más empleado.

El método del ddCt es un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia entre una muestra experimental y una muestra calibrador. Este método es muy útil y es de mayor uso por parte de investigadores, además que los softwares de los equipos de PCR en tiempo real incluyen este método por *default*. Este método incluye una corrección no ideal de la eficiencia de amplificación en el cual la eficiencia de la amplificación del gen *target* y el gen de referencia es aproximadamente igual (Rivas, 2010).

La fórmula del metodo ddCt es la siguiente:

$$2^{(- ddCt)} = \text{Expresión génica}$$

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Lugar de trabajo

La investigación se realizó en los invernaderos de la Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, Estado de México. Así como en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la misma institución.

Se sembraron semillas de plantas de jitomate variedad SUN F1 en charolas de unicel en suelo peat moss para su germinación y desarrollo inicial. Posteriormente las plántulas se trasplantaron a macetas. Se pusieron 5 plantas por maceta, la cual se consideró como una unidad experimental. Se usó como sustrato volumen de 1/3 de agrolita y 2/3 de peat moss.

5.2 Tratamientos

Se usó como unidad experimental una maceta con 5 plantas de jitomate y se pusieron a un metro del suelo, se realizaron 5 tratamientos más el testigo con tres repeticiones cada uno, Figura 4.

Se consideraron 9 plantas por tratamiento, el cual se dividió en 3 grupos; las primeras 3 se utilizaron para la primera aplicación, las 3 siguientes para la segunda y las últimas tres para la tercera aplicación. Esto para mediar la expresión de genes con la acumulación de los productos durante las tres aplicaciones. Cada aplicación se realizó con intervalos de 20 días como se muestra en el Cuadro 4.

La empresa Cosmotel S. A. fue la que proporciono los productos que se usaron, y fueron Oxycom Prep Plus seco (T1), Protecto RZH (T2), Oxycom Prep Plus seco + Protecto RZH (T3), Oxycom Ag (T4) y Oxycom Prep Plus (T5), usando agua como testigo (T6).

Cuadro 4. Número de plántulas, tratamientos y aplicaciones.

Productos			1ra Aplicación	2da Aplicación	3ra Aplicación				
Tratamiento	Oxycom Prep Plus Seco	R1	1	5	5	5	5	15 plantas	
		R2	1	5	5	5	5		5
		R3	1	5	5	5	5		5
	Proteco RZH	R1	1	5	5	5	5	5	15 plantas
		R2	1	5	5	5	5	5	
		R3	1	5	5	5	5	5	
	Oxycom Prep Plus seco+ Proteco RZH (Mezcla)	R1	1	5	5	5	5	5	15 plantas
		R2	1	5	5	5	5	5	
		R3	1	5	5	5	5	5	
	Oxycom AG	R1	1	5	5	5	5	5	15 plantas
		R2	1	5	5	5	5	5	
		R3	1	5	5	5	5	5	
	Oxycom Prep Plus	R1	1	5	5	5	5	5	15 plantas
		R2	1	5	3	3	3	3	
		R3	1	5	3	3	3	3	
	Control	R1	1	5		5		5	15 plantas
Intervalo entre aplicación (días)			20	20					
Edad planta en cada aplicación (días)		25	45	65					

Número de plantas a muestrear antes de la aplicación

Número de plantas a muestrear 24 horas después del tratamiento





Figura 4. Plántulas de jitomate desarrolladas en condiciones de invernadero. Cada maceta tiene cinco plantas que conforman la unidad experimental.

5.3 Aplicación de los tratamientos

Cada tratamiento consistió de una solución que contenía 2500 ppm de cada producto. La cantidad de producto fue mezclado en 200 mL de agua para aplicar a cada maceta, en la primera aplicación como son 9 macetas por tratamiento nos da 1800 mL para todo el tratamiento, por lo tanto se preparó 2 litros de la solución, Cuadro 5, para la segunda aplicación solo eran 6 macetas por tratamiento ya que los volúmenes totales de la mezcla para la aplicación se redujeron debido a que las primeras plantas ya no era necesario aplicarles, cuadro 6, quedando la primera aplicaciones de 1800 mL, la segunda de 1200 mL y la tercera en 600 mL, Cuadro 7.

Se hicieron los cálculos de ppm con la fórmula:

$$C1 V1 = C2 V2$$

Cuadro 5. Cálculos de los tratamientos para la primera aplicación.

Producto	Gramos o mililitros requeridos para 2500 ppm/2 litros de agua
Oxicom pre plus seco	5 g
Protecto RZH	5 ml
Oxicom pre plus seco + Protecto RZH	2.5 g + 5 ml
Oxicom AG	4.67 ml
Oxicom pre plus	4.42 ml
Control (agua)	-

Cuadro 6. Cálculos de los tratamientos para la segunda aplicación.

Producto	Gramos o mililitros requeridos para 2500 ppm/1.4 litros de agua
Oxicom pre plus seco	3.5g
Protecto RZH	3.5 ml
Oxicom pre plus seco + Protecto RZH	1.75 g + 1.75 ml
Oxicom AG	3.27 ml
Oxicom pre plus	3.1 ml
Control (agua)	-

Cuadro 7. Cálculos de los tratamientos para la tercera aplicación.

Producto	Gramos o mililitros requeridos para 2500 ppm/0.7 litros de agua
Oxicom pre plus seco	1.75g
Protecto RZH	1.75 ml
Oxicom pre plus seco + Protecto RZH	0.87 g + 0.87 ml
Oxicom AG	1.63 ml
Oxicom pre plus	1.55 ml
Control (agua)	-

5.4 Riego y fertilización

Los riegos se realizaban cada tercer día con solución nutritiva Steiner al 50%. Para preparar la solución Steiner se necesita las siguientes sustancias: Nitrógeno 167 ppm, Fósforo 31 ppm, Potasio 277 ppm, Magnesio 49 ppm, Calcio 183 ppm, Azufre 67 ppm, Hierro 3 ppm, Manganeso 1.97 ppm, Boro 0.44

ppm, Zinc 0.11 ppm, Cobre 0.02 ppm, Molibdeno 0.007 ppm. Todo esto diluido en 100 litros de agua. Para lograr estas concentraciones se usó: Nitrato de Calcio 98.918 g, Sulfato de Magnesio (Sal de Epsom) 49.494 g, Nitrato de Potasio 9.126 g, Dihidrógeno Fosfato de Potasio (KH_2PO_4) 13.608 g, Sulfato de Potasio 45.132 g, Quelato de Hierro (EDTA) 3 g, Sulfato de Manganeso 0.19 g, Ácido Bórico en polvo 0.251 g, Sulfato de Zinc 0.0300 g, Sulfato de Cobre 0.0070 g, Molibdato de Sodio 0.0012 g. Esto se mezcló en 200 litros de agua y quedó al 50% de concentración (Steiner, 1984).

Cada tercer día se regaban las macetas con 200 mL de la solución Steiner al 50%, y antes de cada aplicación no se regaba.

5.5 Toma de muestras

Para el análisis de expresión de genes se tomaron muestras de hoja, antes y después de cada aplicación. Se utilizaron 6 hojas por maceta de las diferentes plantas, considerando las hojas más jóvenes.

Las muestras se lavaron primero con agua de la llave y luego con agua destilada para eliminar contaminantes, después se colocaron en bolsas de polietileno y se mantuvieron en nitrógeno líquido para conservar el tejido hasta la extracción de RNA.

5.6 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó con Trizol como se ilustra en la Figura 5 y se siguieron los pasos que a continuación se describen.

Se pesaron 100 microgramos de hoja inmediatamente muestra por muestra se maceraron en mortero y pistilo previamente esterilizados y fríos, y usando nitrógeno líquido al momento de macerar para ayudar a que la muestra quedara como un polvo fino. El polvo fino de tejido se transfirió a un tubo de 2 mL con una espátula esterilizada con alcohol, a éste tubo se le añadió 1 mL de Trizol y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, luego se adicionaron 200 microlitros de cloroformo, se agito por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos.

Los tubos se centrifugaron a 12000 xg (gravidades) por 15 minutos y al salir los tubos de la centrifugadora se observaron 3 fases, transfiriéndose a un tubo nuevo la fase superficial evitándola contaminación con las otras. Se adicionaron 500 µL de isopropanol y se incubó la muestra por 10 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó nuevamente a 12000 xg por 10 minutos (después de este paso, es posible observar precipitada en el fondo del tubo una pastilla blanca que corresponde al RNA).

Se desechó todo el líquido del tubo, cuidando de no perder la pastilla blanca y se añadió un mL de etanol 75%, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 7500 xg por 5 minutos.

Se desechó el alcohol sin tocar la pastilla y se secó por unos segundos. La pastilla se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas y se incubó en el termoblock a una temperatura de 55 a 60°C durante 10 minutos, por último las muestras se guardaron en congelación.

Luego de la extracción de RNA, éste se cuantificó con el espectrofotómetro. Posteriormente se hicieron diluciones de alrededor de 250 nanogramos/microlitro, para la reacción de la síntesis de cDNA.



Figura 5. Extracción de RNA. a) Muestras de hoja de cada tratamiento. b) Procesamiento de muestras. c) Separación de fases por centrifugación. d) Lavado de pastilla de RNA. e) Centrifugación. f) Resuspensión de pastilla de RNA en agua libre de nucleasas.

5.7 Síntesis de cDNA.

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se utilizó el kit ImProm II™ Reverse Transcription System, de la empresa Promega. La síntesis de cDNA se realizó con los siguientes pasos y como se ilustra en la Figura 6.

En un tubo de 200 µL se colocó la cantidad de RNA correspondiente a 1000 nanogramos, se añadió un microlitro de oligo dt y se aforó a 5 microlitros con agua libre de nucleasas inmediatamente se incubó a 70°C por 5 minutos en el termoblock, se colocó en el congelador por 5 minutos y se aplicó spin por 10 segundos a 12000 xg. Al salir de la centrifugadora se añadió el mix que se representa en el Cuadro 8. Por último se incubó con las condiciones de temperatura y tiempo que se ilustra en el Cuadro 9.

Cuadro 8. Mix para síntesis de cDNA.

Reactivo	Concentración	1x
Buffer 5X	1 X	4 µL
MgCl ₂	4 mM	2.4 µL
dNTP's mix	0.5 mM	1 µL
RNasin	20 u	0.5 µL
Enzima Reverso Transcriptasa	20 u	1 µL
Agua		6.1 µL

Cuadro 9. Temperaturas, tiempo y ciclos para la síntesis de cDNA.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
25 °C	5 minutos	Un ciclo
41 °C	60 minutos	
70 °C	15 minutos	



Figura 6. Síntesis de cDNA. a) 1000 nanogramos de RNA para empezar la síntesis de cDNA. b) Kit ImProm II™ Reverse Transcription System, de Promega para la síntesis de cDNA. c) Termoblock para las incubaciones a temperaturas altas. d) Gradilla con muestras para el Termociclador.

5.8 Q- PCR

La Q-PCR se realizó con un termociclador tiempo real BIO RAD CFX96™, Figura 7, como endógeno se usó el gen GADPH y el fluoróforo fue FAM.

Para la realización de la técnica de Q-PCR se utilizó el mix representado en el Cuadro 10 y se utilizaron los siguientes reactivos:

A). IQTMSupermix (BIO-RAD) que contiene buffer, dNTPs, iTaqDNApol, MgCl₂ 6 mM y estabilizadores.

B) Sondas Prime TimeTM Std qPCR marcada con FAM. Las sondas corresponden a una región complementaria de la secuencia de cada gen de interés.

Para las mezclas de reacción se utilizaron concentraciones finales: IQTMSupermix 1X; 25 pM de sonda y 200 ng de cDNA por reacción (mezcla compuesta de los cDNA de cada repetición) en un volumen final de 10 µL. las temperaturas y tiempos para la Q-PCR se ilustra en el Cuadro 11.

Se cuantificó la expresión génica de los genes de interés (quitinasa y PAL) en 5 tratamientos más el testigo con 3 repeticiones, durante 3 aplicaciones. En cada aplicación se tomaron muestras antes y después de los tratamientos.

El gen endógeno es el que se usa para hacer el cálculo de expresión génica mediante la fórmula de ddCt comparativo. Por cada muestra que se analiza en el termociclador se debe considerar también una del endógeno que es con el que se comparará posteriormente.

Cuadro 10. Condiciones de reactivo para el PCR tiempo real.

Componentes	Inicial	Final	Volumen final
IQ super mix	2 x	1 x	5 µL
Sonda	10 picomoles	25 picomoles	2.5 µL
Agua	-	-	1.5 µL
cDNA	200 nanogramos	200 nanogramos	1 µL

Cuadro 11. Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos para el PCR tiempo real.

95 °C	3 minutos	1 ciclo
94 °C	30 segundos	35 ciclos
60 °C	30 segundos	
72 °C	45 segundos	

Para mejor manipulación se preparó un mix del gen a evaluar y otro mix con el gen endógeno (GAPDH)

Mix del gen a evaluar

IQ super mix + sonda (gen a evaluar) + agua

Mix del gen endógeno

IQ super mix + sonda (GAPDH) + agua

Las gráficas y el cálculo de la expresión génica se realizaron con la media de los valores Ct (ciclo a partir del cual se detecta la señal para realizar la cuantificación del nivel de expresión).

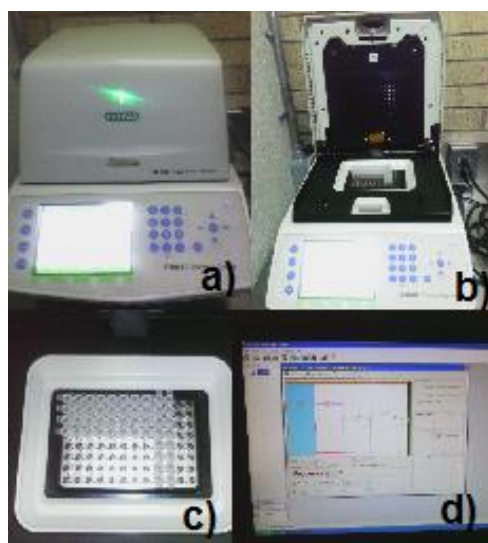


Figura 7. Q-PCR. a) Termociclador tiempo real BIO RAD CFX96™. b) Termociclador abierto para introducir las muestras. c) Colocación de las muestras en el orden requerido. d) Programación del termociclador desde la computadora.

5.9 Expresión génica por el metodo ddCt

Para hacer los cálculos de expresión génica se toman los valores Cts de Quitinasa, PAL y del GAPDH. Primero se obtiene el dCt del gen calibrador por medio de la diferencia del Ct del testigo menos el Ct del GAPDH.

Se restó Ct del gen de importancia menos el Ct de su endógeno correspondiente y el resultado es el valor dCt del gen de interés. Al dCt del gen de interés se le resta el Ct del gen calibrador (este gen calibrador es un valor único que se le restara a todos los dCts) y al resultado se le llama ddCt, a este último valor se le aplica la fórmula $2^{(-ddCt)}$.

La salida de resultados para la interpretación se muestra en la Figura 8.

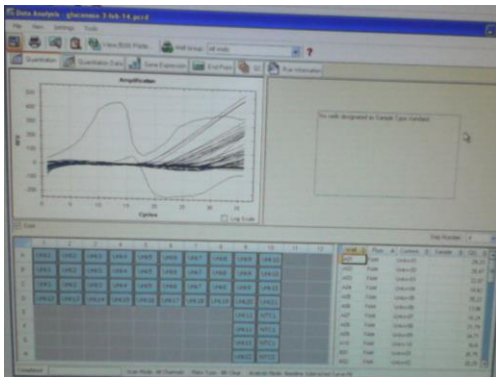


Figura 8. Salida del equipo de Q-PCR para la interpretación de datos. Las curvas sigmoides son las muestras que salieron correctamente las otras aunque el equipo nos da un valor Ct pero no se usan, se tienen que repetir. En las celdas se muestra el diseño de la plaqueta en el que se colocaron las muestras. En la tabla de excel se muestran los valores Cts.

6. RESULTADOS

6.1 Cts de Quitinasa y PAL

El valor Ct es el número de ciclo donde el termociclador detecta la variación de la expresión de las muestras, conforme el Ct es menor quiere decir que hay más expresión de los genes.

Los genes endógenos nos sirven para comparar con el gen de interés ya que la muestra está tratada exactamente con las mismas condiciones y a partir de una formula, la de ddCt, se comparan los Cts del gen endógeno con el gen de interés. A continuación se muestra en el Cuadro 12 los CTs obtenidos tanto del gen quitinasa y PAL comparándolo con su respectiva muestra de GAPDH.

Cuadro 12. CTs del gen quitinasa y PAL comparados con su respectiva muestra del gen GAPDH.

Tratamiento	Cts de PAL		Cts de Quitinasa	
	Quitinasa	GAPDH	Quitinasa	GAPDH
Antes de la primera aplicación				
Control	28.93	25.62	25.94	23.31
Después de la Primera aplicación				
T1	22.12	17.31	17.38	17.78
T2	24.13	18.7	16.71	16.76
T3	23.73	18.73	18.55	18.18
T4	24.77	19.29	19.46	17.46
T5	24.1	22.3	21.43	18.95
T6	26.74	24.32	17.87	17.26
Antes de la segunda aplicación				
T1	28.15	30.13	31.16	30.61
T2	28.92	30.13	27	30.64
T3	29.02	30.13	28.35	31.35
T4	28.25	30.13	27.44	30.61

T5	22.19	25.26	24.01	30.64
T6	32.66	33	31.15	31.35
	Después de la segunda aplicación			
T1	29.2	30.33	26.79	28.72
T2	26.78	28.06	24.74	28.42
T3	29.28	33.4	26.97	27.31
T4	30.14	33.77	28.98	28.15
T5	31.56	33.57	28.33	28.15
T6	29.18	29.53	27.98	28.15
	Antes de la tercera aplicación			
T1	32.45	31.63	33.9	28.27
T2	NA	NA	33.23	34.73
T3	30.27	30.23	30.17	31.93
T4	28.42	29.56	26.63	29.13
T5	NA	NA	NA	NA
T6	NA	NA	NA	NA
	Después de la tercera aplicación			
T1	29.64	28.07	31.24	29.2
T2	30.08	28.88	31.48	31.53
T3	32.61	28.37	30.76	31.19
T4	30.32	32.32	24.6	25.7
T5	30.34	28.62	29.45	31.67
T6	26.89	25.2	NA	NA

6.2 Expresión de los genes de PAL y quitinasa

Los tratamientos afectaron de manera diferente a los genes considerados en el análisis; pero la generalidad observada, fue que los niveles de expresión variaron de manera positiva respecto al gen endógeno GADPH.

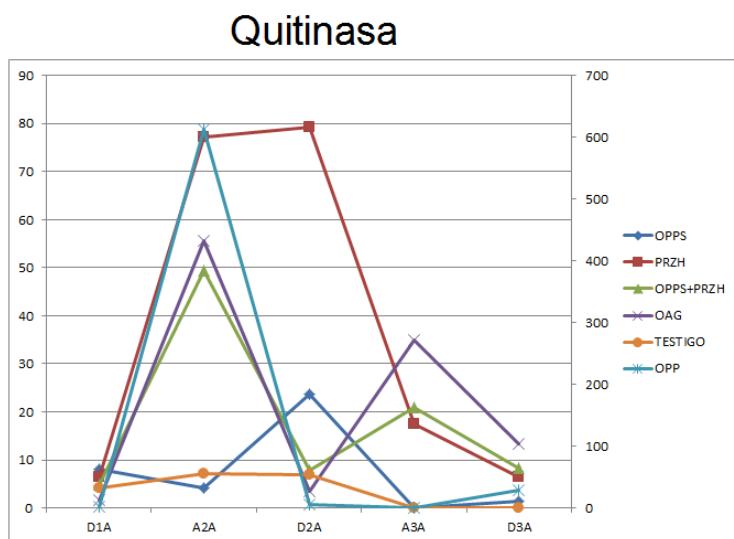
Para el caso del gen quitinasa desde la primera aplicación se notó el incremento de transcritos, principalmente con los bioprotectores Protecto RZH con un valor de 77.1717 (color rojo) y Oxicom Pre Plus con valor de 613.1090 (color azul cielo), que después de 20 días de la primera aplicación se observaron picos más altos en las gráficas. En el caso de Oxicom Pre Plus

Seco con valor de 23.5883, el gen quitinasa se expresó hasta después de la segunda aplicación y el testigo fue el más bajo en la expresión génica. Aunque los picos más altos de expresión génica de quitinasa se lograron con Oxicom Pre Plus y Protecto RZH en la segunda aplicación. Con la mezcla de Oxicom Pre Plus Seco mas Protecto RZH (color verde) y Oxicom AG (color morado) se expresó en la primera aplicación y también en la tercera lo cual durante 40 días seguía habiendo expresión de quitinasa, Cuadro 13 y Grafica 1.

Cuadro 13. Medias de expresión génica de quitinasa.

Después de la Primera aplicación		Antes de la segunda aplicación		Después de la segunda aplicación	
OPPS	8.1680	OPPS	4.2280	OPPS	23.5883
PRZH	6.4085	PRZH	77.1717	PRZH	79.3412
OPPS+PRZH	4.7899	OPPS+PRZH	49.5220	OPPS+PRZH	7.8353
OAG	1.5475	OAG	55.7152	OAG	3.4822
OPP	1.1095	OPP	613.1090	OPP	5.4641
TESTIGO	4.0558	TESTIGO	7.1107	TESTIGO	6.9644
Antes de la tercera aplicación		Después de la tercera aplicación			
OPPS	0.125	OPPS	1.5052		
PRZH	17.5086	PRZH	6.4085		
OPPS+PRZH	20.9662	OPPS+PRZH	8.3397		
OAG	35.0173	OAG	13.2691		
OPP		OPP	28.8400		
TESTIGO		TESTIGO			

Grafica 1. Expresión génica de quitinasa ante todos los tratamientos.

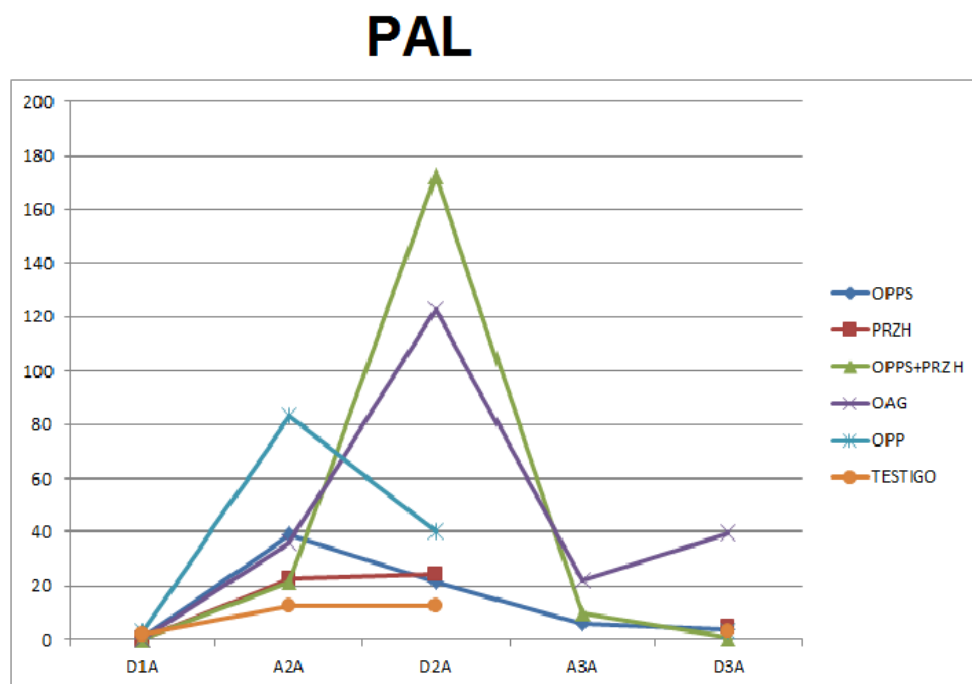


Para el caso de PAL todos los tratamientos mostraron incremento en la expresión del gen, alcanzándose los niveles más altos en la segunda aplicación, es decir a los 40 días con dos tratamientos, uno integrado por la mezcla de Oxicom Pre Plus Seco más Protecto RZH que alcanzó el valor de 172.4458 (color verde) y con el tratamiento de Oxicom AG que alcanzó el valor de 122.7858 (color morado), los otros tratamientos alcanzaron buena expresión del gen PAL en la primera aplicación, en la tercera aplicación todos los tratamientos bajaron aunque se notaba que seguía habiendo expresión génica de PAL, Cuadro 14 y Grafica 2.

Cuadro 14. Medias de la expresión génica de PAL.

Después de la primera aplicación		Antes de la segunda aplicación		Después de la segunda aplicación	
OPPS	0.3535	OPPS	39.1244	OPPS	21.7056
PRZH	0.2300	PRZH	22.9432	PRZH	24.0839
OPPS+PRZH	0.3099	OPPS+PRZH	21.4068	OPPS+PRZH	172.4458
OAG	0.2222	OAG	36.5044	OAG	122.7858
OPP	2.8481	OPP	83.2858	OPP	39.9465
TESTIGO	1.8531	TESTIGO	12.5533	TESTIGO	12.6406
Antes de la tercera aplicación		Después de la tercera aplicación			
OPPS	5.6177	OPPS	3.3403		
PRZH		PRZH	4.3169		
OPPS+PRZH	9.6464	OPPS+PRZH	0.5248		
OAG	21.8566	OAG	39.6706		
OPP		OPP	3.0104		
TESTIGO		TESTIGO	3.0737		

Grafica 2. Expresión génica de PAL ante todos los tratamientos.



6.3 Porcentaje de sobre expresión de Quitinasa y PAL

También se calculó el porcentaje de sobre expresión de genes considerando los valores de expresión génica, tomando el valor del testigo como el 100% y comparando el valor de cada tratamiento con el testigo se obtuvo el porcentaje de sobre expresión. La sobre expresión indicó en porcentaje la expresión del gen respecto al testigo, sin importar cual tuvo el pico de expresión más alto.

Para el gen PAL se observa que el porcentaje de sobre expresión es muy alto con el tratamiento de Oxicom AG, alcanzando hasta 1190.64 % al final de la tercera aplicación. El tratamiento con Oxicom Pre Plus fue el único que tuvo sobre expresión desde la primera aplicación con 53.69 %. El tratamiento con Oxicom Pre Plus Seco y el de Protecto RZH perdieron sobre expresión antes de la tercera aplicación pero cuando se volvió a aplicar se volvió a sobre expresar en 8.67 % para Oxicom Pre Plus Seco y 40.44 % para Protecto RZH, a diferencia del tratamiento con la mezcla de Oxicom Pre Plus Seco mas Protecto RZH que mantuvo sobre expresión hasta antes de la tercera aplicación, Cuadro 15.

Cuadro 15. Porcentaje de sobre expresión de PAL, tomando el valor del testigo como el 100%. Los números negativos indican que no hubo sobre expresión.

	D1A	A2A	D2A	A3A	D3A
OPPS	-80.92	211.66	71.71	-27.32	8.67
PRZH	-87.58	82.76	90.52	-100	40.44
OPPS+PRZH	-83.27	70.52	1264.22	24.79	-82.92
OAG	-88.00	190.79	871.360	182.74	1190.64
OPP	53.69	563.45	216.01	-100	-2.05

Para el caso del gen quitinasa los mejores tratamientos que favorecieron sobre expresión fueron el Protecto RZH, cuya expresión se mantuvo alta durante las tres aplicaciones, alcanzando la máxima (1039.23 %) después de la segunda aplicación. La mezcla del Oxicom Pre Plus Seco mas Protecto RZH mostró la mayor sobre expresión antes de la segunda aplicación con 596.44 %. De estos dos tratamientos ninguno perdió la sobre expresión en ninguna de las tres aplicaciones. En el caso de Oxicom Pre Plus Seco no se observó un cambio positivo en la expresión e los genes antes de cada aplicación, pero se recuperaba después de la aplicación respectiva, teniendo el mayor porcentaje después de la segunda aplicación con 238.69 %, se sugiere que 20 días es mucho para la aplicación de este tratamiento ya que la sobre expresión se pierde. En el caso de los tratamiento con Oxicom AG y Oxicom Pre Plus la sobre expresión se manifiesta después de las aplicaciones y fueron los que tuvieron mayor sobre expresión al final de las mismas, con 119.55 % para Oxicom AG y 377.19 % para Oxicom Pre Plus; esto sugiere que estos tratamientos hace que se acumule la sobre expresión, Cuadro 16.

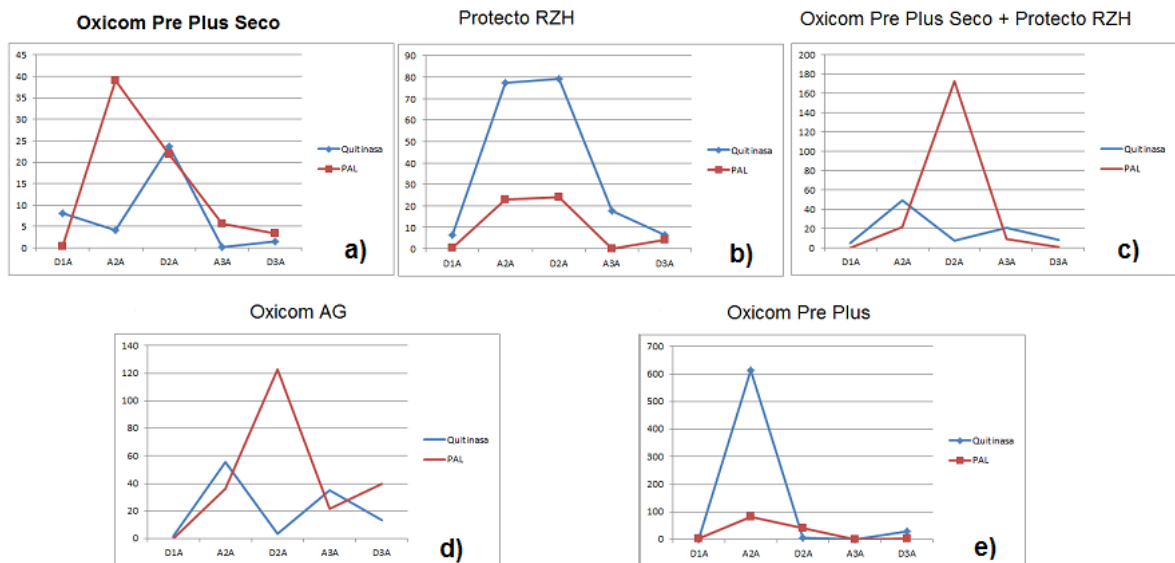
Cuadro 16. Porcentaje de sobre expresión de quitinasa, tomando el valor del testigo como el 100%. Los números negativos indican que no hubo sobre expresión.

	D1A	A2A	D2A	A3A	D3A
OPPS	101.39	-40.54	238.69	-97.93	-75.09
PRZH	58.00	985.28	1039.23	189.70	6.03
OPPS+PRZH	18.10	596.44	12.50	246.91	37.99
OAG	-61.84	683.54	-50	479.41	119.55
OPP	-72.64	8522.34	-21.54	-100	377.19

6.4 Expresión génica de Quitinasa y PAL por tratamiento

Según la Grafica 3a, 3c y 3d los tratamientos con Oxicom Pre Plus Seco, la mezcla con Oxicom Pre Plus seco mas Protecto RZH y Oxicom AG fueron los que provocaron mayor expresión en el gen de PAL, mientras que el Protecto RZH y el Oxicom Pre Plus fueron los que expresaron más al gen quitinasa, Grafica 3b y 3e.

Grafica 3. Expresión génica de quitinasa y PAL por tratamiento. 3a Mas expresión de PAL con Oxicom Pre Plus Seco. 3b Mas expresión de quitinasa con Protecto RZH. 3c Mas expresión de PAL con la mezcla de Oxicom Pre Plus Seco mas Protecto RZH. 3d Mas expresión de PAL con Oxicom AG. 3e Mas expresión de quitinasa con Oxicom Pre Plus.



7. DISCUSIÓN

Los genes de defensa se expresan ante ciertos estímulos bióticos. La expresión de quitinasa o PAL en la planta se puede lograr con la inoculación de patógenos (Chang *et al.*, 2002). Algunos autores reportaron resistencia sistémica inducida en arroz a *Pyricularia grisea* Sacc, detectándose una acumulación sistémica y local de RNAm de lipoxigenasas, PAL e inhibidores de proteasas (Koike y Nanbu, 2000).

La quitinasa se logró expresar en todos los tratamientos, estos resultados son similares a los reportados por Suginta (2007) con la enzima purificada de la línea TKU015 de *Pseudomona* sp., usando concha de camarón como sustrato, donde el patógeno usaba la concha de camarón para sintetizar la quitinasa. Purwani (2004) incrementó la actividad de quitinasa con aplicaciones de Manganese y Cobalto, efecto que alcanzó con el tratamiento de Protecto RZH quien fue el que mostró mayor incremento de quitinasa en este trabajo.

La quitina es una substancia que se encuentra en el exoesqueleto de los artrópodos y en la pared celular de algunos hongos, de aquí la importancia que existan niveles altos de quitinasa en una planta, para poder desdoblar la quitina que presentan los organismo antes mencionados.

Aimé y colaboradores en 2008 analizaron la expresión del gen PR-1a en plantas de tomate inoculadas con dos cepas diferentes del hongo patógeno

Fusarium oxysporum, lo que indica el amplio espectro de acción que tienen los genes PR en el sistema de respuesta de las plantas, y encontraron las variedades con mayores índices de expresión génica como “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade” puedan presentar tolerancia a otros tipos de patógenos. Resultados que pueden ser comparados con los que se tuvo con la mezcla de Oxicom Pre Plus Seco mas Protecto RZH en la expresión tanto de quitinasa como PAL.

El incremento de la expresión de los genes de quitinasa y PAL sugirieron que el jitomate responde a los diferentes tratamientos, lo que también demostró Anwar y colaboradores en el 2003 al utilizar Oxycorn también en este mismo cultivo en los genes PR1a y PR1g, (además de PR5 y PAL). Kim y colaboradores en el 2001 también al utilizar Oxycorn demostró el incremento en los niveles de expresión de los genes CHS (Chalcona sintasa) y HYP (Hydroxyproline-rich glycoproteins, además de PAL. Sin embargo, en ambos trabajos existen dos diferencias importantes: no se cuantificaron los transcritos de los genes; sino que solo se estimó su presencia mediante la técnica de Southern blot y ambos grupos incluyeron fitopatógenos en sus tratamientos. En el presente trabajo, no se consideró el uso de fitopatógenos porque el objetivo era observar el efecto únicamente de los tratamientos en plantas desarrolladas en condiciones de invernadero, regadas con solución nutritiva y libres de patógenos (prácticamente libres de estrés); los cuales, como ya se mencionó, incrementaron los niveles de expresión de los dos genes considerados. Esta

ganancia de sobre expresión podrá dar un margen de expresión mayor cuando las plantas se encuentren en campo sujetas a diferentes tipos de estrés; ya que los factores bióticos estimulan de manera natural las rutas principales defensa de la planta (Kim *et al.*, 2001).

8. CONCLUSIONES

-La aplicación de bioprotectores indujo en jitomates sobre expresión de los genes de quitinasa y PAL. La mezcla de Oxicom Pre Plus seco mas Protecto RZH fue el mejor tratamiento para la sobre-expresión tanto de PAL como de quitinasa.

-La aplicación de bioprotectores en plantas sanas de jitomate nos permitió conocer la expresión inicial de quitinasa y PAL, así como las diferentes variaciones de expresión que estos genes tuvieron antes y después de cada una de las tres aplicaciones.

-Los bioprotectores por si solos incrementaron la expresión de quitinasa y PAL sin embargo la mezcla de dos de ellos, Oxicom Pre Plus Seco mas Protecto RZH, fue capaz de expresar mayor cantidad de estos dos genes que por sí solos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aimé, S., Cordier, C., Alabouvette, C., Olivain, C., 2008, Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* and the biocontrol strain *F. Oxysporum* Fo47, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 73, pg: 9-15.

Alexander, D., Goodman, R., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. y Ryals, J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a, *Plant Biology*, Vol 90, pg: 7327,7331.

Andreu, A., C. Oliva, S. Distel, and G. Daleo. 2000. Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 44: 1-9.

Anwar, A. Safdar, M. V. McKenry, Kwang-Yeol Yang, and A. J. Anderson (2003). Induction of Tolerance to Root-Knot Nematode by Oxycom *Journal of Nematology* 35(3): 306–313.

Applied Biosystems, 2009. Relative Quantification, Applied Biosystems 7300/7500 Real Time PCR System-Getting Started Guide, Applied Biosystems Publication.

Barber, MS., Mitchell, HJ. 1997. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. *International Review Of Cytology - A Survey Of Cell Biology* 172: 243-293.

Bliffeld, M; Mundy, J; Potrykus, I; Futterer, J. 1999. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1079- 1086.

Browning, JA. 1980. Genetic protective mechanism of plantpathogen populations: their coevolution and use in breeding for resistance. *In* Harris, MK. Ed. *Biology and Breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants*. Texas Agric. Stra. College Station, TX. Pg: 52-75.

Chang, Julie; Baltz, Rachel; Schmett, C. y Beffa, R. 2002. Downregulation of a pathogen responsive tobacco UDP-GLC: Phenylpropanoid glucosyl transferase reducesscopolition glucosidase accumulation. *Plant Cell.* 14: 1093-1107.

Dao, M.; Lim, C. T.; Suresh, S. 2004. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *J. Mech. Phys. Solids* 51, 2259-2280.

Deepak, S., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., Masuo, Y., Agrawal, G., 2007. Real-time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes, *Current Genomics*, Vol 8, 234-251.

Dixon, R. A., and M. J. Harrison. 1991. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv. Genet.* 28: 166-234.

Edreva, A., 2005, Pathogenesis-Related Proteins: Research progress in the last 15 years, *Gen. Appl. Plant Physiology*, Vol 31, pg. 105-124.

Espinosa Z.C. 2004. Producción de Tomate en Invernadero. Multiservicios Agropecuarios y Forestales. Zapata y Asociados. México.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*; 19: 165-256.

Gachon, C., Mingam, A. y Charrier, B. 2004. REVIEW ARTICLE: Real-time PCR: what relevance to plant studies?, *Journal of Experimental Botany*, Vol 55, pg: 1445-1454.

Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 37: 285-306.

Heath, MC. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.

Holland, P. M., Abramson, R.D., Watson, R., and Gelfand, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 7276-7280.

Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. y Fritig, F. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β glucanase activity, *EMBO J.*, Vol 6, pg. 3209-3212.

Kim, Y. C. K.A. Blee, J. Robins and A.J. Anderson. 2001. OxycomTM under field and laboratory conditions increases resistance responses in plants. *Journal of Plant Pathology* 107: 129-136.

Koike, M. y Nanbu, K (2000): Phenylalanine ammonium-lyase activity in alfalfa suspensión cultures treated with conidia and elicitors of *Verticillium albo-atrum*. *Physiol. Plantarum*. 39(3): 349-353.

Lange. C. E., M. M. Cigliano, y M. L. De Wysiecki. 2005. Los acridoideos (Orthoptera: Acridoidea) de importancia económica en la Argentina. En: Barrientos Lozano, L. & P. Almaguer Sierra (eds.), Manejo integrado de la langosta centroamericana (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker) y acridoideos plaga en América Latina. Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, pp. 93-135.

Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. y Fritig, B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases, *PNAS*, Vol 84, pg. 6750-6754.

Lister DL., Sproulé RF., Britt AJ., Lowe CR., Bruce NC. 1996. Degradation of cocaine by a mixed culture of *Pseudomonas fluorescens* MBER and *Comamonas acidovorans* MBLF. 62 (1): 94-9.

Livak, K., Schmittgen, T., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method, *Methods*, Vol 25, pg: 405-408.

Mathews, C., Van Holde. 2003. Bioquímica. 4ta edición. Editorial Médica. Panamericana.

Nicholson, RL;Hammerschmidt, R.1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.

Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, F. y Mosinger, E., 1995, Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal. Isolation and Characterization of Three 14-Kilodalton Proteins of Tomato and of a Basic PR-1 of Tobacco with Inhibitory Activity against *Phytophthora infestans*, *Plant Physiol.*, Vol 108, pg. 17-27.

Nieto A. R. y Velasco H. E. 2006. Cultivo de Jitomate en Hidroponía e Invernadero. 2da edición. Departamento de Fitotecnia Universidad Autónoma de Chapingo. México.

Nishizawa M., Kanaya Y., Toh-E A. 1999. Mouse cyclin-dependent kinase (Cdk) 5 is a functional homologue of a yeast Cdk, *pho85* kinase. *J Biol Chem* 274 (48): 33859-62.

Nuez, F., 2001, El cultivo del tomate, *Ed. Mundiprensa*, 1ra ed. Reimpresa, Madrid, España, pg: 32, 35, 36.

Paxton, J D. 1981. Phytoalexins: a working redefenition. *Phytopathology* Z.101: 106-109.

Pfaffl , M., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR, *Nucleic Acid Research*, Vol 29, pg: 2002-2007.

Purwani, E. Y., Suhartono, M. T., Rukayadi, Y., Hwang, J. K., Pyunb, Y. R. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35, 47–153.

Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R. 2005. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol*;43: 5491-5497.

Richard, J.L. Meanwell, P., Shama, G. 2006. Chitin in a dual role as substrate for *Streptomyces griseus* and as adsorbent for streptomycin produced during fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 657–664.

Rivas, F. 2010. Análisis de la expresión del gen *PR-1*, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*. Pg: 26,27.

Rojop Bravo A. 2008. Control in Vitro con extractos vegetales de patógenos que afectan al cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Especialidad en Ingeniería de Invernaderos, UAQ-Amazcala. México.

Ryals, J., Lawton, K., Delaney, T., Friedrich, L., Kessmans, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., Vernooij, B. y Weymann, K. 1995. Signal transduction in Systemic Acquired Resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol 92, pg: 4202-4205.

Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H. y Hunt, M. 1996. Systemic Acquired Resistance, *The Plant Cell*, Vol 8, pg: 1809-1819.

Sels, J., J. Mathys, B.M. De Coninck, B.P. Cammue y M.F. De Bolle. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* 10: 1011-1016

Schaad, N., Frederick, R. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plantdisease diagnostic, *Can. J. Plant. Pathol.*, Vol 24, pg: 250-258.

Shang-Hsin, G., Jeen-Kuan, C., Wen-Chien, L. 2004. Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii* Taiwan. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 550–556.

Steiner, A.A. 1984. The universal nutrient solution. pp. 633-650. In: Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. Wageningen. The Netherlands.

Suginta, W. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41: 212–220.

Trudel, J., Asselin, A. *Analytical Biochemistry*. 1989. 178: 362-366.

Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. 2002. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR Green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem*, 303: 95-98.

Van Loon, LC; Van Kammen, RT. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun NN". Changes in proteins constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40: 199-211.

Van Loon, L.C., M. Rep y C.M. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.

Van Loon, L., Van Strien, E. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 55, pg: 85-97.

Van Ooijen, G., van den Burg, H., Cornelissen, B. y Takken, F. 2007. Structure and function of Resistance Proteins in Solanaceous Plants, *Annu. Rev. Phytopathol*, Vol 45, pg. 43-72.

Wagenknecht HA. 2008. Fluorescent DNA base modifications and substitutes: multiple fluorophore labeling and the DETEQ concept. *Ann N Y Acad Sci*;1130: 122-130.

Wang, T., and Brown, M. J. 1999. mRNA quantification by real time Taq Man polymerase chain reaction: Validation and comparison with RNase protection . *Anal. Biochem*. 269, 198-201.

Woloshuk, C., Meulenhoff, J., Sela-Buurlage, M., van den Elzen, P. y Cornelissen, B. 1991. Pathogen-Induced Proteins with Inhibitory Activity toward *Phytophthora infestans*, *The Plant Cell*, Vol 3, pg: 619-628.

Wong, M., Medrano, J. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques* Vol 39, pg: 1-11

Zhang, J. Z. 2003. Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 430-440.