



"Explotar la Explotación de la
Tierra No la del Hombre"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL



**CUANTIFICACIÓN DE LOS GENES PR5, GLUCANASA Y PEROXIDASA EN
JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) INDUCIDOS POR BIOPROTECTORES.**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

CORRAL MARTÍNEZ JESÚS JESÉ



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, Estado de México, Noviembre de 2014

La tesis titulada "Cuantificación de los genes PR5, Glucanasa y Peroxidasa en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) inducidos por bioprotectores", fue realizada por Jesús Jesé Corral Martínez bajo la dirección de la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, ha sido revisada y aprobada por el Honorable Consejo 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.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, por haber permitido realizar mis estudios de posgrado

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por dirigir la presente investigación y por su confianza, apoyo, sabiduría y 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 por su apoyo incondicional, a mis amigos que de alguna manera me apoyaron.

DEDICATORIA

A quienes me dieron la vida: Gudulia Martínez García y Delfino Corral Pacheco, por su apoyo, cariño, confianza y sabiduría.

A mis hermanos: Darely, Adelina, Berenice, Alondra y Delfino, por su apoyo y cariño.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de esta tesis nació en Santiago Yosondúa, Oaxaca el 14 de mayo de 1989, estudió la primaria en la escuela “Filomeno Mata” de la misma comunidad. Los estudios de secundaria los realizó en la Escuela Secundaria Técnica # 63 de Santiago Yosondúa, Oaxaca.

El bachillerato lo realizó en Preparatoria Agrícola en Chapingo y tiene el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Sus estudios de Maestría en Protección Vegetal también fueron en la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
DATOS BIOGRÁFICOS.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
a) General.....	3
b) Específicos.....	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1. El cultivo de jitomate.....	4
4.1.1. Generalidades.....	4
4.1.2. Botánica.....	5
4.1.3. Principales plagas en jitomate.....	5
4.1.4. Principales enfermedades en jitomate.....	8
4.2. Mecanismos de defensa de las plantas.....	10
4.2.1. Estructurales.....	10
4.2.2. Bioquímicos.....	11
4.3. Proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs)	12
4.3.1. Glucanasa (PR2)	14
4.3.2. PR5.....	15
4.3.3. Peroxidasa.....	16
4.4. PCR en tiempo real.....	16
4.4.1. Generalidades del PCR en tiempo real.....	16
4.4.2. Fluroforos.....	17
4.4.3. Genes endógenos.....	19
4.4.4. Gen GAPDH.....	19
4.5. Expresión génica.....	19
4.5.1. Método de ddCt.....	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. Lugar de trabajo.....	21

5.2.	Tratamientos.....	21
5.3.	Aplicación de tratamientos.....	24
5.4.	Riego y fertilización.....	25
5.5.	Toma de muestras.....	25
5.6.	Extracción y purificación de RNA.....	26
5.7.	Síntesis de cDNA.....	27
5.8.	PCR en Tiempo Real.....	29
5.9.	Expresión génica por el método ddCt.....	31
6.	RESULTADOS.....	31
7.	DISCUSIÓN.....	38
8.	CONCLUSIONES.....	39
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plántulas de jitomate de la variedad SUN F1 de 30 días para la evaluación de expresión génica.....	22
Figura 2. Preservación de las muestras en bolsas de polietileno.....	26
Figura 3. Extracción y purificación de RNA.....	27
Figura 4. Comparación de valores de Ct del gen experimental respecto al endógeno.....	33
Figura 5. Expresión de PR5 y Glucanasa por tratamiento en cada aplicación....	34
Figura 6. Expresión de cada tratamiento por cada gen.....	35
Figura 7. Expresión génica por gen en cada aplicación.	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de proteínas PR en diferentes plantas (Van Loon et al., 2006).	13
Cuadro 2. Número de plantas por tratamientos y aplicaciones.....	22
Cuadro 3. Cantidad de producto y agua por cada aplicación.	24
Cuadro 4. <i>Reactivos usados para preparar las muestras antes de la síntesis de cDNA</i>	27
Cuadro 5. Mix para la reacción de reverso transcriptasa.	28
Cuadro 6. Condiciones y ciclaje para PCR en tiempo real.	30
Cuadro 7. Ct del gen de interés y del endógeno.	32
Cuadro 8. Expresión génica obtenida con el método ddCt.	36

Cuantificación de los genes PR5, Glucanasa y Peroxidasa en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) inducidos por bioprotectores.

¹Jesús Jese Corral Martínez, ²Ernestina Valadez Moctezuma

RESUMEN

El cultivo de jitomate tiene una gran aceptación 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. La aplicación de un tipo de substancia bioprotectora puede inducir la producción de genes relacionados a la patogénesis los cuales protegen a las plantas contra patógenos.

Se sembraron semillas de jitomate de la variedad SUN F1 en charolas de unicel, a los 20 días fueron trasplantadas 5 plantas por maceta, el sustrato usado fue peatmoss 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) y agua (T6). Se aplicó riego cada tercer día con solución nutritiva Steiner al 50%.

Se tomaron muestras compuestas de hoja de cada maceta, las cuales se lavaron con agua destilada. Se obtuvo RNA total utilizando Trizol. La calidad y cantidad del RNA se cuantificó y verificó en un ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop). Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA utilizando el kit ImProm II™ Reverse Transcription System. La RT-PCR se realizó con un termociclador tiempo real BIO RAD CFX96™, como endógeno se usó el gen GADPH y el fluoróforo fue FAM. Se realizó el análisis de la información y se obtuvo la expresión génica con el método ddCt.

Los resultados obtenidos confirman la activación de los genes para las proteínas Glucanasa y PR5 en hoja. Esta activación es ayudada en presencia de los productos Oxycom Prep Plus Seco, Protecto RZH, Mezcla de Oxycom Prep Plus Seco más Protecto RZH, Oxycom AG y Oxycom Prep Plus. Los niveles de expresión de los genes tendieron a incrementarse en la segunda y tercera aplicación. La mezcla constituida de Oxycom Prep Plus Seco más Protecto RZH, fue el mejor tratamiento. El gen PR5 tuvo mayores valores de expresión génica que el gen glucanasa.

Palabras clave: agronomía, biotecnología, patogénesis, proteínas, producción.

ABSTRACT

The Tomato crop has a great acceptance among consumers worldwide but production is affected annually by numerous pests such as bacteria, virus, nematods, fungi and insects. Applying a bioprotective type substance can induce the production of related to pathogenesis which protect plants against pathogens and from abiotic stresses different type genes.

Tomato (Var SUN F1) seeds were germinated in Styrofoam trays, at 20 days were transplanted 5 plants per pot, the substrate used was peatmoss and perlite (2:1 ratio). 3 applications of 2500 ppm bioprotectors were performed in total there were 6 treatments, products used were Oxycom Prep Plus Seco (T1), Protecto RZH (T2), Oxycom Prep Plus Seco + Protecto RZH (T3), Oxycom Ag (T4) and Oxycom Prep Plus (T5) and water (T6). Irrigation was applied every other day with Steiner nutrient solution 50%.

Composite samples of leaf in each pot, which was washed with distilled water were made. Total RNA was obtained using Trizol. The quality and quantity of RNA was quantified and verified in an ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop). Subsequently cDNA synthesis was performed using the kit Reverse Transcription System ImProm IITM. The RT-PCR was performed using a BIO RAD real-time thermocycler CFX96™, as the endogenous GAPDH gene was used and the fluorophore FAM. Information analysis was performed and gene expression with the DDCT method was obtained.

The results obtained with firm activation Glucanase genes and PR5 for leaf protein. This activation is helped in the presence of the products Oxycom Prep Plus Dry, Protecto RZH, Mixed Dry Oxycom Prep Plus more Protecto RZH, Oxycom AG and Oxycom Prep Plus. The levels of gene expression levels were driven in the second and third applications. The mixture consists of more Oxycom Prep Plus Protecto RZH Seco was the best treatment. The PR5 gene had higher gene expression values that glucanase gene.

Key words: agronomy, biotechnology, pathogenesis, protein, production.

1 Tesista

2 Director

1. INTRODUCCIÓN

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 (www.fao.org) 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. El cultivo de tomate tiene una gran aceptación 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. Zhang et al. (2004) indica que estos sistemas de infección son los denominados activos y pasivos. Los sistemas pasivos se identifican porque la planta acumula sustancias tóxicas para protegerse del ataque de patógenos. Van Ooijen et al. (2007) menciona que 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.

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. Gachon et al. (2004) señala que 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

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 tomate), es influenciado por un factor biótico o abiótico (en este caso abiótico por la aplicación de bioprotectantes) y de qué manera este afecta a su desarrollo en consecuencia, a la producción.

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 y Edreva 2005).

Ryals et al. (1995) afirma que esta sobreexpresión es desencadenada por la acumulación del Ácido Salicílico mediante el llamado SAR (Systemic Acquired Resistance)

Edreva (2005) menciona que 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.

Niderman et al. (1995) menciona que estudios previos sobre estas proteínas han reportado actividad antifúngica e inhibitoria contra *Phytophthora infestans*, 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 Glucanasa (*PR2*), *PR5* y Peroxidasa (*PR9*) 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.

b. Específicos

- Aplicar los diferentes tratamientos a plántulas desarrolladas en condiciones de invernadero.
- Hacer extracciones de RNA de muestras de hoja de las plantas de jitomate antes y después de cada aplicación.
- Convertir a cDNA el RNA extraído.
- Cuantificar la expresión génica del cDNA con la técnica de PCR en tiempo real.

3. HIPÓTESIS

- Los bioprotectores son químicos que protegen a los cultivos bajo condiciones de estrés. La aplicación de bioprotectores en plántulas sanas, permitirán conocer la expresión basal y variaciones de ésta por efecto de dichos productos aplicados.
- La aplicación de un tipo de sustancia bioprotectora puede proteger a las plantas contra patógenos de diferente tipo o condiciones de estrés; sin embargo, al combinar diferentes sustancias bioprotectoras es posible que se estimulen 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. Estadísticas de la FAO (2011) demuestran que 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.

Nieto y Velasco (2006) indican que 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

Espinosa (2004) mencionan que 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. Rojop (2008) indica que comercialmente se producen 45 millones de toneladas de jitomate por año en 2.2 millones de hectáreas. Estudios de SAGARPA (2004) determinaron que la demanda de jitomate en México es de 2.1 millones de toneladas, y la superficie cosechada en México es de 121,688 ha.

Rojop (2008) también menciona que 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

4.1.2. Botánica

Pertenece a la familia 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.

4.1.3. Principales plagas en jitomate

- Pulgón saltador o psilido del tomate (*Bactericera cockerelli* Sulc.) (Hemiptera: psyllidae)

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 *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)

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. Ocasiona debilitamiento, amarillamiento, moteado y contaminación de hojas y frutos por la excreción de mielecilla

- Trips (*Thrips tabaci* Linderman y *Frankliniella occidentalis* Pergande) (Thysanoptera: Thripidae)

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 patógenos.

Pulgones. *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis gossypii* Glover

Ocasionan daños directos al succionar la savia provocando debilitamiento, pérdida de vigor, amarillamiento y deformaciones, excretan mielecilla la cual cubre las hojas ocasionando la atracción de moscas y hormigas, así como del hongo *Capnodium* sp causante de la fumagina, que reduce la fotosíntesis y calidad de frutos.

- Araña roja. *Tetranychus urticae* Koch (Acariformes: Tetranychidae)

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 con sus estiletes provocando puntuaciones blancas, coloraciones amarillentas y morrones en las hojas.

- Ácaro del bronceado. *Aculops lycopersici* (Masse) (Acariformes: Eriophyidae)

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. Aparecen por manchones y se diseminan mecánicamente.

- Gusano soldado. *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: noctuidae)

Se alimentan durante la noche devorando hojas y brotes tiernos y frutos. Provocan daños fuertes en las primeras etapas de desarrollo ya que en los primeros instares se comportan como gregarias, por lo cual ocasionan daños severos a partir de donde eclosionan y posteriormente se van eliminando unas a otras por el comportamiento de canibalismo.

- Gusano del fruto *Heliothis* (= *Helicoverpa*) *zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae)

Ataca jitomate, chile, tomate, lechuga, fresa y otras hortalizas. 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. *Keiferia lycopersicella* (Walsingham) (Lepidoptera: Gelechiidae)

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. El cuarto ínstar enrolla la hoja para pupar o protegerse.

- Minador de la hoja. *Liriomyza* sp (Diptera: Agromyzidae)

Las larvas perforan la lámina foliar y durante el proceso de la alimentación van formando galerías en forma de serpentinadas, que bajo altas poblaciones y sin medidas de control llegan a secar gran parte o en algunos casos la totalidad de la

lámina foliar lo cual puede provocar una defoliación parcial o total del cultivo, agravado por la presencia de hongos y bacterias que entran por medio de las galerías.

- Nemátodo agallador. *Meloidogyne spp.* (Nemata: Heteroderidae)

Los nematodos producen heridas en las raíces de jitomate por las cuales penetran fácilmente algunos de los hongos que las atacan principalmente *Fusarium*, además las hembras una vez dentro de las raíces forman agallas lo que impide la conducción normal de agua y nutrimentos de la raíz al resto de planta, ocasionan síntomas aéreos como amarillamiento del follaje, plantas de menor altura, marchitez durante períodos de altas temperaturas y escaso follaje, frutos pequeños y de baja calidad

4.1.4. Principales enfermedades en jitomate

- Damping off (*Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora sp*, *Fusarium sp*)

Esta enfermedad es muy común atacando plántulas de jitomate desde el vivero y primeras etapas de desarrollo en campo e invernadero. Ataca principalmente chile, jitomate, tomate de cáscara, entre otras. Los síntomas de esta enfermedad empiezan en pocas plantas que después se extienden a manchones, las plántulas se entristecen como si fuera falta de agua pero al hacer una inspección minuciosa encontramos 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 *Fusarium oxysporum* 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, la cual se extiende hacia arriba de acuerdo con la severidad. Las plantas muestran un achaparramiento, defoliación, necrosis marginal de las hojas y finalmente la planta muere.

- Moho gris *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetzel (= *Botrytis cinerea* Pers.)

Este hongo infecta en cualquier etapa de desarrollo, inclusive durante el transporte y almacenamiento del fruto. Presenta gran capacidad de dispersión. 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 *Phytophthora infestans* (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 *Alternaria tomatophila* Simmons, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler

Ataca principalmente chile, papa, tomate de cáscara y jitomate. 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 *Leveillula taurica* (Lev.) Arnaud (Anamorfo: *Oidiopsis taurica* 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 inóculo 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, las cuales continúan infectando hojas sanas de la misma y otras plantas aledañas.

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. Browning (1980) menciona que los genes que determinan la resistencia y la susceptibilidad en la planta, son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno

Heath (2000) indica que 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 coevolución, 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.

4.2.1. Estructurales.

Nicholson y Hammerschmidt (1992) señalan que 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.

Barber *et al.* (1997) encontró que 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 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

4.2.2. Bioquímicos.

Según Paxton (1981) 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. 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. Hammerschmidt (1999) menciona que las fitoalexinas se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan con la respuesta de hipersensibilidad. 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. (Woloshuk et al. (1991) 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.

Edreva (2005) menciona que estos 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. 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 después y durante la infección con patógenos. Las proteínas PR se identificaron inicialmente en tabaco durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco. Van Loon y Van Kammen (1970) señalan que estas proteínas se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a las proteasas, de localización extracelular y con valores de pH extremos

Sels et al. (2008) encontraron que 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. Estas proteínas se han detectado e identificado en una amplia variedad de plantas y se clasifican de acuerdo a su actividad.

Van Loon y Van Strien (1999) indican que 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. A la fecha se conocen 17 grupos diferentes. 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. Bliffeld *et al.* (1999) y Nishizawa *et al.* (1999) estudiaron plantas de trigo y arroz manipuladas genéticamente para sobre expresar ciertas quitinasas y éstas demostraron ser más resistentes a los hongos *Erysiphe graminis* y *Magnaporthe grisea* respectivamente.

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 1. Clasificación de proteínas PR en diferentes plantas según Van Loon et al. (2006).

Familia	Miembro tipo	Propiedades
PR-1	PR-1a Tabaco	14-17kD
PR-2	PR-2 Tabaco	Clase I, II y III endo-beta-1,3-glucanasas, 25-35kD
PR-3	P, Q Tabaco	Clase I, II, IV, V, VI y VII endoquitinasas, 30kD
PR-4	R Tabaco	Actividad endoquitinasa, antifúngica, 13-

		19kD
PR-5	S Tabaco	Proteína tipo taumatina, osmotina, zeamatina, permeatina, similar a inhibidores alfa-amilasa/tripsina, antifúngica
PR-6	Inhibidor I Jitomate	Inhibidores de proteasas, 6-13kD
PR-7	P69 Jitomate	Endoproteasas
PR-8	Quitinasa Pepino	Clase III quitinasas, quitinasa/lizozima
PR-9	Peroxidasa formadora de Lignina	Peroxidasas, proteínas tipo peroxidasas
PR-10	PR-1 Perejil	Ribonucleasas, Proteínas-Bet v 1-relacionadas
PR-11	Clase V Quitinasa Tabaco	Endoquitinasa
PR-12	Ps-AFP3 Rábano	Defensinas
PR-13	THI2.1 Arabidopsis	Tioninas
PR-14	LTP4 Cebada	Proteínas transportadoras de lípidos no-específicas (ns-LTPs)
PR-15	OxOa Cebada	Oxalato oxidasa
PR-16	OxOLP Cebada	Proteínas tipo oxalato-oxidasa
PR-17	PRp27 Tabaco	Peptidasa

4.3.1. Glucanasa (PR2).

Estas proteínas son comúnmente expresadas en varias plantas como resultado de la infección por varios patógenos y presentan actividad β , 1-3 glucanasa. Leubner-Metzger y Meins (1999) encontraron que estas proteínas son capaces de realizar cortes hidrolíticos endógenos en los enlaces β , 1-3 glucosídicos de los β , 1-3 glucanas. Van Loon (1999) menciona que las β , 1-3

glucanasas son consideradas como proteínas relacionadas con la patogénesis y están ampliamente distribuidas en distintas especies de plantas

Las β , 1-3 glucanasas hidrolizan el β , 1-3 glucana que es el mayor componente de la pared celular de los oomicetos. Takeuchi *et al.* (1990) encontró que la enzima también puede mediar la respuesta de las plantas a través de la liberación de fragmentos de glucanas de la pared celular del patógeno o de planta, lo cual funciona como elicitores que pueden activar otras respuestas de defensa de las plantas. Aunque el mayor interés en las β , 1-3 glucanasas se ha centrado en su papel como mecanismo de defensa en contra de patógenos, (Félix y Meins 1986; Castresana *et al.*, 1990; Hoj y Fincher 1995; Leubner-Metzger y Meins 1999) mencionan que existen evidencias claras de que estas enzimas también intervienen en diversos procesos fisiológicos y del desarrollo de las plantas como, maduración de frutos, división celular, embriogénesis, germinación de semillas, rompimiento de dormancia, respuestas a bajas temperaturas, ozono, daño mecánico y luz UV, entre otros. Existen múltiples isoformas estructurales de estas enzimas las cuales difieren en tamaño, punto isoeléctrico, estructura primaria, localización celular, y modelo de regulación. Leubner-Metzger y Meins (1999) indican que las glucanasas son codificadas por una familia multigénica y son producidas como pre-proteínas con un péptido señal N terminal hidrofóbico, que es removido co-traduccionalmente, y un extremo C-terminal N-glicosilado en un solo sitio. Shinshi *et al.* (1988) encontró que las pro-proteína es transportada del retículo endoplasmático vía aparato de Golgi a la vacuola donde el extremo C-terminal es removido para que madure. Bednarek y Raikhel (1991) identificaron que el extremo C-terminal contiene señales de envío a la vacuola. Diversos autores (Stintzi *et al.*, 1993; Leubner-Metzger y Meins, 1999) encontraron que las proteínas de la clase I (aproximadamente de 33 kDa) son proteínas básicas localizadas en la vacuola, mientras que las de la clase II y III (aproximadamente de 34 a 36 kDa) son proteínas ácidas secretadas en los espacios extracelulares y que no contienen el extremo C-terminal presente en las de la clase I.

4.3.2. PR5

Proteína tipo taumatina, osmotina, zeamatina, permeatina, similar a inhibidores alfa-amilasa/tripsina, ésta tiene una función antifúngica. Las proteínas PR-1 y PR-5 muestran actividad específica directa en contra de oomicetos. El mecanismo de acción de PR-1 aún no es muy claro, sin embargo, para los miembros de PR-5 se han descrito diversos mecanismos de acción, como permeabilizadores de membrana, unión e hidrólisis de glucanos y apoptosis.

Fagoaga et al. (2001) encontraron que la proteína PR-5 de tabaco constitutivamente expresada en plantas transgénicas de *Citrus sinensis* (naranja) confiere resistencia a *P. citrophthora*, indicativo de la actividad antioomiceto de estas proteínas.

4.3.3. Peroxidasa

Son proteínas ampliamente distribuidas tanto en el ambiente intra como extra celular. Monties (1989) indica que las peroxidases cumplen una función importante durante la polimerización dependiente de H_2O_2 de alcoholes hidroxycinámicos (monolignoles), durante el estado final de biosíntesis de lignina. Milosevic y Slusarenko (1996) indican que el incremento en la actividad peroxidasa durante una interacción incompatible planta-patógeno está relacionada con una progresiva incorporación de compuestos fenólicos en la pared celular. Aist y Gold (1987) indican, así como Brisson, Tenhaken y Lamb (1994) afirman que este reforzamiento de la pared celular reduce la susceptibilidad a enzimas degradantes de pared, posiblemente restringe la difusión de toxinas derivadas del patógeno hacia el hospedero, y para el caso de hongos actúa como barrera mecánica para prevenir la penetración física del hongo hacia el protoplasto.

Yoshida et al. (2003) mencionan que las POX participan en varias funciones fisiológicas de las plantas tales como: lignificación, entrecruzamiento de polisacáridos de la pared celular, oxidación del ácido indolacético, regulación de la elongación celular y oxidación de fenoles ligados al crecimiento. McInnis et al. (2006) indica que algunas de las funciones fisiológicas de las peroxidasas en las plantas son: a) participación en la biosíntesis del etileno, b) defensa contra infecciones, c) cicatrización y d) lignificación de la pared celular.

4.4. PCR EN TIEMPO REAL

4.4.1. Generalidades del PCR en tiempo real

Diversos autores (Deepak, *et al.*, 2007; Schaad y Frederick, 2002) señalan que la PCR fue considerada como una revolución en la ciencia desde su invención por Kary Mullis en 1984. 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.

Wang y Col. (1999) mencionan que la reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-PCR) es el método más sensible para la detección de ácido ribonucleico. Holland y Col. (1991) indica que 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 han formado las bases de los ensayos cinéticos o los ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Deepak *et al.* (2007) afirma que la PCR en tiempo real es uno de los mayores avances en el campo del desarrollo de la técnica, puesto que sus aplicaciones 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.

Wong y Medrano (2005) mencionan que 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). 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 estacionaria, es en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha terminado.

4.4.2. Fluoróforos

Qvarnstrom, James y Xayavong (2005) indican que 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. 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. Wagenknecht (2008) menciona que la utilización de fluoróforos también permite realizar reacciones de amplificación multiplex y detectar cada molécula blanco con un fluorocromo diferente.

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. Wagenknecht (2008) y Espy (2006) mencionan que 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. 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.

4.4.3. Genes endógenos

Según Vandesompele et al. (2002). La medida de la expresión génica por medio de RT-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 varía es debido a cambios en la cantidad de RNA total empleada en la síntesis de DNAc, 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.

4.4.4. Gen GAPDH

Mathews y Van Holde (2003) mencionan que 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, en la que se aprovecha esta energía para generar un compuesto de alta energía, 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.

4.5. Expresión génica

Rivas (2010) indica que 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.

Pfaffl (2001) menciona principalmente dos métodos de cuantificación, dependiendo si la eficiencia de amplificación del gen objeto de estudio y el del gen de referencia, además 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 experimentales 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.

4.5.1. Método de ddCt

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

Rivas (2010) indica que 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

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

Rivas (2010) señala que 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.

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 Posgrado 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 pusieron a germinar semillas de plantas de jitomate variedad SUN F1 en charolas de unicel en peat moss para su germinación y desarrollo inicial. Posteriormente las plántulas se trasplantaron a macetas. 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 tuvieron 5 tratamientos más el testigo con tres repeticiones cada uno.

Se tuvieron 45 plantas por tratamiento (15 por repetición), las cuales se dividieron en 3 grupos (15 plantas para cada aplicación), esto para medir la expresión de genes con la acumulación de los productos durante las tres aplicaciones consideradas, cada aplicación se realizó a intervalos de 20 días después del trasplante.



Figura 1. Plántulas de jitomate de la variedad SUN F1 de 30 días para la evaluación de expresión génica.

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), dichos productos pertenecen a la empresa COSMOCEL, se utilizó agua como testigo (T6).

Cuadro 2. Número de plántulas por tratamiento y aplicaciones de los tratamientos.

	Productos		1ra Aplicación		2da Aplicación		3ra Aplicación		
	Fechas								
Tratamiento	Oxycom Prep Plus Seco	R 1	1	5	5	5	5	5	15 plantas
		R 2	1	5	5	5	5	5	
		R 3	1	5	5	5	5	5	
	Proteco RZH	R 1	1	5	5	5	5	5	15 plantas
		R 2	1	5	5	5	5	5	
		R 3	1	5	5	5	5	5	

		3							
	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	5	5	5	5	
		R3	1	5	5	5	5	5	
	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								

5.3. Aplicaciones de los tratamientos

Se aplicaron 2500 ppm de cada producto, para lo cual se hizo el cálculo de gramos o mL empleados de cada producto. Se preparó una mezcla de 2 litros para cada tratamiento en la primera aplicación (200 mL por maceta). Para la segunda aplicación se prepararon 1200 mL, ya que se descartaron 3 macetas por tratamiento pues ya se habían tomado muestras de la primera aplicación. En la tercera aplicación se requirieron 600 mL de la solución.

Cuadro 3. Cantidad de producto y agua por cada aplicación.

Producto (primera aplicación)	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)	-
Producto (segunda aplicación)	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)	-
Producto (tercera aplicación)	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 realizaron cada tercer día con solución nutritiva Steiner al 50%.

Steiner (1984) creó esta solución, la cual contiene los siguientes elementos: Nitrógeno 167 ppm, Fósforo 31 ppm, Potasio 277 ppm, Magnesio 49 ppm, Calcio 183 ppm, Azufre 67 ppm, Hierro 3 ppm, Manganeseo 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 Manganeseo 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 para 100 litros de agua pero como se necesitaba al 50% se diluyo en 200 litros de agua.

5.5. Toma de muestras

Para el análisis de expresión de genes se tomaron muestras de hoja, antes y después de cada aplicación de la sustancia protectante. Se tomaron 6 hojas por maceta de las diferentes plantas contenidas en ella considerando las hojas más jóvenes. Las muestras se lavaron primero con agua de la llave para eliminar contaminantes y luego con agua destilada. Posteriormente, las hojas limpias se colocaron dentro de bolsas de polietileno, las cuales se mantuvieron en nitrógeno líquido para conservar el tejido hasta la extracción de RNA.



Figura 2. Preservación de las muestras en bolsas de polietileno.

5.6. Extracción y purificación de RNA

Se purificó RNA total con el método de Trizol que consistió en lo siguiente:

Se pesaron 100 mg de tejido vegetal (desinfectado) y se maceró con nitrógeno líquido en morteros previamente congelados. Cada muestra se colocó en un microtubo y se adicionó 1mL de trizol, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 microlitros de cloroformo, se agitó durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se realizó la centrifugación a 12000 xg durante 15 minutos a 4 °C.

Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se adicionó 500 microlitros de isopropanol y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se procedió a lavar el pellet con un mL de etanol al 75% mezclando suavemente. Se centrifugó a 7500 xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla 5 a 10 minutos sobre sanitas invirtiendo el microtubo.

Se resuspendió en 20-50 microlitros de agua estéril HPLC o libre de nucleasas. Para disolver RNA se calentó de 55 a 60 °C durante 10 a 15 minutos. Se guardó en el congelador.

La calidad y cantidad del RNA se cuantificó y verificó en un ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop).



Figura 3. Extracción y purificación de RNA

5.7. Síntesis de cDNA.

Para la síntesis del DNA cebador se requirió una concentración mínima de 1000 ng de RNA, para lo cual se necesitó 4 microlitos del RNA extraído.

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se utilizó el kit ImProm II™ Reverse Transcription System. Se prepararon las muestras de cada uno de los tratamientos de la siguiente manera:

Cuadro 4. Reactivos usados para preparar las muestras antes de la síntesis de cDNA.

RNA 1 µg	volumen X (dependiendo la concentración de la muestra)
Primer Oligo dT	1 µL
Agua libre de nucleasas	X µL
Volumen Total	5 µL

Una vez preparados todas las muestras se incubaron a 70 °C durante 5 minutos. Después se incubaron durante 5 minutos en hielo, posteriormente se centrifugaron unos segundos para concentrar el volumen. Se procedió a preparar el Mix para la reacción de reverso transcripción de las muestras experimentales bajo las siguientes condiciones:

Cuadro 5. Mix para la reacción de reverso transcriptasa.

	Volumen	[Final]
Buffer (5 X)	4 µL	1X
MgCl ₂ (25mM)	2.4 µL	3 mM
dNTP's (10mM)	1 µL	0.5 mM
RNasin (40U)	0.5 µL	20 U
Improm-II RT	1 µL	
Agua libre nucleasas	X µL	
Volumen Total	15 µL	

Para el caso del control positivo la única variación fue el MgCl₂ con un volumen de 4.8 µL (6 mM). Se adicionó 15 µL del mix de reacción de reverso transcripción a cada tubo con muestras de RNA previamente preparados (paso 2). Los tubos se colocan en un termociclador (Applied Biosystems 9700) bajo las siguientes temperaturas: 25 °C 5 minutos, 42 °C durante 1 hora y 72° C 15 minutos.

5.8. PCR en Tiempo Real

El PCR en tiempo real se realizó en el laboratorio de Virología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Las condiciones para realizarlo fueron las siguientes.

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

Para la realización de la técnica de PCR-TR se utilizaron los siguientes reactivos:

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

B) Sondas Prime Time™ Std qPCR que contienen el fluoróforo 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: IQ™Supermix 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.

Se cuantificó la expresión génica de todos los tratamientos en las tres aplicaciones con 3 repeticiones. Durante cada aplicación se tomaron muestras antes y después de aplicar los tratamientos. De esta manera se evaluaron las diferencias de expresión de los genes glucanasa, PR-5 y peroxidasa.

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 analice en el termociclador se debe considerar una del endógeno que es con el que se comparará posteriormente.

Cuadro 6. Condiciones y ciclaje para PCR en tiempo real.

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

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 experimental y otro mix con el gen endógeno (GAPDH)

Mix del gen experimental.

IQ super mix + sonda (gen experimental) + 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).

Las sondas usadas fueron de la marca Prime Time TM Std qPCR Assay, a continuación se menciona su secuencia:

- GDPH 287 (5´/56-FAM/ATGACCACT/ZEN/GTCCACGCCATGA/31AB*FQ/-3´)
- PRXDS 315 (5´/56-FAM/AGGTCTGTT/ZEN/CCAATCCGATGCAGC/31AB*FQ/-3´)
- GLUCNSA 219 (5´/56-ACCCTGTGA/ZEN/TGGTGGATAAGAATTGCC/31AB*FQ/-3´)

- PR5 207 (5'/56-FAM/CCCCAAATA/ZEN/CGTGCCATTTTAGTGCC/31AB*FQ/-3')

5.9. Expresión génica por el método ddCt

Para hacer los cálculos de expresión génica se toman los valores Cts que el equipo nos arroja, en este caso, los valores para los genes glucanasa, PR5 y peroxidasa, y los Cts del gen endógeno (GAPDH). También se obtiene valor del gen calibrador que es la diferencia entre el Ct del gen experimental antes de la aplicación menos el Ct del endógeno antes de la aplicación.

Al dCt le restamos el valor del gen calibrador, este gen calibrador es un valor único que se le restó a todos los dCts y al resultado de la resta del dCt menos el dCt de gen calibrador se le llama ddCt, a este último valor le aplicamos la fórmula $2^{(-ddCt)}$.

1. Ct del gen de experimental (tratamiento) – Ct del endógeno (tratamiento)= dCt del gen experimental.
2. Ct del gen experimental (del testigo) – Ct del endógeno (del testigo)= dCt calibrador. El gen calibrador es el mismo para todos solo se calcula una vez.
3. dCt del gen experimental– dCt del calibrador= ddCt
4. Aplicar la fórmula $2^{(-ddCt)}$ y el resultado es la expresión génica de esa muestra.

6. RESULTADOS

El termociclador dio valores de Ct del gen experimental y del gen endógeno, dichos valores se utilizaron para realizar gráficas donde compararon ambos valores, también se realizaron gráficas comparando los valores de Ct de los genes

experimentales y y de los tratamientos. También se obtuvo la expresión génica a partir del método ddCt.

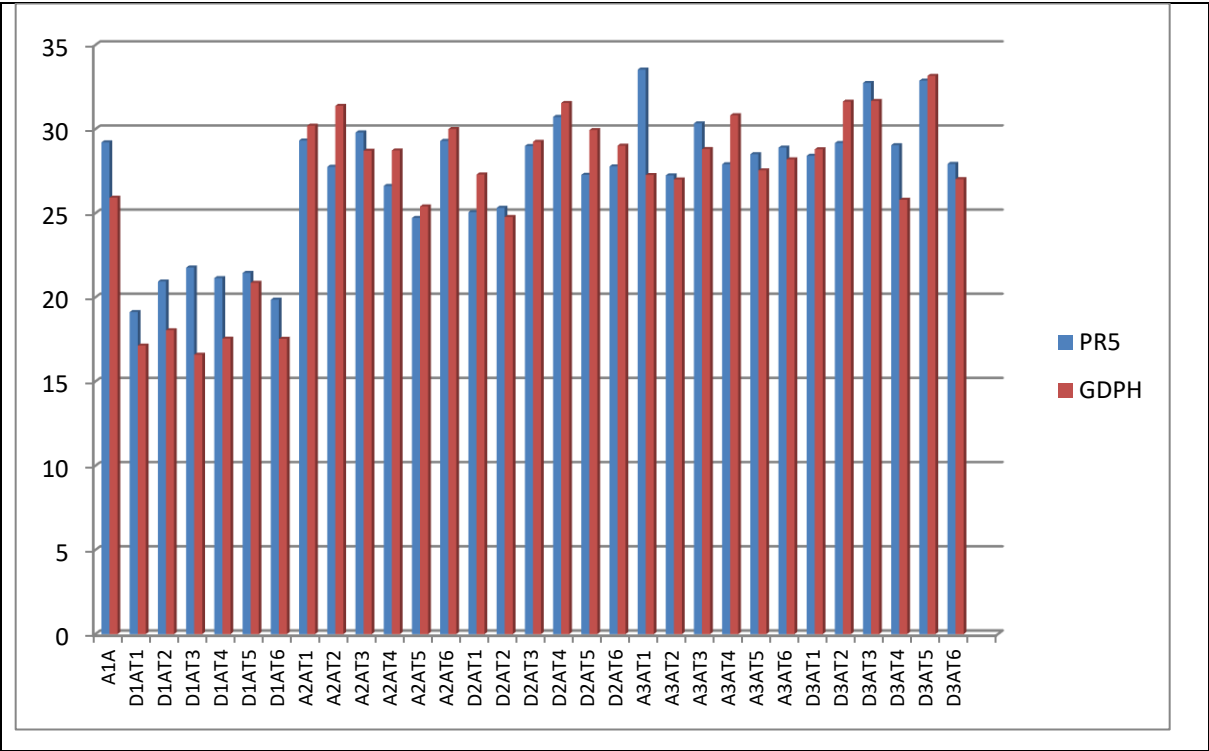
A continuación se muestran los valores de Ct del gen de interés y del gen endógeno obtenidos en las mediciones.

Cuadro 7. Ct del gen de interés y del endógeno (*AA=Antes de aplicación, DA= Después de aplicación, T= Tratamiento).

	PR5	GDPH		GLUC	GDPH
A1A	29.21	25.92	A1A	27.56	25.87
D1AT1	19.12	17.13	D1AT1	20.37	15.13
D1AT2	20.94	18.04	D1AT2	22.67	18.01
D1AT3	21.77	16.59	D1AT3	21.6	16.93
D1AT4	21.14	17.54	D1AT4	24.72	20.1
D1AT5	21.45	20.86	D1AT5	25.27	22.28
D1AT6	19.86	17.53	D1AT6	23.9	18.79
A2AT1	29.32	30.2	A2AT1	30.88	32.51
A2AT2	27.76	31.38	A2AT2	29.3	30.45
A2AT3	29.8	28.71	A2AT3	30.53	32.15
A2AT4	26.62	28.73	A2AT4	29.93	31.18
A2AT5	24.715	25.4	A2AT5	23.33	25.41
A2AT6	29.3	30	A2AT6	31.21	32
D2AT1	25.06	27.3	D2AT1	28.46	29.66
D2AT2	25.32	24.77	D2AT2	23.88	26.68
D2AT3	28.99	29.24	D2AT3	31.31	32.63
D2AT4	30.72	31.55	D2AT4	31.72	32.003
D2AT5	27.28	29.94	D2AT5	31.23	31.25
D2AT6	27.78	29.01	D2AT6	31.56	31.25
A3AT1	33.533	27.268	A3AT1	30.561	29.329
A3AT2	27.245	27.002	A3AT2	34.335	32.35
A3AT3	30.34	28.81	A3AT3	32.435	34.997
A3AT4	27.91	30.82	A3AT4	33.51	32.39
A3AT5	28.5085	27.546	A3AT5	28.128	27.971
A3AT6	28.897	28.201	A3AT6	29.102	28.405
D3AT1	28.41	28.8	D3AT1	29.038	25.797
D3AT2	29.17	31.63	D3AT2	28.772	25.719
D3AT3	32.74	31.67	D3AT3	30.024	28.958
D3AT4	29.037	25.797	D3AT4	29.345	28.239
D3AT5	32.88	33.16	D3AT5	27.213	26.231

D3AT6*	27.927	27.021		D3AT6	28.241	27.989
---------------	--------	--------	--	--------------	--------	--------

Las gráficas siguientes muestran la comparación entre el valor Ct de los genes experimentales respecto al gen endógeno (GDPH).



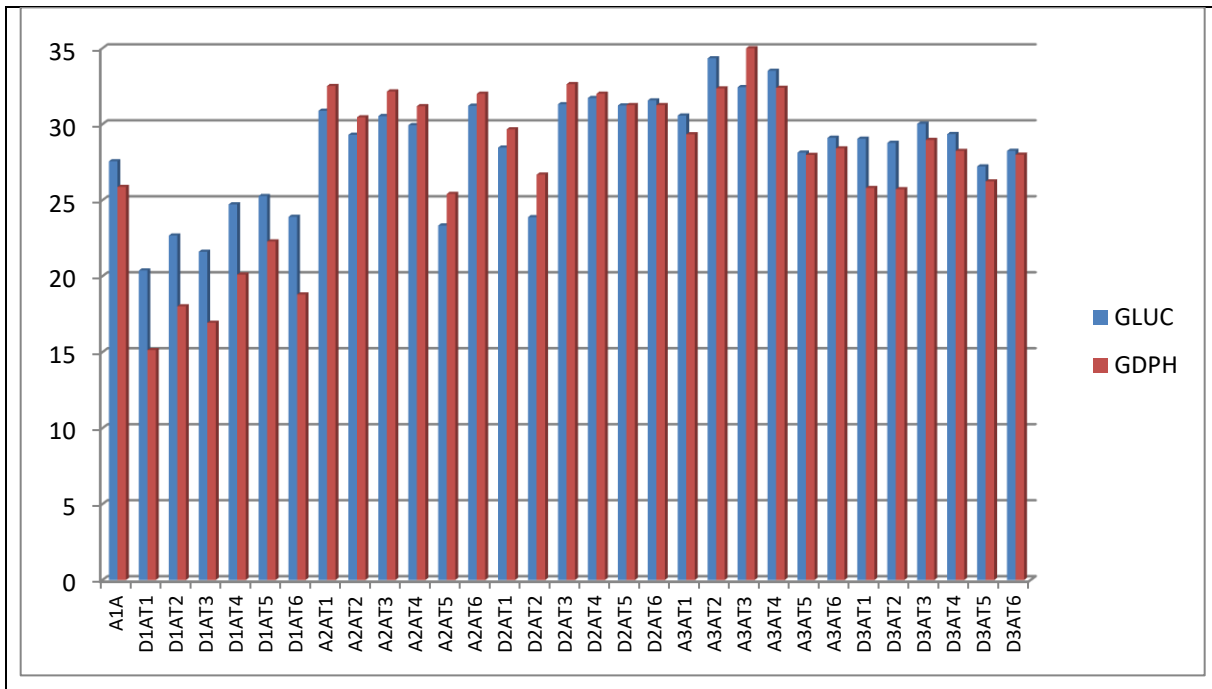
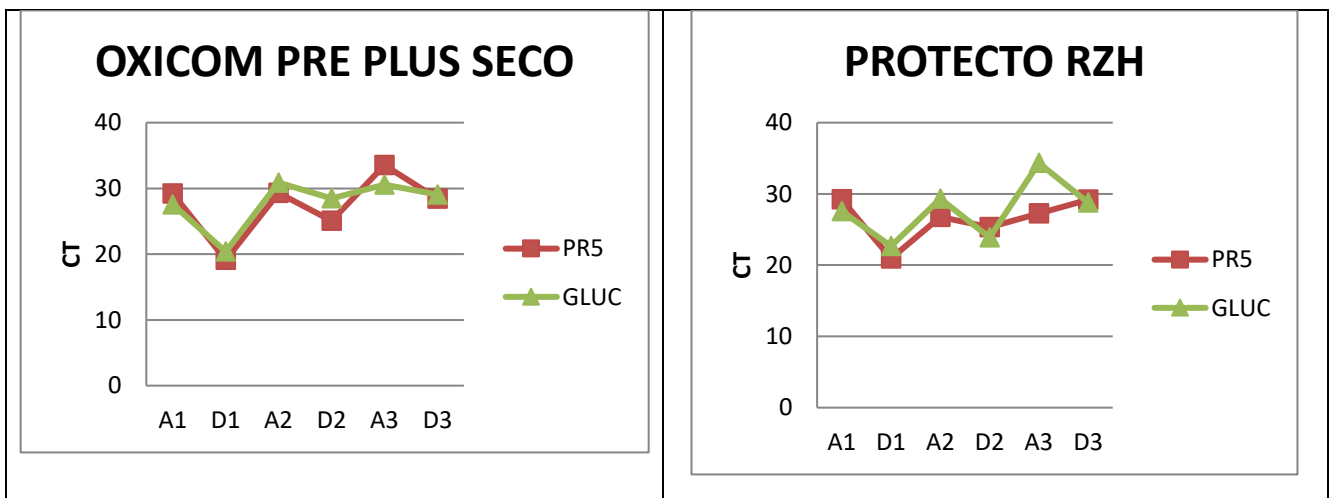


Figura 4. Comparación de valores de Ct del gen experimental respecto al endógeno.

También se muestran los resultados utilizando los valores Cts por cada tratamiento, éstos se muestran a continuación.



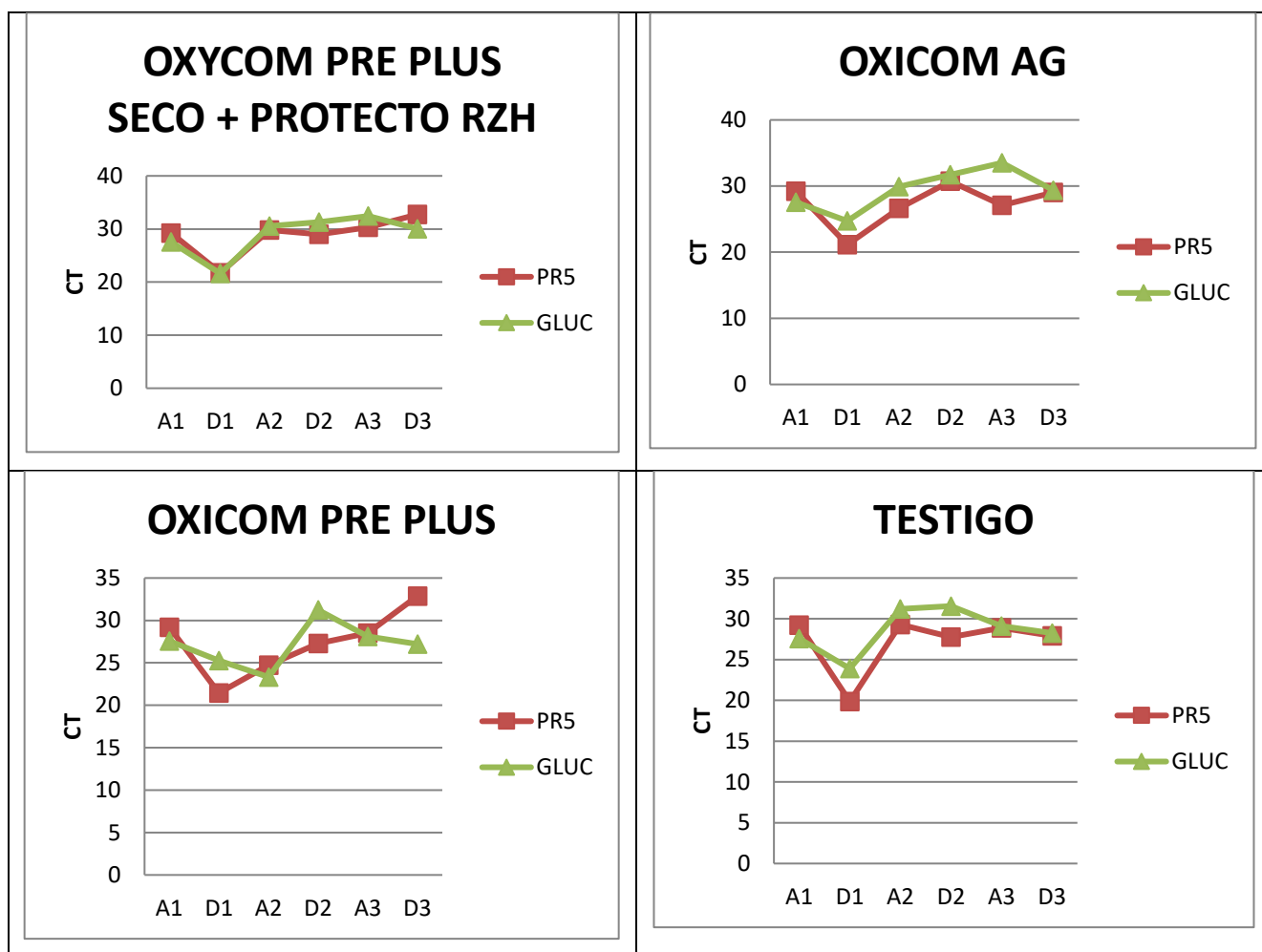


Figura 5. Expresión de PR5 y Glucanasa por tratamiento en cada aplicación.

Se creyó conveniente mostrar los resultados considerando también los valores Ct de cada gen obtenido en cada uno de los tratamientos para observar la tendencia que sigue cada tratamiento. El gen PR-5 mostró mayores valores de expresión génica que el gen glucanasa. La Figura 6 ilustra estos resultados.

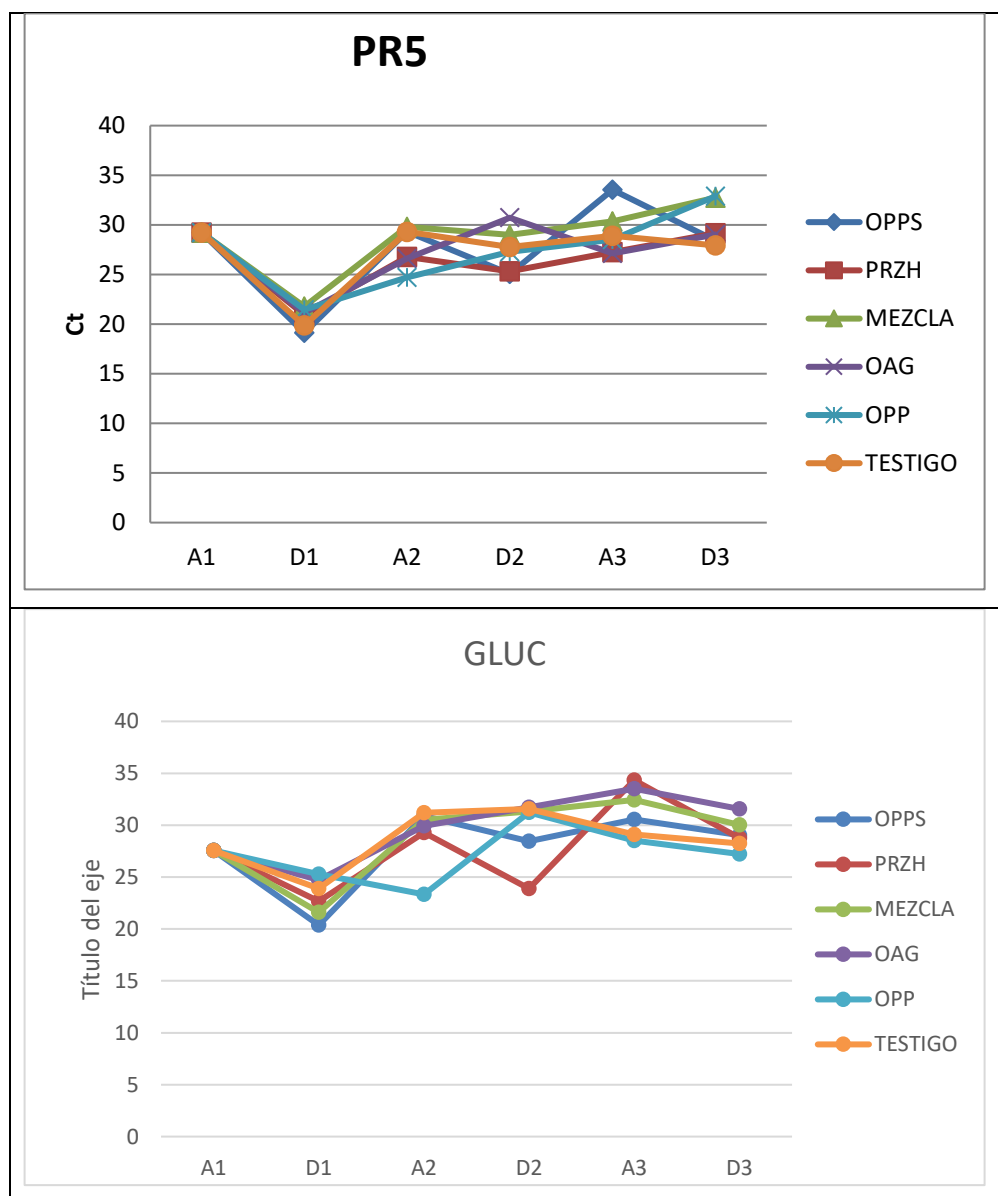


Figura 6. Expresión de cada tratamiento por cada gen.

El siguiente cuadro muestra la expresión génica obtenida con la fórmula antes mencionada utilizando los Cts.

Cuadro 8. Expresión génica obtenida con el método ddCt.

	GLUC		PR5
A1T1	0	A1T1	0
A1T2	0	A1T2	0
A1T3	0	A1T3	0
A1T4	0	A1T4	0

A1T5	0	A1T5	0
A1T6	0	A1T6	0
D1T1	0.08537752	D1T1	2.46228883
D1T2	0.12762652	D1T2	1.3103934
D1T3	0.12674493	D1T3	0.26980706
D1T4	0.13121459	D1T4	0.80664176
D1T5	0.4061262	D1T5	6.49801917
D1T6	0.09342808	D1T6	1.94530989
A2T1	9.98664439	A2T1	18.0009358
A2T2	7.16020057	A2T2	48.8402947
A2T3	9.9176616	A2T3	4.59479342
A2T4	7.67411295	A2T4	42.2242531
A2T5	13.6421583	A2T5	9.78112222
A2T6	5.57897467	A2T6	15.8894799
D2T1	7.4127045	D2T1	46.2057343
D2T2	22.471118	D2T2	6.68070336
D2T3	8.0556444	D2T3	11.6317801
D2T4	3.92583626	D2T4	17.3877578
D2T5	3.27160823	D2T5	38.0546277
D2T6	2.60268371	D2T6	22.943284
A3T1	1.37363623	A3T1	0.12718496
A3T2	0.81507233	A3T2	9.78112222
A3T3	19.0537096	A3T3	3.38698125
A3T4	1.48452357	A3T4	36.7583474
A3T5	2.89386977	A3T5	9.78112222
A3T6	1.99031944	A3T6	9.78112222
D3T1	0.34127343	D3T1	12.817118
D3T2	0.38877302	D3T2	26.9086853
D3T3	1.54114222	D3T3	4.65893435
D3T4	1.4989996	D3T4	1.03526492
D3T5	1.63353798	D3T5	11.8761886
D3T6	2.70944995	D3T6	5.21981979

Las gráficas siguientes muestran la expresión génica obtenida de la fórmula a partir de los Cts.

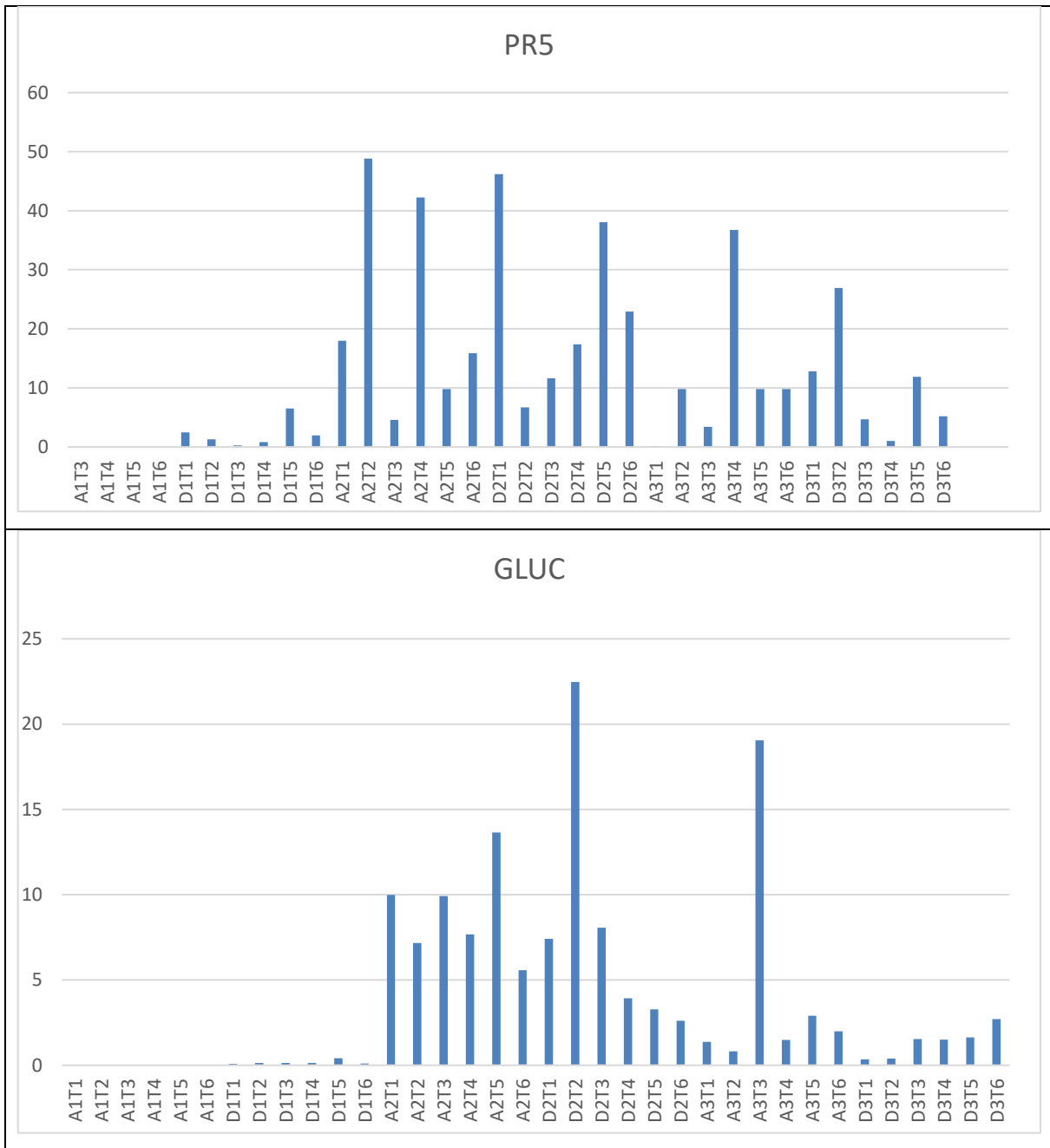


Figura 7. Expresión génica por gen en cada aplicación.

7. DISCUSIÓN

Las plantas exhiben defensas constitutivas e inducidas contra el ataque de patógenos. Silvar (2008) menciona que la compatibilidad e incompatibilidad hospedante-patógeno está determinada por el grado de coordinación entre las diferentes estrategias de defensa, la rapidez y la magnitud con la que ocurre la expresión de genes que codifican para la síntesis de metabolitos que inhiben el crecimiento del patógeno.

A pesar de que no se presentaron patógenos, se detectó la presencia del gen glucanasa y PR-5 desde antes de la aplicación de los tratamientos, posteriormente se observó un aumento en la concentración de ambos genes a partir de la segunda y tercera aplicación, al respecto Van Loon (1999) indica que las proteínas PRs pueden ser detectadas en tejido no infectado, sugiriendo que ellas pueden estar presentes en tejido sano en cantidades pequeñas.

Con respecto al gen peroxidasa, el termociclador no dio lecturas de éste gen para las mediciones realizadas en hoja, esto es debido a que las hojas estaban muy jóvenes y como menciona Cuervo (2009), la inducción de la actividad peroxidasa está asociada a la lignificación, que a nivel del tallo, hace parte de los mecanismos asociados a defensa. Yamunarani et al. (2004), reportan aumento de actividad peroxidasa en tomate, un día después de inducir resistencia en la planta, con extracto de agallas de *Quercus infectoria*. En otro modelo planta-patógeno, algunas isoenzimas de POD se indujeron en raíces y hojas de pimienta luego de inoculación con esporas de *Paenibacillus illinoisensis*. Por otro lado, Luhova et al. (2006), realizaron un análisis de actividades enzimáticas, entre ellas la de peroxidasa, en raíces de 2 genotipos de *Pisum sativum* con diferente susceptibilidad a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, y encontraron un aumento de actividad para esta enzima en raíces infectadas a partir del día 2 y hasta el 28 pos-inoculación.

Los resultados sugieren que no hubo prácticamente efecto sobre el sistema antioxidante en hojas; esto debido que las hojas estaban en pleno desarrollo vegetativo, por lo tanto no hubo procesos oxidativos que indujeran la acumulación de peroxidasa en las hojas de jitomate estudiadas.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman la activación de los genes para las proteínas Glucanasa y PR5 en hoja, para el gen de la proteína peroxidasa no se obtuvieron lecturas en hoja. Esta activación es ayudada en presencia de los productos Oxycom Prep Plus Seco, Protecto RZH, Mezcla de Oxycom Prep Plus Seco más Protecto RZH, Oxycom AG y Oxycom Prep Plus.

Los niveles de expresión de los genes tendieron a incrementarse con las aplicaciones de los bioprotectores; siendo más marcadas en la segunda y tercera aplicación. El gen PR5 tuvo mayores valores de expresión génica que el gen glucanasa.

La cuantificación relativa con qPCR permitió determinar el efecto en la expresión de los genes PR sujetos a los tratamientos Oxycom Prep Plus Seco, Protecto RZH, Mezcla de Oxycom Prep Plus Seco más Protecto RZH, Oxycom AG y Oxycom Prep Plus.

La mezcla constituida de Oxycom Prep Plus Seco más Protecto RZH, fue el mejor tratamiento, ya que todos los genes se ven incrementados durante la primera y segunda aplicación y tienden a disminuir de manera no drástica a partir de la tercera. En esta combinación, al parecer el responsable del comportamiento de la sobre expresión de los genes fue el tratamiento Protecto RZH, ya que al evaluarse individualmente ocasionó una mayor sobre expresión en los genes cuantificados.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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.

Aist, J. R., Gold, R.E. 1987. Prevention of fungal ingress: the role of papillae and calcium. In S. Nishimura, C. P. Vance, N. Doke, eds., *Molecular Determinants of Plant Disease*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp 47–59

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

Bednarek, S. K., and Raikhel, N. V. 1991. The barley lectin carboxyl-terminal propeptide is a vacuolar protein sorting determinat in plants. *The Plant Cell* 3:1195-1206.

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.

Brisson, L. F., Tenhaken, R., Lamb, C. J. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6: 1703–1712

Browning, J. A. 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. P 52-75.

Castresana, C., de Carvalho, F., Gheysen, G., Habets, M., Inze, D., Van Montagu, M. 1990. Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana glauca* beta-1,3 glucanase gene. *Plant Cell* 2:1131-1143.

Cuervo, D. et al. 2009. Inducción diferencial de la enzima peroxidasa y su relación con lignificación en los mecanismos de defensa del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. *Rev. Colomb. Quim.* Vol. 38 no.3

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.

Edreva A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiology*. 31(1-2):105-124.

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

Fagoaga, C., I. Rodrigo y V. Conejero 2001. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Molecular Breeding* 7:175-85.

Félix, G., and Meins, F.J. 1986. Developmental and hormonal regulation of β , 1-3 glucanase in tobacco. *Planta* 167:206-211.

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.

Hoj, P.B. and Fincher, G.B. 1995. Molecular evolution of plant β -glucan endohydrolases. *The Plant Journal* 7:367-379.

Jung, W.-J.; Jin, Y.-I.; Kim, Y.-CH.; Kim, K.-Y.; Park, R.-D.; Kim, T.-H. 2004. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici* *Biol. Control*. 30: 645-652.

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.

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.

Leubner-Metzger G, Meins F (1999) Functions and regulation of plant β -1,3 glucanases (PR-2). En Datta SK, Muthukrishnan S (Eds.) *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU. pp. 49-66.

Luhova, L.; Lebeda, A.; Kutrova, E.; Hedererova, D.; Pec, P. 2006. Peroxidase, catalase, amine oxidase, and acid phosphatase activities in *Pisum sativum* during infection with *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. *Biol. Plantarum*. 50 (4): 675-682.

McInnis, S. M., D. C. Emery, R. Porter, R. Desikan, J. T. Hancock, and S. J. Hiscock. 2006. The role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidases (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *J. Exp. Bot.* 8: 1835-1846.

Milosevic, N., Slusarenko, A. J. 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiol Plant Pathol* 49: 43–158.

Monties, B. 1989. Lignins. In P. M. Dey, J. B. Harborne, eds., *Methods. Plant Biochem Vol I*. Academic Press, London, pp. 113–157

Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, F. y Mössinger, 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. “Cultivo de Jitomate en Hidroponía e Invernadero”. 2da edición. Departamento de Fitotecnia Universidad Autónoma de Chapingo. México, 2006.

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

Nishizawa, Y; Nishio, Z; Nakazono, K; Soma, M; Nakajima, E; Ugaki, M ; Hibi, T. 1999 Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theoretical and Applied Genetics* 99:383-390.

Paxton, JD. 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology* Z.101:106-109.

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. Tesis Licenciatura. Departamento de Ciencias de la Vida. Ecuador.

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.

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

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

Shinshi, H., Wenzler, H., Neuhaus, J. M., Felix, G., Hofsteenge, J. and Meins, F. Jr. 1988. Evidence for N- and C-terminal processing of a plant defense-related enzyme: Primary structure of tobacco prepro- β -1,3-glucanase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85:5541-5545.

Silvar, C., Merino, F., and Diaz, J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*, Journal of Plant Physiology, 165:1120-1124.

Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kaufmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B. 1993. Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie 75:687.

Takeuchi, Y., Yoshikawa, M., Takeba, G., Kunisuke, T., Shibata, D., and Horino, O. 1990. Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin

elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, in soybean. *Plant Physiology* 93:673-682.

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. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. Pp. 1-12. in: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Datta S. K. and Muthukrishnan, S. (Eds.). CRC Press LLC.

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

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* 3: 1–12.

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

Yamunarani, K.; Jaganathan, R.; Bhaskaran, R.; Govindaraju, P.; Velazhahan, R. 2004. Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes. *Acta Physiol. Plant.* 26 (3): 281-290.

Yoshida, K., P. Kaothien, T. Matsui, A. Kawaoka, and A. Shinmyo. 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 665-670.

Zhang, H., Xie, X., Xu, Y. y Wu, N., 2004, Isolation and fuctional assessment of a tomato proteinase inhibitor II gene, *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol 42, pg. 437-444.

<http://www.fao.org/statistics/es/>