

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN  
Y DESARROLLO, A.C.**

**EXPRESIÓN DE GENES DE TRIGO (*Triticum aestivum*  
L.) INVOLUCRADOS EN LAS RESPUESTAS  
DEFENSIVAS CONTRA FITOPATÓGENOS POR LA  
APLICACIÓN DE DERIVADOS DE QUITOSANO**

Por:

**Juan Manuel Díaz Martínez**

TESIS APROBADA POR LA  
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2012

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis del Ing. Juan Manuel Díaz Martínez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en fisiología vegetal molecular.



---

Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez

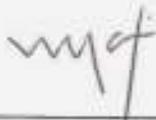
Director de tesis



---

Dra. Irasema Vargas Arispuro

Asesora



---

Dra. María Auxiliadora Islas Osuna

Asesora



---

Dr. Alejandro Bernardo Falcón Rodríguez

Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero en este proyecto de investigación y brindarme apoyo económico durante mi Maestría.

Al centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por haberme aceptado en el programa de Maestría en Ciencias y permitirme llevar a cabo los estudios y mi trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez, por aceptarme como su estudiante y fungir como director en esta investigación, por el apoyo incondicional, por los consejos, por la disponibilidad que me brindo siempre que la necesite y su dedicación en este trabajo.

Agradezco a mi comité de tesis, la Dra. Irasema Vargas Arispuro, la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna y el Dr. Alejandro Falcón Rodríguez, por su disposición y atención brindada en la revisión de la tesis así como también sus consejos y apoyo brindado durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A mi madre por tener la confianza y darme el apoyo incondicional, su amor brindado, apoyarme en mis decisiones y regalándole un paso más de mi preparación académica, muchas gracias.

A mi padre por darme consejos que me ayudan ser una mejor persona, tomar su ejemplo, no cometiendo los mismos errores y sacar lo bueno, su humildad y demostrándole que si se puede ser mejor.

A mis hermanos Isidro y Anna por su cariño, apoyo incondicional, porque siempre han estado ahí brindándome todo su cariño y amor fraternal sin condiciones.

A los técnicos del laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular, el M.C. Emmanuel Aispuro Hernández, la M.C. Marisol Ochoa Villareal, al Q.B. Francisco Soto Córdova, gracias por auxiliarme en el trabajo, por el apoyo técnico brindado en los análisis correspondientes en la investigación, así como sus asesorías en las técnicas moleculares e interpretación de resultados obtenidos en el presente trabajo, además, de brindarme su amistad y comprensión.

A la Q.B. Olivia Briceño porque a pesar de no estar en el laboratorio sigue siendo parte importante y está pendiente de todo lo relacionado a él, además de ser una persona muy agradable cuando conversas con ella.

Al laboratorio de ecología química, la M.C. Consuelo Guadalupe Corrales Maldonado, la Q.B. Socorro Vallejo Cohen por el apoyo técnico brindado en la utilización del rotovapor para los análisis del quitosano.

A la Dra. Carmen Contreras por las asesorías brindadas y por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al laboratorio de polímeros, al Dr. Jaime Lizardi, por su apoyo en algunas cuestiones sobre el quitosano, masa molar y acetilación del compuesto, por prestarme los equipos de su laboratorio para realizar dichos análisis.

Agradezco a Azucena Gándara Ledezma, por su enorme paciencia y ser mi apoyo en muchas ocasiones durante mucho tiempo, por estar siempre en las buenas y en las malas conmigo, por ser mi mejor amiga, mi compañera y mi amante, por su amor y comprensión por eso y mucho más, Te amo =) !

A mis compañeros del laboratorio, Vanessa García, Yuri Edith, Gaby Andrade, Juan Reyes, Valentín León, por su apoyo y amistad brindada, por hacer del trabajo más agradable y ameno.

Al M.C. Gabriel Iván Romero Villegas primeramente por recomendarme para entrar a trabajar al laboratorio antes de comenzar mi maestría y segundo por su apoyo y amistad brindada desde la carrera en el ITSON, hasta la fecha.

A mis compañeros de generación que son muchos y no quiero que me falte ninguno, les agradezco a todos por formar parte y compartir conmigo muchos momentos que nunca olvidaré.

A todos los investigadores que impartieron las materias que curse durante el transcurso de la maestría, gracias por su tiempo y asesorías brindadas.

¡Muchas gracias!

## DEDICATORIA

A Dios y a la vida por permitirme estar en el lugar y tiempo adecuado

A mi madre a quien le debo mi vida, porque siempre estuvo apoyándome y sé que siempre lo hará, guiándome por el camino correcto hasta el final, te quiero  
mama.

A mis hermanos, porque el vivir y haber crecido con ustedes ha sido el mejor regalo.

A mi compañera de vida Azucena, por estar a mi lado y animarme a seguir siempre adelante, te amo.

# ÍNDICE

	Página
APROBACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	Xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Cultivo de Trigo y su Importancia Económica.....	4
Enfermedades Fitopatógenas del Trigo.....	4
Métodos de Control de Enfermedades Fungosas.....	5
Químicos.....	6
Culturales.....	7
Biológicos y Orgánicos.....	7
Explotación de la Respuesta Sistémica Inducida de la Planta en la Protección de Cultivos.....	8
Interacción Planta-Patógeno.....	9
Respuestas Local o Hipersensible.....	10
Respuestas Sistémicas.....	10
Oligosacarinas y sus Derivados como Elicitores Biológicos.....	11
Pared Celular de Vegetales.....	12
Pared Celular Fúngica.....	13
Quitina y Quitosano.....	15
Inducción de Respuestas de Defensa por la Aplicación de Oligosacáridos de Quitosano.....	16
Hipótesis.....	19

Objetivos.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Material Vegetal.....	20
Polímeros de Quitosano y Disoluciones de los Compuestos.....	21
Mezcla de Oligosacáridos de Quitosano OLG.....	21
Ensayo Biológico de Aplicación de Quitosanos en Plantas de Trigo.....	22
Estudio Molecular.....	23
Extracción de ARN Total.....	23
Diseño de Oligonucleótidos Específicos.....	23
Síntesis de ADN Complementario (ADNc).....	24
Amplificación de Genes <i>PAL</i> , <i>QUIT</i> , <i>B-1-3GLU</i> y <i>GAPDH</i> .....	25
Análisis Estadístico.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Caracterización Físico-Química del Quitosano.....	26
Acetilación y Peso Molecular del Polímero.....	26
Hidrólisis de Quitosano.....	29
Evaluación de la Expresión de Genes Relacionados a la Defensa en Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.) por la Aplicación Foliar y Adición al Sustrato de Quitosano y Oligosacáridos de Quitosano.....	34
Expresión de Fenilalanina amonio-liasa ( <i>PAL</i> ).....	34
Expresión de $\beta$ -1-3 Glucanasa ( <i><math>\beta</math>-1-3 GLU</i> ).....	40
Expresión de Quitinasa ( <i>QUIT</i> ).....	45
CONCLUSIÓN.....	51
RECOMENDACIONES.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53
ANEXOS.....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Activación de vías metabólicas en la célula vegetal tras la detección de elicitores biológicos.....	11
2	Estructura general de los oligogalacturónidos.....	13
3	Estructura de un beta-glucano.....	14
4	Representación esquemática de la reacción de desacetilación de la quitina para obtener quitosano.....	15
5	Material vegetal utilizado.....	20
6	Ensayos para la aplicación de los tratamientos.....	22
7	Espectro infrarrojo de quitosano utilizado en este estudio.....	28
8	Reducción de viscosidad de la hidrólisis de quitosano a través del tiempo.....	31
9	Incremento de azúcares reductores de la hidrólisis de quitosano a través del tiempo.....	31
10	MALDI-TOF-MS de la fracción insoluble en metanol al 90% de los oligosacáridos obtenidos a través de una hidrólisis enzimática de quitosano.....	33
11	Cambios en la expresión relativa del gen de <i>PAL</i> en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con quitosano.....	38
12	Cambios en la expresión relativa del gen de <i>PAL</i> en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con oligosacáridos de quitosano.....	39
13	Cambios en la expresión relativa del gen de $\beta$ -1-3 <i>GLU</i> en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con quitosano.....	43
14	Cambios en la expresión relativa del gen de $\beta$ -1-3 <i>GLU</i> en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con oligosacáridos de quitosano.....	44
15	Cambios en la expresión relativa del gen de <i>QUIT</i> en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con quitosano.....	48
16	Cambios en la expresión relativa del gen de <i>QUIT</i> en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con oligosacáridos de quitosano.....	49

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Productos utilizados para el control químico de enfermedades fungosas en trigo.....	6
2	Diseño de iniciadores utilizados para la expresión de los genes de defensa.....	24
3	Composición iónica asignada de los oligosacáridos de quitosano por el espectro de MALDI-TOF-MS.....	33
4	Incrementos de la expresión de genes de defensa por la aplicación de quitosano y los oligosacáridos de quitosano.....	50

## LISTADO DE ABREVIATURAS

OS:	Oligosacarinas
OGAS:	Oligogalacturónidos
OLG:	Oligosacáridos de quitosano
GlcNAc	Glucosamina con acetilación en el grupo amida
GlcNH <sub>2</sub>	Glucosamina sin la acetilación en el grupo amida
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrógeno
O <sup>2-</sup> :	Anión superóxido
<sup>•</sup> OH:	Radical hidroxilo
PR:	Proteínas relacionadas a la patogénesis
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRR:	Receptores de reconocimiento de patrones
RH:	Respuesta hipersensible
GA:	Grado de acetilación
GP:	Grado de polimerización
KOH:	Hidróxido de potasio
KBr:	Bromuro de potasio
DDS:	Días después de sembrado
MM:	Masa molar
kDa:	Kilodaltones
ARN:	Ácido ribonucleico
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
ANOVA:	Análisis de varianza completamente al azar
PAL:	Fenilalanina ammonio-lyasa
QUIT:	Quitinasa
β-1-3 GLU:	β-1-3 Glucanasa
CHI:	Quitinasa, en inglés

## RESUMEN

Las plantas como organismos inmóviles están obligadas a responder a los estreses bióticos y abióticos del entorno en el que se desarrollan. A las respuestas de defensa se le ha tomado mucha importancia ya que la planta al ser expuesta ante una situación de estrés, crea un repertorio bioquímico capaz de contrarrestar dicho estrés. El trigo es capaz de responder al ataque de patógenos mediante la activación de enzimas de defensa como la fenilalanina amonio-licasa (PAL),  $\beta$ -1-3 glucanasas ( $\beta$ -1-3 GLU) y quitinasas (QUIT), que se generan por la percepción del ataque de fitopatógenos o por la aplicación de elicitores exógenos como los oligosacáridos. Se ha demostrado que el quitosano induce la actividad de enzimas de defensa en tabaco, arroz, vid, entre otros, pero se desconoce el efecto en la expresión de genes de defensa en las plantas por la aplicación del polímero y los oligosacáridos derivados de este. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de genes de defensa contra fitopatógenos por efecto de la aplicación de quitosano y una mezcla de oligosacáridos derivados de quitosano en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) cv 'Tacupeto'. Se caracterizó el polímero con técnicas como viscosimetría y espectroscopia de infrarrojo, dando como resultados un compuesto con masa molar de 50 kDa y un GA de 15.5%. Además, se obtuvieron por hidrólisis enzimática del polímero una mezcla de oligosacáridos de quitosano con GP de 3 a 4. Estos tratamientos fueron aplicados de manera foliar y adición al sustrato a concentraciones de 0.1 y 1 g\*L<sup>-1</sup>, induciendo cambios en la expresión de genes como PAL,  $\beta$ -1-3 GLU y QUIT en hojas de planta de trigo, las respuestas en la planta se presentaron de manera local y sistémica. La activación diferencial de los genes implicados en la defensa va a depender tanto de las características del compuesto, como de la concentración y el modo de aplicación. Es importante comprender estas respuestas para el desarrollo de nuevas herramientas que permitan mejorar y diversificar tecnologías que en un futuro protejan a plántulas de trigo ante el ataque de hongos fitopatógenos.

## INTRODUCCIÓN

El uso de agroquímicos sintéticos es cuestionado por su efecto ambiental y limitado por las exigencias actuales de los consumidores, quienes demandan productos alimenticios libres de sustancias tóxicas o químicos potencialmente dañinos a la salud. Debido a esto, la búsqueda de compuestos alternativos que suplan la acción de diversos compuestos sintéticos se torna relevante (Enríquez-Guevara et al., 2010). En la última década los fisiólogos vegetales se han interesado en el estudio de oligosacáridos (OGAS) derivados de la pared celular de plantas, hongos y otros inductores como el quitosano, que en concentraciones bajas presentan actividad biológica (Vorwerk et al., 2004).

Las plantas como organismos inmóviles están obligadas a superar los retos que les plantea su entorno y responder a ellos. Dichas respuestas les permite crecer, reproducirse y defenderse. Esta última se le ha tomado mucha importancia ya que la planta al ser expuesta ante una situación de estrés crea un repertorio bioquímico increíble, capaz de contrarrestar dicha situación (Vivanco et al., 2005). La planta de trigo al igual que otras plantas, es capaz de responder al ataque de patógenos mediante la activación de respuestas defensivas a nivel local y sistémico (García-Brugger et al., 2006; Randoux et al., 2010). Las membranas de las células atacadas pueden detectar fragmentos de su propia pared celular (oligosacáridos) o de la pared celular de patógeno, que se liberan por la acción de enzimas hidrolíticas de ambos organismos cuando se establece la interacción (Agrios, 2005).

El primer cambio que ocurre después de la aplicación de una señal elicitora es la depolarización de la membrana. Este evento está relacionado con la transducción de la señal defensiva y puede ser percibido segundos después de la elicitación cuando se trabaja con células en suspensión. Provoca apertura

de canales iónicos en la membrana con entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$  al citoplasma en equilibrio con la salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  causando la acidificación del citoplasma y la basificación de la región del apoplasto (Zhao et al., 2005; Garcia-Brugger et al., 2006). El catión  $\text{Ca}^{2+}$  funciona como señal secundaria y su acumulación en el citoplasma permite también la producción e incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la ulterior expresión de genes defensivos. Este hecho es conocido como explosión oxidativa y ocurre a las pocas horas de detectado la señal inductora por la planta (Aziz et al., 2004; Garcia-Brugger et al., 2006; Zhao et al., 2005). Tal producción de ROS se da como resultado de una serie de mecanismos enzimáticos como el de peroxidasas de la pared celular, lipoxigenasas y la transferencia de electrones que ocurre en organelos como las mitocondrias y los cloroplastos (Zhao et al., 2005).

Estos compuestos producen una reacción oxidativa y señalizadora en la célula huésped como los radicales de hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Zhao et al., 2005). Es importante que la planta detecte oportunamente estos compuestos, para que active a tiempo su mecanismo de defensa para contrarrestar la infección por el patógeno.

El aumento de ROS constituye una señal que activa la expresión de genes tempranos involucrados en la detoxificación de estos mismos y en la producción de sustancias antimicrobianas, como fitoalexinas, material para la producción de ligninas y reforzamiento de la pared celular (Torres et al., 2006). Por otra parte, hay una alta producción de péptidos y proteínas defensivas, la mayor parte de ellas conocidas como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Hématy et al., 2009). Dentro de las proteínas PR se incluyen enzimas hidrolíticas como quitinasas y  $\beta$ -1-3 glucanasas (Aziz et al., 2004; Falcón-Rodríguez et al., 2009). Las proteínas PR son esenciales en las defensas de las plantas, que actúan en la degradación de la pared celular del patógeno, generando resistencia frente a la infección e incluso contribuyendo a incrementar la permeabilidad de la membrana fúngica (Riveros, 2010).

Existen inductores exógenos que activan la respuesta y la expresión de genes relacionados a la defensa, como es el caso del quitosano. Éste es un polímero derivado de la desacetilación de la quitina que es un elemento estructural del exoesqueleto de crustáceos (cangrejos, langosta, camarón, etc.). Está formado por residuos de glucosamina unidos por enlaces  $\beta$  1-4, cuyos grupos aminos pueden estar parcialmente acetilados. Autores han informado que promueve el crecimiento de las plantas, inhibe el desarrollo de microorganismos e induce resistencia en plantas contra patógenos (Bautista-Baños et al., 2006). En plantas de tabaco ha sido muy estudiado la activación de enzimas relacionadas a esta defensa contra oomycetes fitopatógenos del genero *Phytophthora* (Falcón-Rodríguez et al., 2011). Estas respuestas y la activación de genes pueden verse afectadas en mayor o menor medida por la acetilación (GA) del compuesto como en su grado de polimerización (GP) (Falcón-Rodríguez et al., 2011; Khan et al., 2003).

## ANTECEDENTES

### Cultivo de Trigo y su Importancia Económica

El trigo (*Triticum* spp.), como los demás cereales, es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las *Poaceae* (gramíneas), siendo las variedades más cultivadas *Triticum durum* y *T. compactum*. El trigo harinero hexaploide llamado *T. aestivum* es el cereal panificable más cultivado en el mundo (FAO, 2009). El trigo ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre, siendo el cereal más cultivado considerado un alimento para consumo humano, aunque gran parte se destina a la alimentación animal. En el noroeste de México se cultiva en condiciones de irrigación, específicamente en los valles del Yaqui y del Mayo en el estado de Sonora, y en los valles del Carrizo y del Fuerte en el estado de Sinaloa (Singh et al., 2004). México tiene una producción de 3,741,915.72 Ton, de las cuales Sonora ocupa el primer lugar con 1,917,982.83 Ton, seguido de Baja California y Guanajuato con 623,865.45 y 303,575.57 Ton respectivamente (SIAP, 2010).

### Enfermedades Fitopatógenas del Trigo

Las royas son enfermedades ampliamente distribuidas a nivel mundial y conocidas por el potencial destructivo en los cereales (Solís-Moya et al., 2007). El patógeno causante de esta enfermedad es un hongo del género *Puccinia*, que se desarrolla a temperaturas que oscilan de 10 a 30°C y se presenta en todas las regiones donde se cultiva el trigo (Stubbs, 1988). Existen diferentes tipos de roya como las del tallo (*P. graminis*) de la hoja (*P. triticina* Eriks o *P. recondita*) y la lineal o amarilla (*P. striiformis*). Si bien es cierto la roya es una enfermedad típica de las zonas trigueras de México de mayor importancia económica e histórica, porque es la más distribuida en el noroeste y valles altos, en las que causa pérdidas significativas que varían de 30 a 60 % según la

variedad y las condiciones climáticas (Villaseñor et al., 2003). En Sonora también se presenta año con año desde que se hizo su aparición en el ciclo agrícola del 2002-03 (SIAFESON, 2009).

Las pérdidas en el rendimiento del grano se deben principalmente a la reducción del área fotosintética y varían de 10 hasta un 30 % o más, lo que implica una reducción en la cantidad de nutrientes necesarios en todos y cada uno de los procesos de desarrollo, respiración y reproducción de la planta (Mendoza, 1993). Así como también las infecciones en estado de plántula, pueden causar la muerte de la misma (Roelfs et al., 1992).

## Métodos de Control de Enfermedades Fungosas

Es esencial conocer la epidemiología de una enfermedad antes de iniciar cualquier estrategia de control, en especial una que implique el empleo de químicos o prácticas de cultivo (Roelfs et al., 1992). La recomendación para combatir la roya sería el combinar las prácticas de cultivo con la introducción de variedades genéticamente resistentes ya que no representa ningún riesgo al ambiente y a la larga es la forma más económica (Ma et al., 1997). Sin embargo, los hongos son capaces de producir genotipos que vencen dicha resistencia, por lo tanto, el mejoramiento y la inducción de resistencia en las plantas debe ser una actividad continua (Schafer, 1987). El control químico combinado con las variedades resistentes es el método actual de control sin llegar a ser del 100 % efectivo. Por tal motivo se está optando por implementar tecnologías eficientes y que sean más amigable con el ambiente, como la aplicación de compuestos biológicos y elicitores que inducen resistencia en plantas, tal es el caso de microorganismos benéficos, predadores, antagonistas, extractos vegetales y el quitosano (Lira-Saldivar, 2003; Lárez, 2008; Badii y Abreu, 2006).

## Químicos

Las royas se pueden controlar con aspersiones de fungicidas sintéticos como los mencionados en la Tabla 1, pero aumentan los costos de cultivo y los daños al ambiente, así como también la salud de las personas (Sandoval, 1999). Esta práctica se ha adoptado en forma generalizada en toda el área triguera y no siempre con criterios adecuados para lograr la mayor eficacia. Criterios como el nivel de incidencia o severidad y el estado de desarrollo del cultivo determinan aplicaciones inoportunas o aplicaciones adicionales con fungicidas, con incremento de los costos o pérdidas innecesarias por la menor efectividad de los productos (Roelfs et al., 1992).

Tabla 1. Productos utilizados para el control químico de enfermedades fungosas en trigo.

MATERIA ACTIVA	INGREDIENTE ACTIVO	DOSIS	PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO
Carbendazina 8 % + Maneb 64 %	Bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo + Etilenbisditiocarbamato manganoso	2.5-3 kg/ha	Polvo mojable
Fempropimorf 75 %	<i>cis</i> -4-[3-(4- <i>ter</i> -butilfenil)-2-metilpropil]-2,6-dimetilmorfolina,	1 l/ha	Concentrado emulsionable
Propiconazol 10 %	1-[2-(2,4-dilorofenil)-4-propyl-1,3-dioxolan-2-ylmetil]-1H-1,2,4-triazol	1.25 l/ha	Concentrado emulsionable
Tebuconazol 25 %	1-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmetil)-3-pentanol	1 l/ha	Emulsión de aceite en agua
Triadimenol 25 %	1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-2-butanol,	0.5 l/ha	Polvo mojable

El periodo crítico para la determinación del rendimiento del grano es en los 20 a 30 días antes del 50% de la floración y los 10 días posteriores, por lo tanto es el momento en que el cultivo debe presentar un área foliar sana para

aprovechar la radiación, maximizar su crecimiento y la viabilidad de los granos (SIAFESON, 2009).

## **Culturales**

Uno de los métodos de control de patógenos es la técnica de solarización, que consiste en cubrir el suelo con una película de plástico transparente, la energía solar se aprovecha y es absorbida por el suelo húmedo para incrementar la temperatura a niveles letales. Esta técnica es utilizada para muchos fitopatógenos, insectos y malezas (Katan, 1995).

Otro método utilizado es la rotación de cultivos por cultivos poco susceptibles que cumple un rol fundamental en el control de plagas y enfermedades, además de que secuencias de cultivos diferentes inciden en las propiedades del suelo. Esta estrategia puede influir en el abastecimiento de nutrientes, la capacidad de los suelos de infiltrar y retener agua, la estabilidad de los agregados, el tenor de materia orgánica, la evolución de las poblaciones de malezas, etc. También el incluir nuevos rastrojos en la rotación ayuda a recomponer o mantener propiedades del suelo que se han visto afectadas por períodos agrícolas prolongados (Forján, 2002). En trigo no es común usar este método contra la roya, ya que los agricultores han optado por usar químicos sintéticos o variedades resistentes a esta enfermedad.

## **Biológicos y Orgánicos**

El control biológico consiste en la realización de actividades donde se manipulan una serie de enemigos naturales, también llamados depredadores, con el objetivo de reducir o incluso llegar a combatir por completo a parásitos que afecten a una plantación determinada. Los métodos orgánicos se ocupan de controlar el número y de reducir los daños ocasionados por las plagas. No es un método que cure las enfermedades ni los virus, pero sí mejora las

propiedades de la tierra y aumenta la resistencia de las plantas por medio del incremento de la flora y fauna bacterianas (Redpermacultura, 2008; Badii y Abreu, 2006).

Se pueden mencionar muchos métodos biológicos que raramente erradican las enfermedades y son usados para la protección de los cultivos, como la aplicación de preparaciones a base de microorganismos benéficos, predadores, antagonistas y extractos vegetales (Lira-Saldivar, 2003; Badii y Abreu, 2006). Además de la aplicación de elicitors que inducen resistencia en las plantas obtenidos de residuos de la agro-industria como la cascara de camarón de la cual se extrae la quitina y de esta se obtienen compuestos de valor agregado como el quitosano que tiene un alto potencial en el área agrícola por sus diversas propiedades que lo hace sumamente atractivo en la aplicación en el campo (Lárez, 2008; Vander et al., 1998).

## Explotación de la Respuesta Sistémica Inducida de la Planta en la Protección de los Cultivos

La resistencia sistémica inducida (RSI) es un fenómeno natural donde se induce resistencia en la planta contra patógenos como resultado de anteriores infecciones localizadas, del tratamiento previo de la planta con compuestos o productos microbianos o con un diverso grupo de compuestos orgánicos e inorgánicos no relacionados entre ellos. La actividad de resistencia es debida no a una acción antimicrobiana "per se" de los compuestos activadores sino a la inducción por estos, de componentes antimicrobianos en la planta (Kloepper et al., 2004; Kloepper y Ryu, 2006; Walters y Boyle, 2005). De los trabajos efectuados en campo destacan aquellos en los que se logro reducir la incidencia de la roya del cafeto (inducida por *Hemileia vastatrix*) con aspersiones mensuales de conidios de *Verticillium lecanii* (Carrión et al., 1992).

Los quitosacáridos de quitina y quitosano generan reacciones de protección en diversas plantas. En raíces de *Arabidopsis* promueven la deposición de calosa (Millet et al., 2010), acumulación de fitoalexinas en vainas de chícharo (Hadwiger et al., 1994). Recientemente, se estudió el efecto de la aplicación de derivados de quitosano en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), y encontraron que la naturaleza química y longitud del polímero influyen en la respuesta defensiva (Falcón-Rodríguez et al., 2009).

## Interacción Planta-Patógeno

Las plantas están permanentemente expuestas a muchos patógenos. Sin embargo, unos pocos de estos son capaces de causar enfermedades en cada especie de planta, por lo que son resistentes a la mayoría de sus patógenos potenciales. De hecho, la susceptibilidad de una planta a un patógeno es la excepción y no la regla en la interacción de las plantas con los microorganismos en su medio ambiente (Ferreira et al., 2006).

Por lo tanto, para estudiar y comprender cualquier interacción planta-patógeno es necesario tomar en cuenta los dos componentes del sistema. En otras palabras, se debe estudiar la virulencia o avirulencia de un patógeno siempre en relación con la resistencia o susceptibilidad del hospedante. La interacción entre los dos organismos pueden ser de dos tipos *compatibles* o *incompatibles* (Heath, 2000). Cuando el patógeno logra penetrar las barreras defensivas de la planta, establecerse parasíticamente y la infección se extiende por todo el vegetal; se está en presencia de una interacción *compatible*. Por otro lado, se le llama interacción *incompatible* a aquella donde el microorganismo es rechazado por las defensas inducidas en la planta y por tanto no logra establecerse en el vegetal (García-Brugger et al., 2006).

En la actualidad se conoce una serie de elicitores que activan respuestas defensivas llamados PAMP (de las siglas en inglés de “patrones moleculares asociados a patógenos”). Los PAMP se unen a receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que desencadenan la transducción de la señal y que a su vez conllevan la expresión de genes de la célula vegetal comprometidos en las tareas de defensa (Vivanco et al., 2005).

### **Respuesta Local o Hipersensible**

El primer nivel de respuesta defensiva frente a un patógeno que intenta invadir la planta es local, y se manifiesta mediante la síntesis de fitoalexinas y otros compuestos dentro y alrededor de las células infectadas. Adicionalmente, puede o no incorporar el elemento apoptótico de respuesta hipersensible (RH) lo cual provoca primero la restricción del patógeno y posteriormente su destrucción (Vivanco et al., 2005). En esta respuesta, conocida también como muerte celular programada, se movilizan y sacrifican un número limitado de células en contacto con el agresor mediante la síntesis y acumulación en ellas de estructuras con acción antimicrobiana intensa con el objetivo de aislar al patógeno y evitar que se extienda por las partes no infectadas de la planta (Kombrink y Schmelzer, 2001).

### **Respuestas Sistémicas**

Las respuestas sistémicas se manifiestan a distancia y viene a consecuencia de la señalización secundaria producida por las células apoptóticas o células que han activado genes defensivos (Vivanco et al., 2005). Mientras se desarrolla la RH, ocurre la síntesis de una amplia variedad de proteínas en las hojas no inoculadas, a partir del sitio de infección. Dentro de estas se incluyen varias enzimas hidrolíticas, inhibidores de proteasas y varias familias de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Esta respuesta

involucra también la síntesis de fitoalexinas aunque estas son más características en la respuesta local, mientras que las proteínas PR se presentan tanto en la respuesta local como en la sistémica (van Loon et al., 2006). En la siguiente figura se muestra un esquema general de la transducción de señales y activación de genes de defensa ocasionados en la célula vegetal tras la detección de algún compuesto elicitor

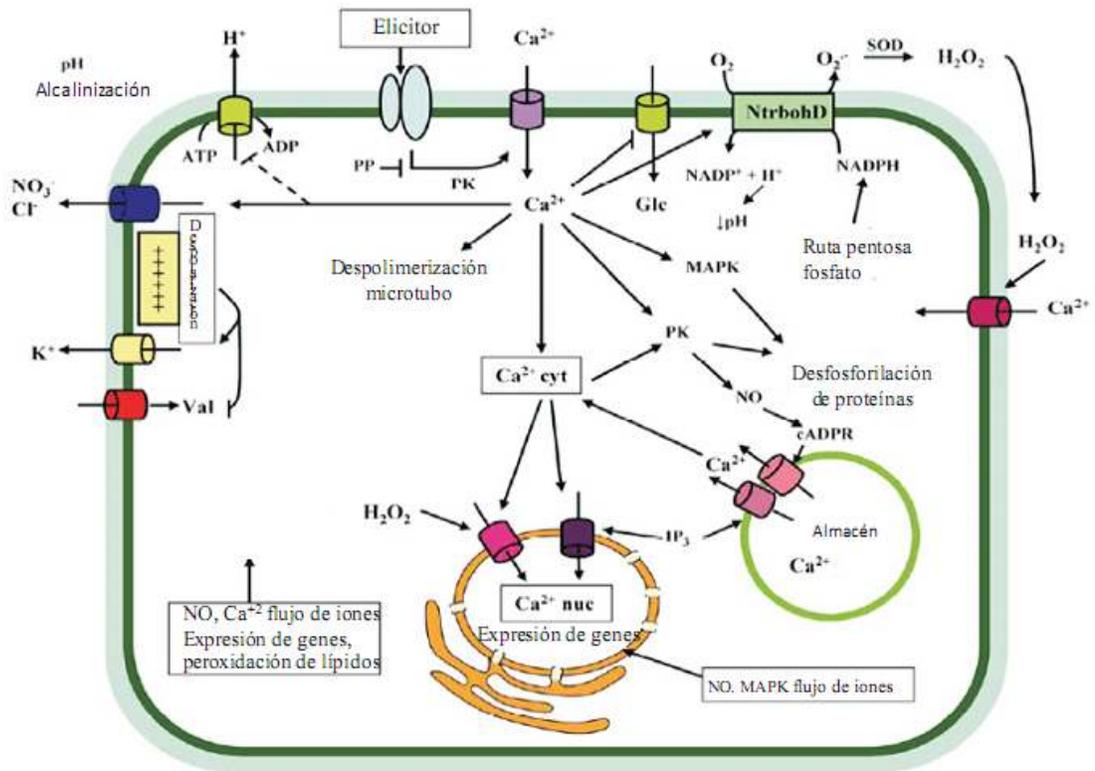


Figura 1. Activación de vías metabólicas en la célula vegetal tras la detección de elicitors biológicos (Garcia-Brugger et al., 2006).

## Oligosacarinas y sus Derivados como Elicitores Biológicos

Las oligosacarinas (OS) provienen de la degradación de las paredes celulares de la planta o del patógeno, que dan lugar a la producción de fragmentos biológicamente activos, estas se pueden liberar por dos vías: a) una

vez que la célula vegetal es invadida por un patógeno, la planta produce enzimas hidrolíticas llamadas proteínas PR como quitinasas y glucanasas que atacan la pared celular del hongo, hidrolizándola y produciendo los OS e incluso algunas como inhibidores de proteinasas y poligalacturonasas microbianas, entre otras, cuya función es muy importante en la patogénesis y; b) el hongo en su ataque a la célula vegetal produce pectinasas y celulasas que degradan la pared celular de la planta, liberando los OGAS biológicamente activos. En cualquiera de estas dos vías, o en asociación, los OGAS son poderosos inductores de los mecanismos asociados con la defensa de la planta (Ito y Shibuya, 2000; Ebel y Cosio, 1994; Riveros, 2010; Boller, 1995; Hahn, 1996).

En las últimas tres décadas, se ha utilizado la aplicación de los OGAS para el manejo de enfermedades. Se conoce que estos OGAS están implicadas en las respuesta de defensa, tales como: la síntesis de fitoalexinas, la explosión oxidativa, la síntesis de etileno, la despolarización de la membrana, los cambios en la liberación de los iones calcio citoplasmáticos, la síntesis de proteínas PR, respuestas locales y sistémicas, entre otras (Boyle y Walters, 2006).

### **Pared Celular de Vegetales**

Un componente de la pared celular en las plantas son las pectinas, importantes polisacáridos constituyentes de las plantas formados de residuos de ácido galacturónico. Estos ácidos son polisacáridos gelificantes que constituyen una fracción homogénea de las pectinas que se localizan en la matriz extracelular de los tejidos suaves de las frutas (Riveros, 2010; Cartaya et al., 2009). Por otro lado, los oligogalacturónidos OGAS son oligosacáridos lineales de unidades de ácido D-galacturónico unidos por enlaces del tipo  $\alpha$  (1-4) como se muestra en la siguiente figura.

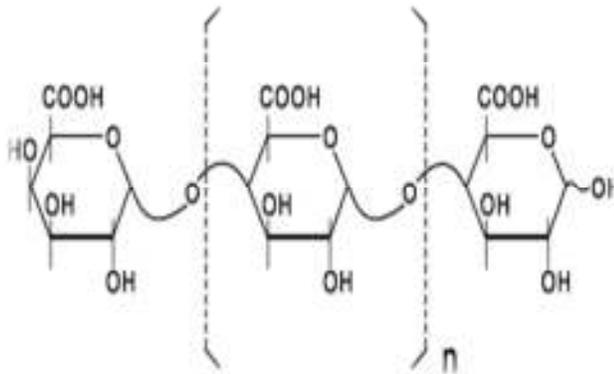


Figura 2. Estructura general de los oligogalacturónidos.

Los oligogalacturónidos son fragmentos de pared celular de plantas degradados por la actividad enzimática de las poligalacturonasas, producida por los hongos fitopatógenos como también por la misma célula (Cote et al., 1998). Los fragmentos producidos pueden presentar diferentes grados de polimerización de los cuales los polímeros con GP de 12, se han revelado como los más activos en la respuesta inducida en las plantas (Shibuya y Minami, 2001). En estudios realizados en trigo, la aplicación de oligogalacturónidos acetilados y no-acetilados incrementaron la actividad de algunas enzimas como Peroxidasa (POD), Oxalato oxidasa (OXO) y Lipoxigenasa (LOX), frente al ataque del hongo *Brumeria graminis*. Sin embargo, no se ha informado como dichas oligosacarinas afectan la dinámica de expresión génica que conlleva a la activación de las respuestas defensivas mencionadas (Randoux et al., 2010).

### **Pared Celular Fúngica**

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da forma a la célula, controla la permeabilidad celular y la protege de los cambios osmóticos. El glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura. La mayoría

de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones  $\beta$ -1,3 (65-90%), aunque también hay glucanos con enlaces  $\beta$ -1,6 (por ejemplo en el género *Candida*, pero no en el género *Aspergillus*),  $\beta$ -1,4,  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4. El  $\beta$ -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se unen covalentemente otros componentes de esta estructura, como se muestra en la figura 3 (Pontón, 2008).

Los oligosacáridos derivados de los polímeros de  $\beta$ -glucanos que conforman la pared celular de patógenos del género *Phytophthora* han sido bien documentados como inductores de respuestas defensivas en plantas (Sharp et al., 1984). En células de tabaco, el hepta- $\beta$ -glucósido no actuó como elicitador. Sin embargo, una cadena lineal de  $\beta$  1-3 glucano (laminarina), extraída del alga *Laminaria digitata* mostró ser un elicitador activo de respuestas defensivas (Klarzynski et al., 2000) e incluso causó la reducción de la infecciones fungosas en hojas de vid por *Botrytis cinerea* y *Plasmopara viticola* (Aziz et al., 2003). Recientemente, con la aplicación de oligoglucanos extraídos del hongo *Trichoderma harzianum*, se mostró un efecto en la activación del sistema antioxidante en plantas de calabaza (*Cucurbita pepo* L.) (Ceron-Garcia et al., 2011).

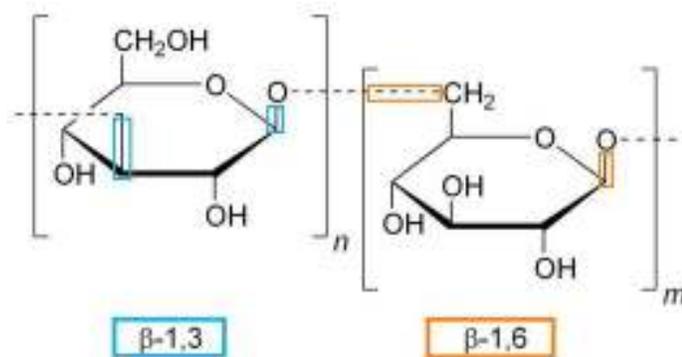


Figura 3. Estructura de un beta-glucano.

## Quitina y Quitosano

La quitina es el polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa (Figura 4). Está presente en la pared celular de hongos, levaduras y en el exoesqueleto de los invertebrados como cangrejos e insectos. Se ha reportado la presencia de este polisacárido natural en bajas concentraciones en la pared celular de algunos hongos fitopatógenos como es el caso de *Fusarium solani* (Paz-Lago et al., 1999), *Rhizopus oryzae* (Wei et al., 2008), y de los Zygomycetos (Zamani et al., 2007).

El quitosano, es un polisacárido que se obtiene de la quitina parcialmente desacetilada y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, es un biopolímero lineal constituido por unidades de D(+)-glucosamina unidas entre sí por enlaces  $\beta(1,4)$ . Oficialmente el quitosano es nombrado por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) como: poli(2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa) (Alimuniar y Zainuddin, 1994). Mostrado en la siguiente figura.

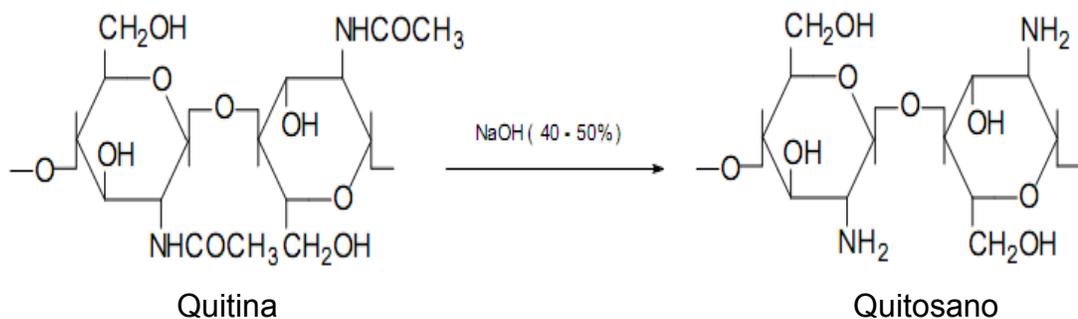


Figura 4. Estructura monomérica y enlaces que conforman los polímeros de quitina y quitosano. Formación de quitosano mediante desacetilación básica del grupo amida de la quitina

Ha sido comprobado por muchas investigaciones que el quitosano y sus derivados a diferencia de otros inductores, tienen la doble propiedad de inhibir el crecimiento de hongos, bacterias y oomycetes. Así como la de activar *in vivo* diversos mecanismos vinculados con la resistencia sistémica adquirida lo que ha generado diversas investigaciones científicas y tecnológicas en muchos países, para promover su aplicación con fines diversos en la industria agrícola (Rinaudo, 2006; Bautista-Baños et al., 2006).

## Inducción de Respuestas de Defensa por la Aplicación de Oligosacáridos de Quitosano

Desde hace tiempo se ha comprobado que el quitosano induce reacciones de defensa en algunas plantas, sensibilizándolas para responder más rápidamente al ataque de patógenos (Pearce y Ride, 1982). La presencia de quitina y/o quitosano, así como también muchos de sus derivados, activa mecanismos de defensa antes mencionados. Entre las sustancias cuya inducción se ve favorecida por estos compuestos se incluyen: las fitoalexinas (pisantina, risitina, orchinol, genistein, etc.), proteínas PR, inhibidores proteicos, producción de ligninas y callosa (Ben-Shalom et al., 2003; Barka et al., 2004; Vander et al., 1998)

Diversos estudios nos muestran que el quitosano actúa como un potente elicitador de señales en enfermedades de plantas como la inducción de lignificación en trigo (Barber et al., 1989). Además de la activación de enzimas como la Fenilalanina amonio-liasa, glucanasas, quitinasas, quitosanasas en arroz contra el ataque de *Pyricularia grisea* Sacc. (Rodríguez et al., 2006).

Un factor importante a considerar en el uso de quitosano como un inductor de defensa es, además de su peso molecular, es su grado de

acetilación. Los quitosanos completamente acetilados inducen muy poca o nula respuesta defensiva en los sistemas donde han sido ensayados; los quitosanos parcialmente acetilados dependen del sistema estudiado, por lo que se ha llegado a pensar en mecanismos de inducción diferentes (Lárez, 2008). De estos estudios se deduce que la actividad inductora del quitosano reside en las regiones desacetiladas y en su grado de polimerización (Bautista-Baños et al., 2006). La actividad inductora del quitosano altamente desacetilado y la no actividad de los oligosacáridos completamente acetilados ha sido explicada por un mecanismo independiente de receptores específicos (Kauss et al., 1989). Dichos mecanismos se considera que pueden ocurrir mediante una interacción entre las cargas positivas del polication con fosfolípidos negativamente cargados de la membrana plasmática en las plantas, afectándose la integridad de esta última (Sandford, 1989; Rodríguez-Pedroso et al., 2009; Bautista-Baños et al., 2006).

La elevación de disversas actividades enzimáticas en plantas es dependiente de la longitud de la cadena de los oligosacáridos y el tiempo del tratamiento aplicado. El pentámero de quitosano causó las máximas actividades enzimáticas de PAL y de tirosina amonio-liasas (TAL) a las 36 horas después de aplicado el tratamiento en hojas de soya (Khan et al., 2003). En uvas de mesa tratadas con quitosano al 1.0% se observó un aumento significativo de la actividad enzimática de PAL y una disminución de la incidencia de *B. cinérea* (Romanazzi et al., 2002). La aplicación de quitosano a concentración de  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en precosecha indujo la actividad de PAL en frutos de uva y disminuyó la infección por patógenos (Meng et al., 2008). Las hojas de plantas de tabaco tratadas con diferentes dosis de quitosano (por inmersión de semillas y aspersión foliar) presentaron diferencias de acuerdo a la concentración empleada. Por ejemplo en la inmersión de semillas a las dosis más bajas ( $0.1$  y  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) incrementaron la actividad enzimática de PAL mientras que en la aspersión foliar las dosis más altas ( $0.5$  y  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) estuvieron asociadas con una mayor actividad (Falcón-Rodríguez et al., 2007). En estudios realizados

contra la roya en hojas de cacahuate (*Arachis hypogaea*), tratadas con solución acuosa de 1000 ppm de quitosano, se observó un aumento en los niveles de ácido salicílico y mayor actividad de quitinasa y  $\beta$ -1-3 glucanasa (Sathiyabama y Balasubramanian, 1998).

## HIPÓTESIS

La inducción de genes de defensa contra fitopatógenos en plantas de trigo (*T. aestivum*), cv. 'Tacupeto' es mayor con la aplicación de los oligosacáridos de quitosano que con el quitosano sin hidrolizar.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar la expresión de genes de defensa contra fitopatógenos por efecto de la aplicación de quitosano y una mezcla de oligosacáridos derivados de quitosano en plantas de trigo (*T. aestivum*) cv 'Tacupeto'.

### Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar físico-químicamente el quitosano.
- ✓ Obtener una mezcla de oligosacáridos por hidrólisis enzimática de quitosano y su caracterización físico-química.
- ✓ Establecer condiciones de desarrollo de plántulas de trigo para la aplicación de quitosano y oligosacáridos derivados de quitosano.
- ✓ Evaluar la expresión de genes de defensa (*PAL*,  $\beta$ -1-3 *GLU* y *QUIT*) en hojas de plántulas de trigo aplicadas por aspersión foliar y aplicación al sustrato con los compuestos de quitosano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Las semillas de trigo “Tacupeto” (PIEAES, 2010 y INIFAP, 2010) fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Ciudad Obregón, Sonora y fueron trasladadas al laboratorio de Fisiología Vegetal-Molecular en CIAD. Estas sembraron en macetas dentro de una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de fotoperiodo 16 horas luz/8 oscuridad y a temperatura constante de 25°C, como se muestra en la siguiente imagen. Los tratamientos se aplicaron a las plantas cuando estas tenían 25 DDS (Días después de sembrado) y se colectaron las hojas a diferentes horas (0, 6 y 12) en el caso de la aplicación con el polímero y a las 0, 3, 6 y 12 horas en otro ensayo posterior con la aplicación de la mezcla de oligosacáridos de quitosano, posteriormente se congelaron las muestras a -80°C para la evaluación de la expresión de los genes de defensa.



Figura 5. Material vegetal utilizado.

## Polímeros de Quitosano y Disoluciones de los Compuestos

El quitosano utilizado fue de SIGMA-ALDRICH. El polímero se disolvió en ácido acético al 1% y se ajustó el pH a 5.5 con hidróxido de potasio (KOH) 2N y completándose con H<sub>2</sub>O destilada hasta 1L. Posteriormente se caracterizó el compuesto en cuanto a su masa molar (MM) por viscosimetría capilar y el grado de acetilación (GA) por espectrometría de infrarrojo siguiendo la metodología propuesta por Brugnerotto et al., (2001). El peso molecular fue calculado mediante las siguientes ecuaciones empíricas:

$$\begin{aligned}\eta_{sp}/c &= [\eta] + k_1[\eta]^2c && \text{Ecuación de Huggins} \\ \ln \eta_{rel}/c &= [\eta] + k_2[\eta]^2c && \text{Ecuación de Kraemer} \\ &(\eta_{sp}-\ln \eta_{rel}) && \text{(Punto único)}\end{aligned}$$

Donde:

$$\begin{aligned}[\eta] &= KM^\alpha && \text{Ecuación de Mark-Houwink-Sakurada} \\ \eta_{rel} &= t/t_0 && \text{(viscosidad relativa)} \\ \eta_{sp} &= (t - t_0)/t_0 && \text{(viscosidad específica)}\end{aligned}$$

Y el grado de acetilación mediante la siguiente fórmula:

$$GA (\%) = 31.92 * A^{1320} / (A^{1420}) - 12.2 \text{ (establecida por Brugnerotto et al., 2001)}$$

\*A = Absorbancias

## Mezcla de Oligosacáridos de Quitosano (OLG)

La mezcla de OLG se obtuvo por hidrólisis enzimática con la proteasa papaína (SIGMA). Las condiciones para la hidrólisis fueron 24 horas a temperatura de 37°C y pH 5, a partir de una solución de quitosano al 1% en buffer de acetato establecido por Cabrera y Van-Cutsem (2005). Transcurrido el tiempo de hidrólisis, se detuvo la reacción con la esterilización en autoclave de las soluciones seguido de una precipitación de los oligosacáridos a pH 7.5 con KOH y lavados con metanol al 90% (v/v). Una vez obtenida la mezcla de

oligosacáridos de quitosano estos se caracterizaron por espectrometría en masa tiempo-de-vuelo-desorción/ionización láser asistida por una matriz MALDI-TOF-MS (Bahrke et al., 2002) para ver el grado de polimerización (GP) de los oligómeros de quitosano y sus posibles acetilaciones. También se realizaron mediciones de viscosidad para determinar la reducción con el paso del tiempo de hidrólisis y un análisis de azúcares reductores utilizando glucosamina como estándar (Nelson, 1944).

### Ensayo Biológico de Aplicación de Quitosanos en Plantas de Trigo

Se realizaron 2 ensayos (Figura 6) para evaluar el efecto de los tratamientos del polímero y la mezcla de oligosacáridos de quitosano en la inducción del sistema de defensa de la planta de trigo. Las aplicaciones se llevaron a cabo por aspersión foliar y aplicación al sustrato, cuando las plántulas tenían 25 DDS y se evaluaron 2 concentraciones (0.1 y 1 g.L<sup>-1</sup>) en cada caso y una aplicación de H<sub>2</sub>O destilada como testigo. Se colectaron hojas de trigo a las 0, 6 y 12 horas después de la aplicación con el polímero y a las 0, 3, 6 y 12 horas con la aplicación de los oligosacáridos, posteriormente se realizaron los análisis de la expresión de genes. El experimento se realizó por triplicado.



Figura 6. Ensayos para la aplicación de los tratamientos.

## Estudio Molecular

### **Extracción de ARN Total**

Para la extracción de ARN total se utilizaron 100mg de hojas de trigo tratadas con el quitosano y la mezcla de OLG, que inmediatamente de cortarse se molieron con N<sub>2</sub> líquido. Se utilizó el juego de reactivos comerciales Concert Plant Reagent® para la extracción del ARN total, siguiendo las especificaciones del proveedor. Posteriormente se determinó la concentración final en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000) y se observó la integridad del ARN total mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS 1X) con intensidad de corriente de 50 watts por 90 minutos. Se utilizó el marcador RNA Ladder (Invitrogen, USA) para observar los tamaños del ARN obtenido. Posteriormente, se trató el ARN con la enzima DNase I (Ambion) para eliminar el ADN genómico y realizar la síntesis del ADNc.

### **Diseño de Oligonucleótidos Específicos**

Se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de secuencias nucleotídicas del genoma del trigo depositadas en la base de datos del GenBank, y se utilizaron para amplificar los genes que codifican para las enzimas Fenilalanina amonio-liasa (PAL), Peroxidasa (POD), Quitinasa (QUIT) y  $\beta$ -1-3 Glucanasa (GLU). En la Tabla 2 se observa la secuencia e información de los iniciadores diseñados (Li y Zhang, 2003; Sareini y Thornburg, 2002; Hall et al., 2000; Kawakami y Yoshida, 2002; Higa-Nishiyama et al., 2006).

Tabla 2. Diseño de iniciadores utilizados para la expresión de los genes de defensa. Las secuencias estas identificadas como Fw y Rv, donde Fw indica el iniciador sentido y Rv, el antisentido.

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Tamaño	No. acceso
GAPDHTa	Fw: ATTTGGTCTCCACTGACTTTGTCTG Rv: CAACTAACATGAACCAGGCGTCTG	270 pb	AY290728.1
PALTa	Fw: CCAATGTTCTGTCCGTCCTTGCT Rv: AACTGCGCGAACATCAGCTTGC	454 pb	AY005474.1
GLUTa	Fw: ATCGACCTCATCATGGACGTGG Rv: GTCGAAGAGGTTTGTGTAGGTGAG	449 pb	AB244640.2* AB244638.2* AB244641.1* AB244639.2* AB244642.1* AB244637.1*
CHITa	Fw: GTTCTACACGTACGACGCCTTCAT Rv: CCCGCCGTTGATGATATTGGTGAT	421 pb	AB029934.1* AB029935.1* AB029936.1*

(\*) El diseño de los iniciadores se basó en regiones conservadas entre las secuencias analizadas. La alineación de las secuencias se realizó con el algoritmo CLUSTAL W ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) y se puede observar en la sección de anexos al final de este documento.

### Síntesis de ADN Complementario (ADNc)

Una vez obtenido el ARN total y haber eliminado el ADN genómico, se continuó con la síntesis de ADNc mediante el juego de reactivos comerciales SuperScript® First-Strand (Invitrogen, USA). Con estos reactivos se sintetizó el ADN complementario de cadena sencilla y por medio de la enzima transcriptasa reversa. Las diferentes incubaciones de las muestras fueron las siguientes: a 65°C por 5 minutos para romper la estructura secundaria del ARN, 42°C/50min para la transcriptasa reversa, 70°C/15min para detener la reacción de la transcriptasa y 37°C/20min para digerir el ARN del híbrido de ARN-ADN. Por último, ya obtenido los ADNc, se guardó a -20°C para ser usadas

inmediatamente en la amplificación y expresión de los genes de defensa en las reacciones de PCR.

### **Amplificación de Genes *PAL*, *QUIT*, $\beta$ -1-3 *GLU* y *GAPDH***

Se amplificaron los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores específicos para cada gen. Las condiciones de amplificación son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C/3min y 28 ciclos de: 95°C/1min, seguida de 60°C/40seg; 72°C/1:30min. Por último, una extensión de 10 min a 72°C y terminar a 4°C. Todo esto se realizó en un termociclador PTC-200 DNA Engine Cycler (BIO-RAD, USA).

Terminada la reacción en el termociclador, se observaron los productos amplificados en geles de agarosa al 1% con una solución amortiguadora Tris/Borato/EDTA (TBE 0.5X) y se utilizó como marcador de peso molecular el 100bp DNA Ladder (Invitrogen, USA). El análisis de la expresión de genes se llevó a cabo de forma semicuantitativa mediante densitometría, utilizando el Software Lab Kodak-Image 100.

### **Análisis Estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) completamente al azar para comparar entre tratamientos a cada hora de muestreo. Para encontrar diferencias entre tratamientos, las medias resultantes se compararon con la prueba de Tukey a un nivel de probabilidad ( $p < 0.05$ ), utilizando el programa NCSS 2007 (Statistical Analysis and Graphics).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Caracterización Físico-Química del Quitosano

### **Acetilación y Peso Molecular del Polímero**

Un grupo importante de autores ha informado la importancia de la MM y el GA de los quitosacáridos en la inducción de respuestas defensivas y protección de las plantas contra sus patógenos (Vander et al., 1998; Falcón-Rodríguez et al., 2011). El grado de acetilación del quitosano utilizado en este estudio fue de 15.5%. En la Figura 7 se muestra la caracterización del quitosano por espectroscopia de infrarrojo. Se observan diferentes picos en diferentes longitudes de onda, cada pico representa la presencia de enlaces de la molécula. Para este estudio los picos característicos tomados en cuenta para determinar las acetilaciones del compuesto son los marcados a longitudes de onda leídas a 1420 y 1320  $\text{cm}^{-1}$  (Brugnerotto et al., 2001).

El GA obtenido en este estudio nos indica la capacidad inductora que tiene el quitosano comparándolo con estudios por otros autores. En plantas de melón a las que se les aplicó un quitosano con un GA mayor a 10% estimuló la actividad de quitinasa (Roby et al., 1987). En un estudio diferente se aplicó quitosano con un GA del 20% en hojas de trigo, se observó un incremento en la actividad de PAL, elicitando su máxima actividad comparada con grados de acetilación de 10, 35 y 60% (Vander et al., 1998). Se ha establecido que la quitina con más de un 50% de desacetilación debe ser considerada como quitosano e incluso algunos investigadores la definen como tal con un grado de desacetilación superior al 60%. Usualmente en el caso del quitosano el grado de desacetilación óptimo para inducir respuestas en la planta se encuentra comprendido entre 60-98% (Harish Prashanth y Tharanathan, 2007; Pillai et al., 2009). Sin embargo, también se ha reportado que para lograr una actividad

biológica como el de elicitar respuestas de defensa en la planta, el contenido de los acetilos debe encontrarse alrededor de 40% (Muzzarelli, 1977).

Además de la acetilación del quitosano, se determinó la masa molar del mismo, mediante las fórmulas de Huggins-Kraemer y Mark-Houwink-Sakurada para las viscosidades específicas y relativas obtenidas con los tiempos (t) en el viscosímetro, incluyendo también los valores de  $K = 0.076$  y  $\alpha = 0.76$  establecidos para estas condiciones ya descritas en Materiales y métodos. La masa molecular promedio del quitosano utilizado en este trabajo fue de 50.8 kDa, el cual es considerado de bajo peso molecular, según datos de Hernández-Ochoa et al., (2011) quienes establecieron que el quitosano de bajo peso molecular es aquel que pesa 190 kDa o menos. De medio peso molecular aquel de 190 a 300 kDa y de alto peso molecular aquellos por arriba de los 300 kDa, aunque esto puede ser relativo dependiendo del autor. El peso molecular y tamaño del quitosano afecta en la actividad inductora, algunos autores indican que existe una unión del quitosano a receptores en la membrana plasmática y esto es indispensable para la inducción de las respuestas defensivas. Sin embargo, la relación al tamaño del quitosano y la capacidad inductora de este necesita ser más investigado (Day et al., 2001; Felix et al., 1998; Lin et al., 2005).

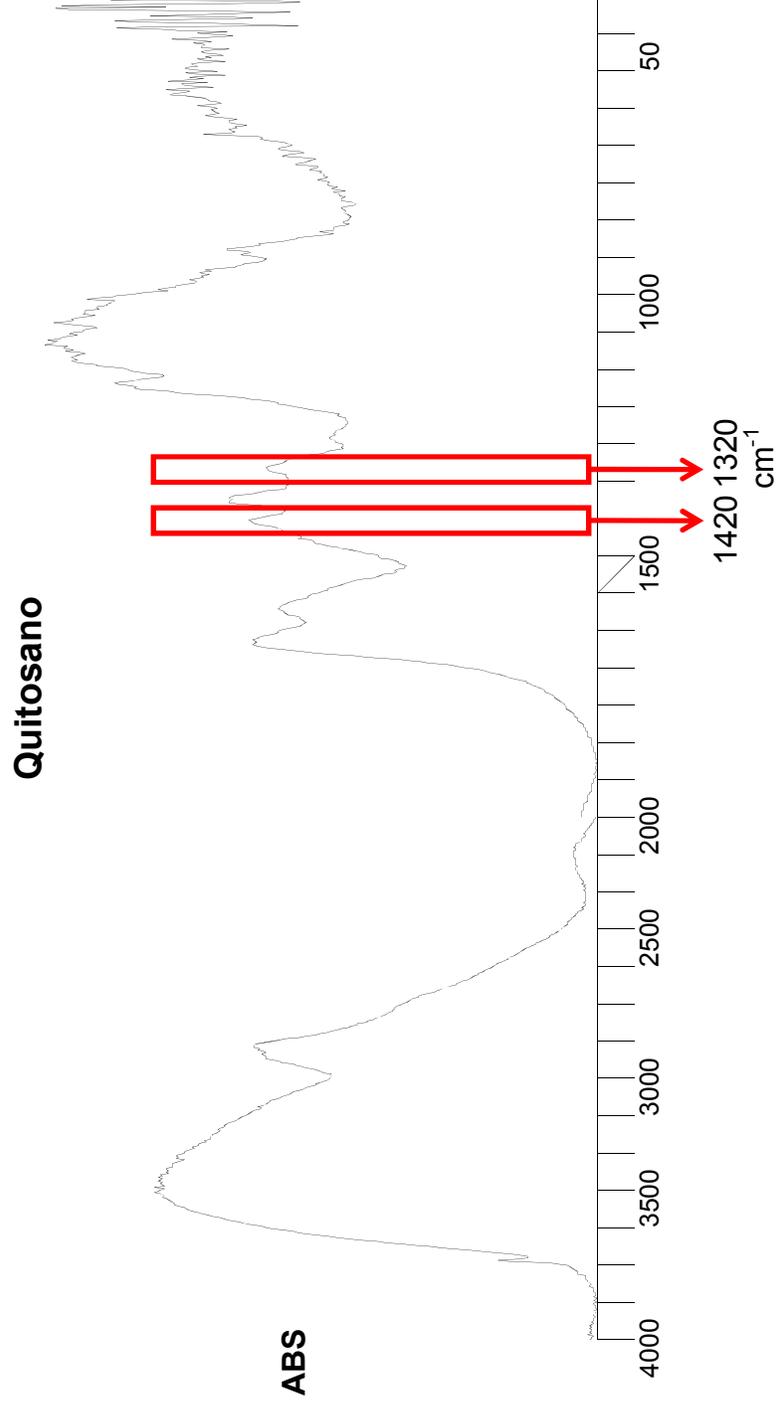


Figura 7. Espectro infrarrojo del polímero de quitosano utilizado en este estudio. Las Absorbancias leídas para determinar la acetilación del compuesto son en los picos característicos localizados a 1420 y 1320  $\text{cm}^{-1}$ .

## Hidrólisis de Quitosano

Diversas investigaciones han encontrado que el quitosano puede ser susceptible a las actividades específicas de varias enzimas hidrolíticas como celulasas, hemicelulasas, amilasas, dextranasas, pectinasas, lipasas y proteasas. Como pepsinas, papaínas, bromelinas, ficinas y pancreáticas (Muraki et al., 1993; Muzzarelli et al., 1994; Yalpani y Pantaleone, 1994; Terbojevich et al., 1996). Dentro de este último grupo, la papaína ha sido una de las enzimas con mejores efectos para hidrolizar quitosano (Hong et al., 2002).

En la Figura 8 se presenta la reducción de la viscosidad del polímero durante el tiempo de hidrólisis con papaína a 37°C, en donde el mayor porcentaje de reducción se observó en las primeras 6 horas, presentando una reducción del 74.6% en la viscosidad, y un incremento en los azúcares reductores hasta las 24 horas (Figura 9), lo que justifica la hidrólisis en este tiempo. Resultados similares al nuestro presentó Falcón et al., (2008) utilizando una enzima pectinasa no específica para hidrolizar quitosano, observó que la máxima reducción de viscosidad fue dentro de las 2 primeras horas de hidrólisis, siendo de un 60%, para las 6 horas esta reducción aumentó al 75%, además, el mayor incremento en los azúcares reductores observado se dio dentro de las primeras 10 horas de hidrólisis lo que coincide con este trabajo en que las máximas reducciones de viscosidad y aumento en los azúcares reductores se vieron en las primeras horas de la hidrólisis.

Existen otras hidrólisis con papaína por otros autores, como en los trabajos realizados por Terbojevich et al. (1996) donde utilizaron la enzima papaína para la hidrólisis de quitosano, observaron que la máxima reducción de la viscosidad del polímero fue de un 66% a 48 horas de hidrólisis, a pesar que la papaína ha sido una de las enzimas con mejores efectos en hidrolizar quitosano (Hong et al., 2002). la diferencia con estos resultados puede deberse

al efecto de la temperatura, la cual fue de 25°C en esa investigación, no siendo la óptima para la actividad quitosanólítica de la papaína según estudios reportados por Vishu-Kumar et al., (2004), donde compararon la capacidad hidrolítica de la papaína con el quitosano en varias temperaturas y obtuvieron una mayor hidrólisis a los 37°C, es por ello las diferencias entre los resultados en el presente trabajo con otros estudios.

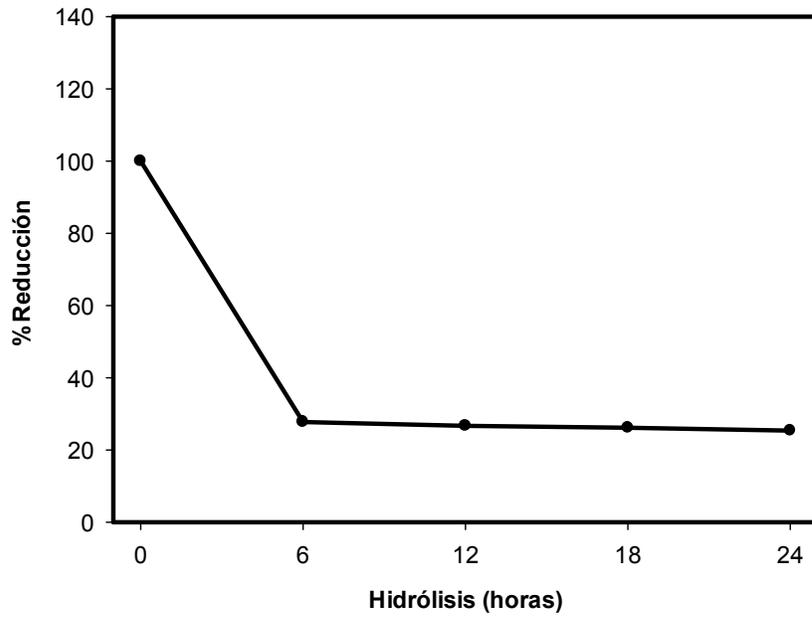


Figura 8. Reducción de viscosidad de la hidrólisis de quitosano a través del tiempo.

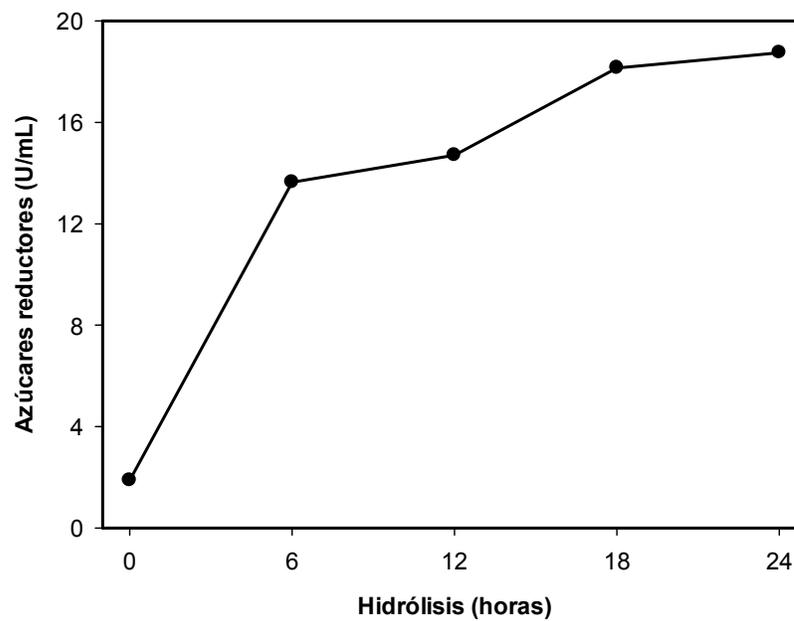


Figura 9. Incremento de azúcares reductores de la hidrólisis de quitosano a través del tiempo.

En la Figura 10 se presenta el cromatograma del hidrolizado donde se observan los picos que caracterizan a la mezcla obtenida, que en base a la relación masa/carga ( $m/z$ ), se puede determinar la composición iónica de la molécula (Tabla 3), esto con el fin de saber el grado de polimerización que se tiene en la mezcla y sus posibles acetilaciones en algunos fragmentos del hidrolizado, además, se muestra la intensidad o frecuencia con la que estos se encuentran del total del hidrolizado. Se observa en la composición iónica de la mezcla hidrolizada fragmentos muy acetilados, por lo que se podría hablar del tipo de hidrólisis realizado por la papaína, la cual afecta los enlaces entre GlcNAc y GlcNH<sub>2</sub> obteniendo fragmentos con acetilaciones continuas (Terbojevich et al., 1996).

El grado de polimerización de los oligosacáridos de quitosano (OLG) es importante ya que afecta la actividad biológica de estos en las plantas. Algunos autores reportan que la actividad biológica de los oligosacáridos de quitosano depende de su estructura y del tamaño de los oligómeros, estableciendo que entre más grande sean los oligómeros estos son más potentes, además, muchos estudios no consideran solubles los oligosacáridos con un GP por arriba de 6 (Shibuya y Minami, 2001; Hahn, 1996; Cabrera et al., 2006).

Se ha reportado que para ser considerados oligosacáridos, estos fragmentos deben de estar en un rango de GP de entre 3 y 10 para que sean una señal inductora de respuestas de defensa en la planta (Yafei et al., 2009). Trabajos previos en arroz y soya elicitaban estas respuestas defensivas con la aplicación de OLG con un GP de 6-8, los resultados anteriores unidos a otros informados sugieren que dependiendo del tejido, el mismo GP requerido causará una actividad biológica diferente (Khan et al., 2003; Yamada et al., 1993; Enríquez-Guevara et al., 2010; Falcón-Rodríguez et al., 2009; Falcón-Rodríguez et al., 2011).

Tabla 3. Composición iónica asignada de los oligosacáridos de quitosano por el espectro de MALDI-TOF-MS, preparados por hidrólisis enzimática durante 24 horas y aislados por precipitación selectiva en metanol al 90%.

<i>m/z</i>	Tipo	Composición iónica
580.6	[ M + K ] <sup>+</sup>	(GlcN) <sub>2</sub> – (GlcNAc)
607.03	[ M + Na ] <sup>+</sup>	(GlcN) – (GlcNAc) <sub>2</sub>
663.56 665.56	[ M + K ] <sup>+</sup>	(GlcNAc) <sub>3</sub>
783.08 785.07	[ M + K ] <sup>+</sup>	(GlcN) <sub>2</sub> – (GlcNAc) <sub>2</sub>

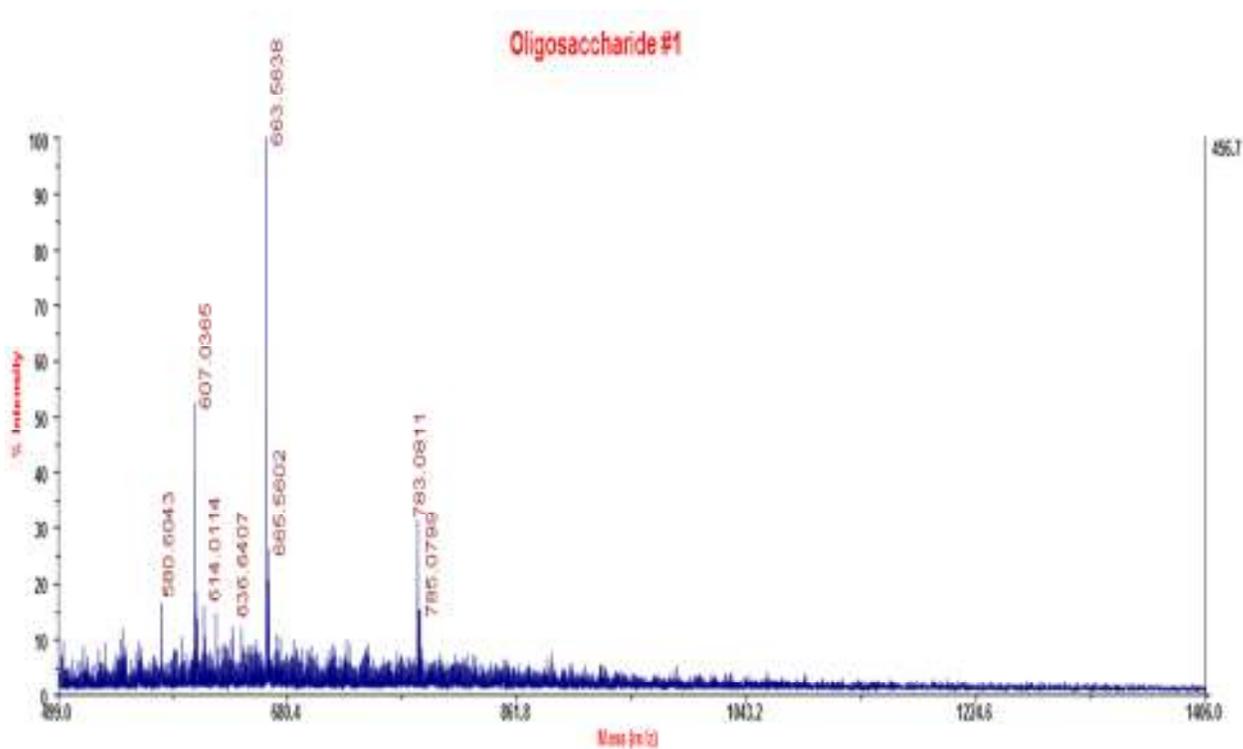


Figura 10. MALDI-TOF-MS de la fracción insoluble en metanol al 90% de los oligosacáridos obtenidos a través de una hidrólisis enzimática de quitosano por 24 horas. Los picos identificados están etiquetados como relación masa/carga (*m/z*).

## Evaluación de la Expresión de Genes Relacionados a la Defensa en Trigo (*Triticum aestivum* L.) por la Aplicación Foliar y Adición al Sustrato de Quitosano y los Oligosacáridos de Quitosano.

### **Expresión de Fenilalanina amonio-liasa (*PAL*)**

En la Figura 11 se presenta la expresión relativa de *PAL* en las hojas de trigo a las diferentes horas de muestreo, antes de la aplicación (hora 0) y a las 6 y 12 horas después de la aplicación. Se observa un efecto de la aplicación foliar de quitosano sobre los niveles de expresión del transcrito de *PAL* a las 6 horas de aplicado el tratamiento con respecto al control, en donde se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para la concentración de  $0.1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . El transcrito de *PAL* se acumuló 4.5 veces respecto al control (Figura 11A), seguido de una disminución a sus niveles iniciales a las 12 horas después del tratamiento. También, se observó un efecto ( $p < 0.05$ ) en la expresión de *PAL* en las hojas de trigo a las 6 h después de la aplicación de quitosano al sustrato (Figura 11B) a la concentración más elevada en este estudio ( $1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Los niveles de *PAL* incrementaron 6.5 veces el transcrito respecto al control. Pasado este tiempo los niveles de la expresión de *PAL* volvieron a sus niveles iniciales al igual que lo ocurrido por efecto de la aplicación foliar. Estos resultados demuestran una acción elicitora del polímero de quitosano independientemente de la forma de aplicación y de la percepción del compuesto en la planta.

*PAL* es crucial para la apertura de varias rutas metabólicas en los fenilpropanoides, para la síntesis de metabolitos secundarios tales como fitoalexinas, ácido clorogénico y la producción de estructuras fenólicas como las ligninas, para reforzar la pared celular de las plantas. Por otro lado, también está implicada en la síntesis (a través del ácido benzoico) del ácido salicílico, que ha sido considerado una señal importante en la amplificación de la respuesta sistémica defensiva en plantas (Dixon et al., 2002; Ribnicky et al.,

1998). Las funciones de compuestos como los fenilpropanoides en la defensa de plantas incluyen la formación de barreras físicas o químicas contra la infección por patógenos, la activación de moléculas involucradas en la señalización local y sistémica además de inducir la expresión de genes de defensa (Dixon et al., 2002).

Las plantas tratadas de manera foliar con la concentración de  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , no presentaron efectos de aumento en la expresión del gen de *PAL*. Esto puede deberse a que exista un tipo de saturación o alguna regulación dependiente de la concentración de los compuestos aplicados, y que dosis elevadas eviten la detección eficaz del compuesto elicitor, contrario a la aplicación al sustrato donde la rizósfera y las condiciones del suelo pueden afectar la concentración y detección de las moléculas elicitoras por las células de las raíces. Estos resultados coinciden con estudios realizados por Vander, et al., (1998) en donde aplicaciones de quitosano a diferentes concentraciones con GA de 10, 20 y 60% en hojas de trigo, observaron que la máxima actividad de la enzima *PAL* se vio afectada con la concentración de  $0.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  del quitosano con GA 20%, resultado parecido al del presente estudio.

Cuando a las plantas se les aplicó la mezcla de oligosacáridos de quitosano de manera foliar y adición al sustrato (Figura 12) se realizaron muestreos a las 0, 3, 6 y 12 horas después de la aplicación con los tratamientos. Se esperaba una inducción en la expresión de *PAL* más rápida en este tiempo, ya que la expresión de un gen se puede presentar rápidamente antes de las 6 horas, como en el caso del estudio de Yafei et al., (2009) donde observaron una inducción en el transcrito de *PAL* en la primer hora después de aplicado el tratamiento. Los niveles de expresión de *PAL* se mantuvieron constantes en hojas de trigo después que se aplicó los OLG, distinto a los vistos por efecto del polímero. En el caso de la aplicación foliar (Figura 12A) ningún tratamiento fue efectivo ( $p>0.05$ ) en la inducción de *PAL* a ninguna hora de los muestreos, sin embargo, se observa que al aumentar la concentración de los

OLG se ve una tendencia a disminuir el transcrito. Esto puede indicar que para la aplicación de una mezcla de OLG, donde los compuestos son más pequeños que el polímero, se necesitan dosis aún más pequeñas, por la fácil entrada que tienen a través de la pared celular hasta llegar a la membrana.

Otro motivo que podría afectar el efecto inductor de la mezcla de OLG es el grado de polimerización de los oligosacáridos. Los resultados de este estudio concuerdan con trabajos previos recordando que la mezcla obtenida en la presente investigación fue de un GP de 3-4; sin embargo, se ha reportado que el quitosano puede inducir respuestas biológicas, como son la producción y acumulación de fitoalexinas cuando el GP es mayor a 4 (Lin et al., 2005). Yamada et al. (1993), mostraron que una mezcla de oligosacáridos de quitosano de GP de 6-8 a concentraciones nanomolares puede inducir la expresión de antitoxina, una fitoalexina en arroz. Sin embargo, cuando aplicaron otra mezcla de OLG con GP de 2-3 no detectaron efecto de los tratamientos en la producción de estos compuestos antimicrobianos. Por lo tanto, no hubo una inducción de la expresión de *PAL* que es la precursora de la síntesis de éstos compuestos; reportes similares han sido reportados para estudios con células de soya (Day et al., 2001). Además, el contenido del hidrolizado puede afectar en la activación de la defensa por las acetilaciones encontradas en los fragmentos caracterizados como lo visto en trabajos de Khan et al., (2003) donde se aplicaron oligoquitinas con GP de 4-6 y los mayores niveles en la actividad de PAL en hojas de soya corresponden a oligoquitinas con un GP de 6.

Se ha sugerido que los OLG con GP de 6-8 son más efectivos para la unión con sus receptores en la membrana plasmática, y se han reportado receptores de OLG's en plantas como la soya y el tomate (Day et al., 2001; Felix et al., 1998). Estos autores establecen que la unión de los OLG a los receptores de la membrana plasmática es indispensable para inducir las respuestas de defensa de la planta. Sin embargo, la relación entre el tamaño de

la molécula y el efecto elicitor necesita ser más investigado, para extender las pruebas en las respuestas biológicas usadas en el presente trabajo.

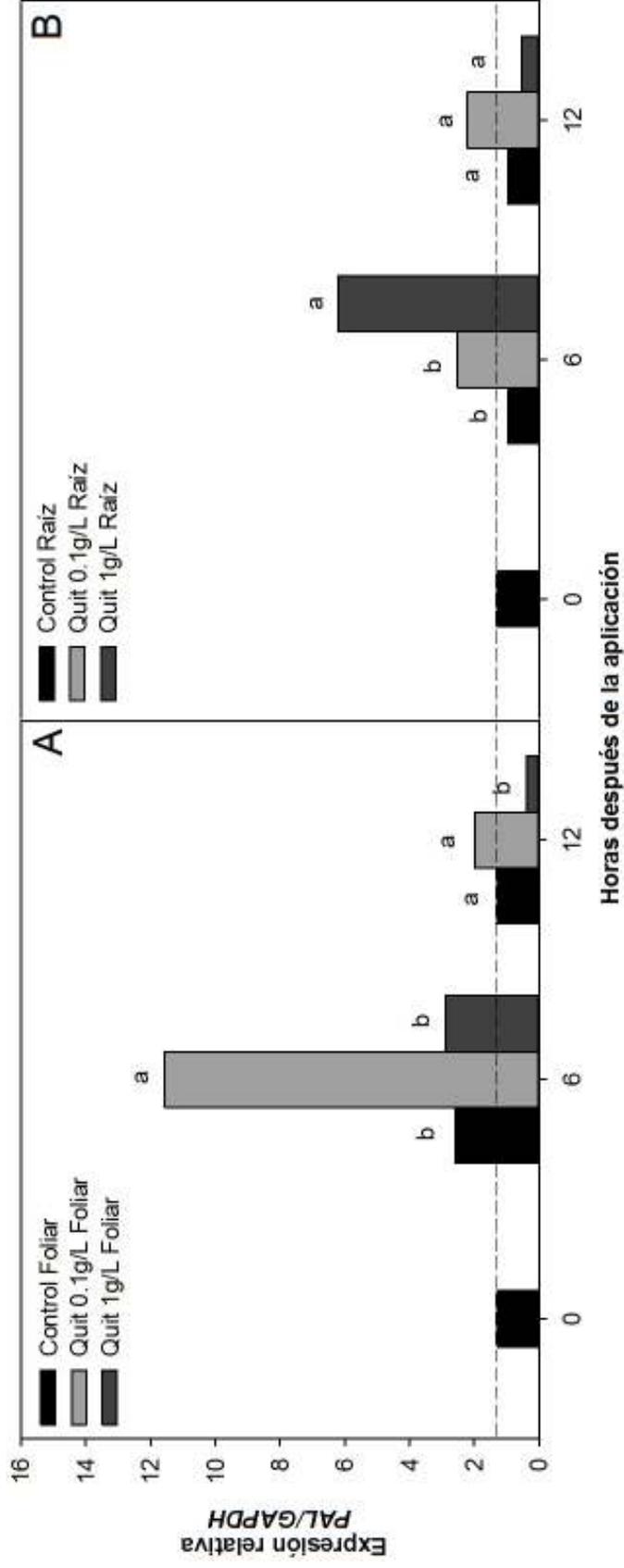


Figura 11. Expresión relativa del gen de PAL en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con quitosano a diferentes concentraciones. Los tratamientos fueron aplicados por aspersión foliar (A) y adición al sustrato (B). Los datos son las medias  $\pm$  EE de las muestras por triplicado. Barras con literales diferentes entre tratamientos por hora indican diferencias significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

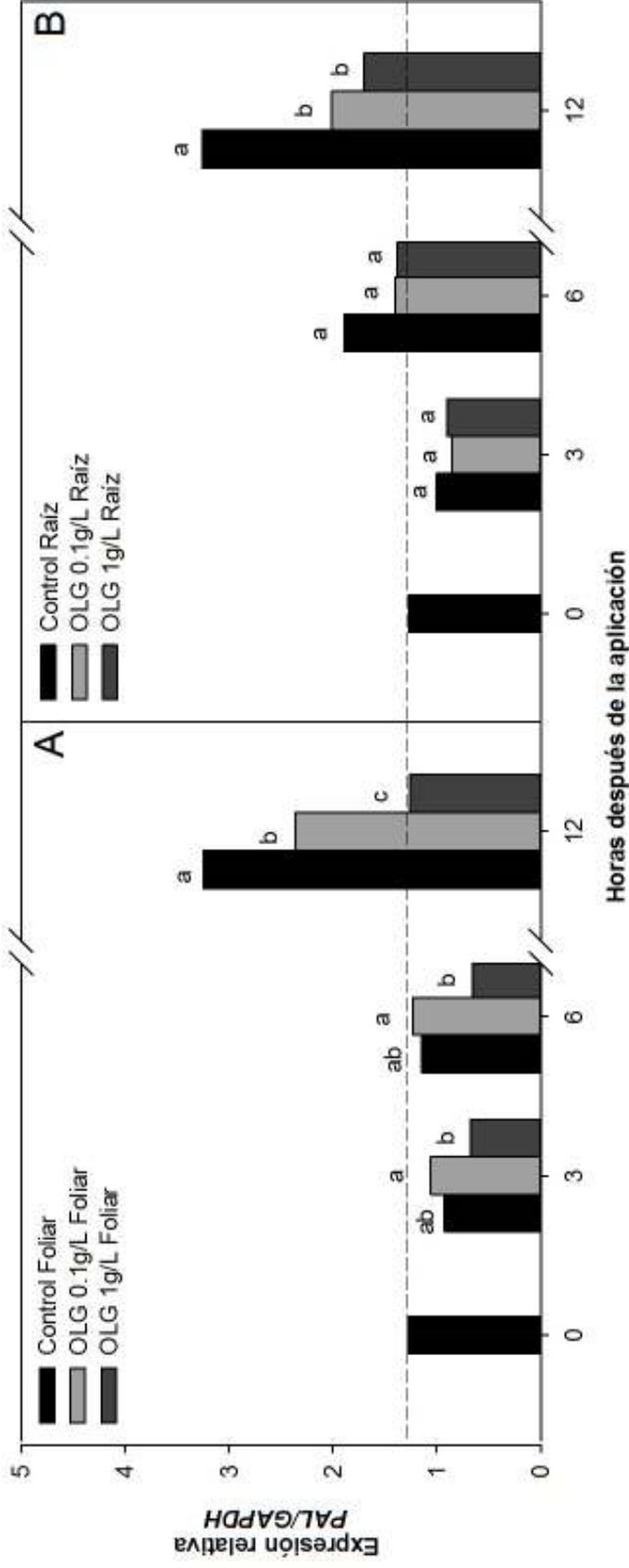


Figura 12. Expresión relativa del gen de PAL en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con oligosacáridos de quitosano a diferentes concentraciones. Los tratamientos fueron aplicados por aspersión foliar (A) y adición al sustrato (B). Los datos son las medias  $\pm$  EE de las muestras por triplicado. Barras con literales diferentes entre tratamientos por hora indican diferencias significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## Expresión de $\beta$ -1-3 Glucanasa ( $\beta$ -1-3 *GLU*)

Las modificaciones metabólicas después del reconocimiento de moléculas inductoras y la transducción de señales, comprende la producción de una gran gama de péptidos y proteínas defensivas, la mayor parte de ellas conocidas como proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) (van Loon, 1999). Las proteínas PR son un tipo de familia de proteínas relacionadas con la patogénesis como quitinasas y glucanasas que se sintetizan tras la señal de un inductor en la respuesta sistémica de la planta, aunque también se puedan presentar en la respuesta local (van Loon et al., 2006).

Las  $\beta$ -1-3 glucanasas son consideradas proteínas PR, es un tipo de hidrolasa que se caracteriza por degradar el componente  $\beta$ -1-3 glucano en la pared celular de varios hongos que lo contienen (van Loon et al., 2006; Sels et al., 2008). En la Figura 13A, se presenta la expresión del gen de  $\beta$ -1-3 *GLU* después que se aplicó el tratamiento foliar, el cual no aumentó significativamente con ninguna concentración ( $p > 0.05$ ) en las horas muestreadas, a diferencia de lo que ocurrió con *PAL*, aunque se observa un ligero aumento a las seis horas después del tratamiento con respecto a los controles, que podría ser relevante a nivel celular. Similares resultados se observan en la Figura 13B, con la excepción de que hubo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) a las 12 horas en la aplicación al sustrato a una concentración de  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , incrementando la expresión del mensajero cinco veces con respecto al control.

La diferencia en las respuestas y el aumento en el transcrito a las 12 horas en la aplicación al sustrato, puede deberse a la interferencia del suelo, en el que los compuestos tardan más para llegar a ser detectados por la raíz, a diferencia de una aplicación directa a las hojas. Sin embargo la respuesta sistémica de la planta es evidente, ya que los compuestos fueron detectados por la raíz y la expresión de gen se analizó en las hojas. Asimismo, el tamaño

de la molécula afecta en su trayectoria a través de la cutícula y la pared celular hasta llegar a la membrana plasmática, donde se da el reconocimiento de las moléculas y la activación y transducción de señales (Buchholz, 2006; Bautista-Baños et al., 2006).

Los resultados de este trabajo concuerdan con los realizados por Lin et al., (2005) donde demostraron en su estudio con plantas de arroz al aplicar un quitosano con un peso molecular de 50 KDa que fue más efectivo en la inducción de genes de defensa como *GLU* y *CHI* que los quitosanos de alto peso molecular. Otros estudios realizados contra la roya (*Puccinia arachidis*) en hojas de cacahuate (*Arachis hypogaea*), tratadas con soluciones acuosas de 1000ppm de quitosano, observaron un aumento en los niveles de ácido salicílico y una mayor actividad de glucanasa que pueda estar relacionado al previo aumento en los niveles del transcrito del mismo gen (Sathiyabama y Balasubramanian, 1998).

Los resultados obtenidos en la expresión del gen de  $\beta$ -1-3 *GLU* en las plantas de trigo tratadas con la mezcla de oligosacáridos de quitosano se presentan en la Figura 14, donde se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control para la concentración más alta ( $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a las 6 horas después de la aplicación en ambas formas (foliar y adición al sustrato). Al contrario de lo observado por efecto del polímero, donde hasta las 12 horas se cuantificó incremento en la expresión, corroborando así lo discutido debido al tamaño de la molécula. Además, se observa que esta respuesta, que fue de manera temprana, se mantuvo para las 12 horas en las dos formas de aplicación. Otros resultados son consistentes al presente estudio cuando indujeron la mayor actividad de glucanasa en plantas de tabaco tratadas con oligómeros de quitosano en concentraciones de  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Falcón-Rodríguez et al., 2011).

Los oligosacáridos deben llegar a la membrana plasmática con mayor facilidad que el quitosano polimérico a la membrana debido a su menor masa molar y por tanto la inducción de los efectos biológicos puede requerir de una menor concentración. La resistencia inducida es un proceso activo y multicomponente que causa un importante gasto energético, dónde ocurre una intensa síntesis de novo de gran número de proteínas, enzimas y la activación de genes defensivos que no están presentes hasta que ocurre la estimulación o se encuentran en niveles basales. La relación entre el gasto de precursores de energía y la protección de la planta estaría dada por la regulación del aumento de determinadas respuestas defensivas a costa de la reducción de otras en las diferentes etapas de crecimiento. De esta forma, también se puede explicar el aumento significativo de *PAL* a las 6 horas y su reducción a las 12 horas, con el aumento de  $\beta$ -1-3 *GLU* en este último tiempo (Heil et al., 2000; van Loon et al., 2006; Walters y Boyle, 2005).

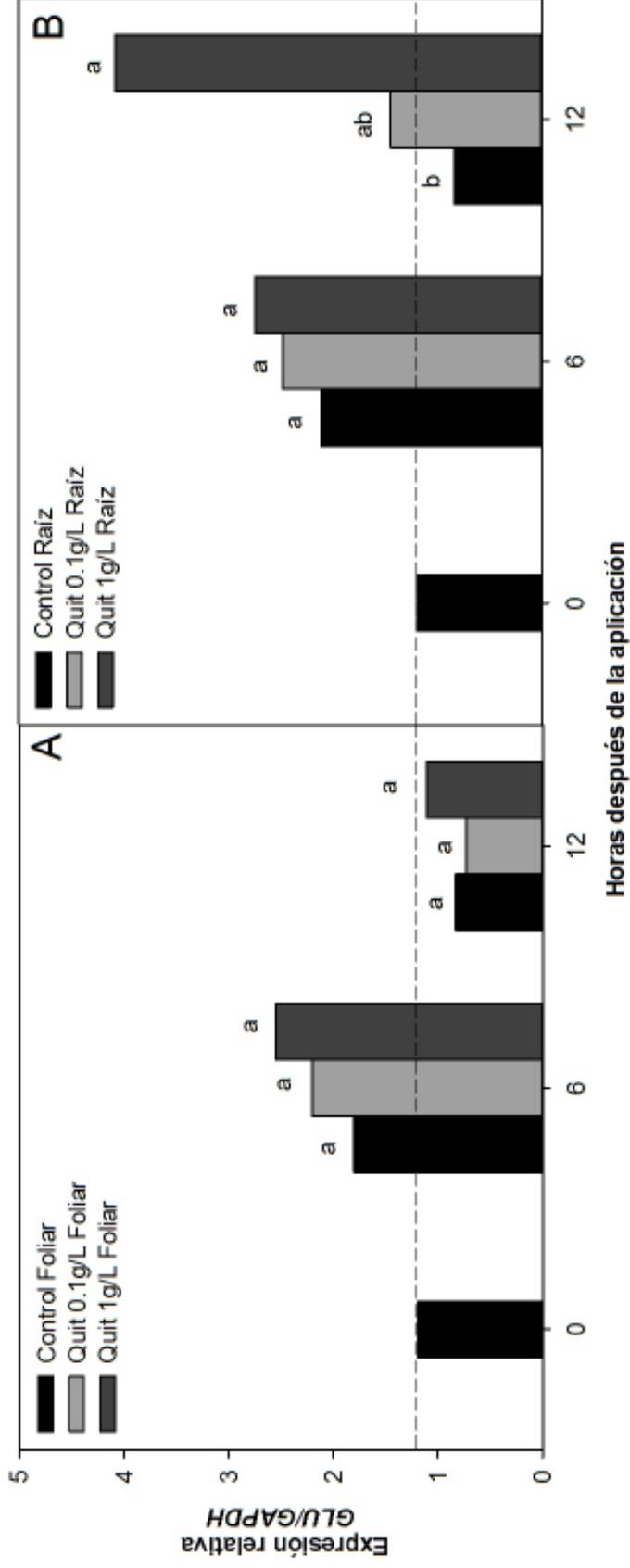


Figura 13. Expresión relativa del gen de  $\beta$ -1-3 GLU en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con quitosano a diferentes concentraciones. Los tratamientos fueron aplicados por aspersión foliar (A) y adición al sustrato (B). Los datos son las medias  $\pm$  EE de las muestras por triplicado. Barras con literales diferentes entre tratamientos por hora indican diferencias significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

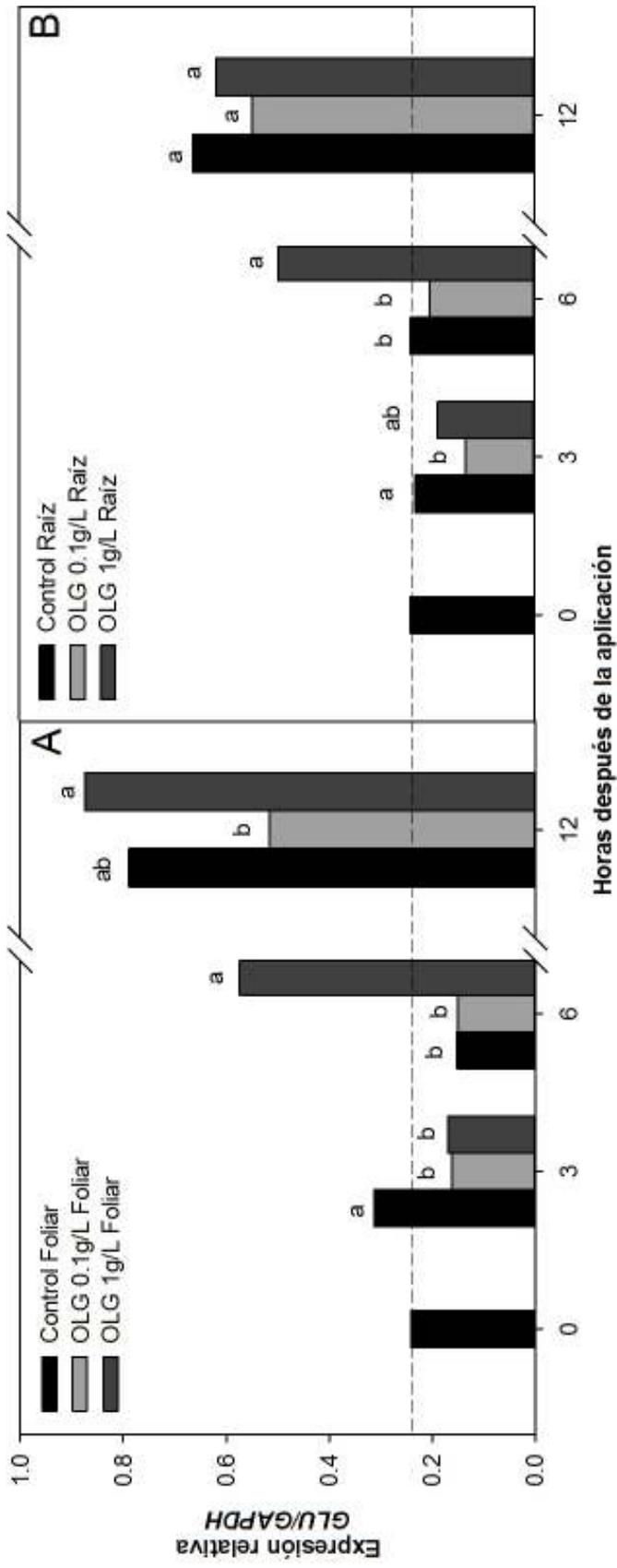


Figura 14. Expresión relativa del gen de  $\beta$ -1-3 GLU en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con oligosacáridos de quitosano a diferentes concentraciones. Los tratamientos fueron aplicados por aspersión foliar (A) y adición al sustrato (B). Los datos son las medias  $\pm$  EE de las muestras por triplicado. Barras con literales diferentes entre tratamientos por hora indican diferencias significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## Expresión de Quitinasa (*QUIT*)

Tanto el polímero como los oligómeros de quitosano son potentes inductores de respuestas defensivas como son la inducción de fitoalexinas, lignificación, proteínas PR y la expresión de genes defensivos fundamentalmente en especies del grupo de las dicotiledóneas aunque también existan estudios en algunas plantas monocotiledóneas (Shibuya y Minami, 2001; Bautista-Baños et al., 2006). Dentro de las proteínas PR también se incluyen enzimas hidrolíticas como las quitinasas, estas enzimas se caracterizan al igual que las glucanasas, por degradar la quitina en la pared celular de varios hongos que la contienen. Existen evidencias de la acción antimicrobiana de estas dos clases de proteínas PR, actuando de manera sinérgica en la degradación de componentes de la pared celular de patógenos (Mauch et al., 1988; van Loon et al., 2006).

En la Figura 15 se muestra la expresión relativa del gen de quitinasa por efecto de la aplicación de quitosano a concentraciones de 0.1 y 1g\*L<sup>-1</sup> en las dos formas de aplicación (foliar y adición al sustrato) evaluadas a las 0, 6 y 12 horas. En la aplicación foliar (Figura 15A) se observa un incremento de la expresión a la hora 6 después de la aplicación, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas (p>0.05) respecto al control, transcurrido este tiempo el transcrito regreso a su expresión basal en la hora 12. Para la aplicación al sustrato (Figura 15B) se presenta un aumento de la expresión de *QUIT* a las 6 horas después de la aplicación, con diferencias significativas (p<0.05) con respecto al control, donde el transcrito se incrementó 2.3 veces con la concentración de 0.1g\*L<sup>-1</sup> y disminuyó para la hora 12, posiblemente porque la planta ya sintetizó la proteína que actuará posteriormente en su defensa, disminuyendo el gasto energético de la misma.

Esto concuerda con trabajos realizados por Lin et al., (2005) en donde se observó un aumento en el transcrito de *QUIT* al aplicar un quitosano con una

masa molar de 50 kDa en plantas de arroz a una concentración de  $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Otros trabajos realizados en soya en donde se aplicaron soluciones acuosas de quitosano en concentraciones de  $0.1$  y  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , observaron un incremento en la actividad de quitinasa (Prapagdee et al., 2007).

Esta respuesta es dependiente de la concentración del elicitor como de la forma de aplicación y es importante resaltar que las extracciones del ARN se realizaron a partir de la hoja de trigo. Cuando el quitosano fue agregado al sustrato, los cambios en la expresión del gen son el resultado de la inducción sistémica de defensa ya que el inductor solo estuvo en contacto con la raíz. El polímero debido a su alto peso molecular en comparación a los oligosacáridos puede tener un alto impacto en la inducción de respuestas mediante la aplicación al sustrato, porque la agregación de este compuesto al suelo puede estar generando fragmentos activos por degradación del mismo ocurrido en el sustrato (Falcón et al., 2008).

En la Figura 16A se presenta la expresión del gen de *QUIT* con la aplicación foliar de los OLG, donde se observan incrementos significativos ( $p < 0.05$ ) con respecto al control en todas las horas de muestreo con la concentración más alta aplicada ( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) manteniéndolo así hasta las 12 horas, resultados similares ocurrieron cuando la aplicación fue al sustrato (Figura 16B), ocurriendo cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en el aumento del transcrito, siendo mayores en comparación del control y la concentración más baja aplicada ( $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Trabajos realizados en hojas de tabaco en donde se les aplico oligosacáridos de quitosano como inductor de respuestas defensivas, observaron incrementos en los genes de *PAL*, *QUIT* y *GLU* desde la primera hora de muestreo hasta las 8 horas después de la aplicación (Yafei et al., 2009). Roby et al., (1987) encontraron un comportamiento similar en plantas de melón tratados con oligómeros de quitosano con GP de 6-9 y GA mayor al 10%,

donde se observó una estimulación en la actividad de quitinasa 6 horas después de la aplicación, alcanzando las máximas actividades a las 12 y 24 horas. Lo anterior concuerda con el presente trabajo donde los OLG estimularon la expresión de *QUIT* 3 horas después de la aplicación, lo que sugiere que su actividad enzimática se podría detectar y aumentar a partir de ese tiempo. Otros estudios realizados por Zhang et al., (2006) donde indujeron varios genes de respuesta a la aplicación con quitosano y oligosacáridos de quitosano observaron que la expresión de algunos genes se inducía después de las 8 horas de la aplicación y otros simplemente se reprimían, encontrando así que la planta necesita encontrar un balance energético cuando se inducen cierto tipos de respuestas.

Al parecer la percepción de los compuestos es diferente tanto para el polímero de quitosano como para los oligómeros. La inducción de defensa para el polímero de quitosano se da mediante la interacción de las cargas positivas del polisacárido con las cargas negativas de la membrana plasmática, a su vez, la posible inducción de los oligómeros de quitosano se puede deber a posibles receptores específicos encontrados en la misma membrana celular de la planta como algunos reportados en soya y tomate (Kauss et al., 1989; Zhao et al., 2005; Felix et al., 1998; Day et al., 2001). Se debe tomar en consideración que en esta forma de aplicación las plantas crecen sobre el sustrato tratado con los compuestos, por lo que la presencia del inductor puede considerarse permanente.

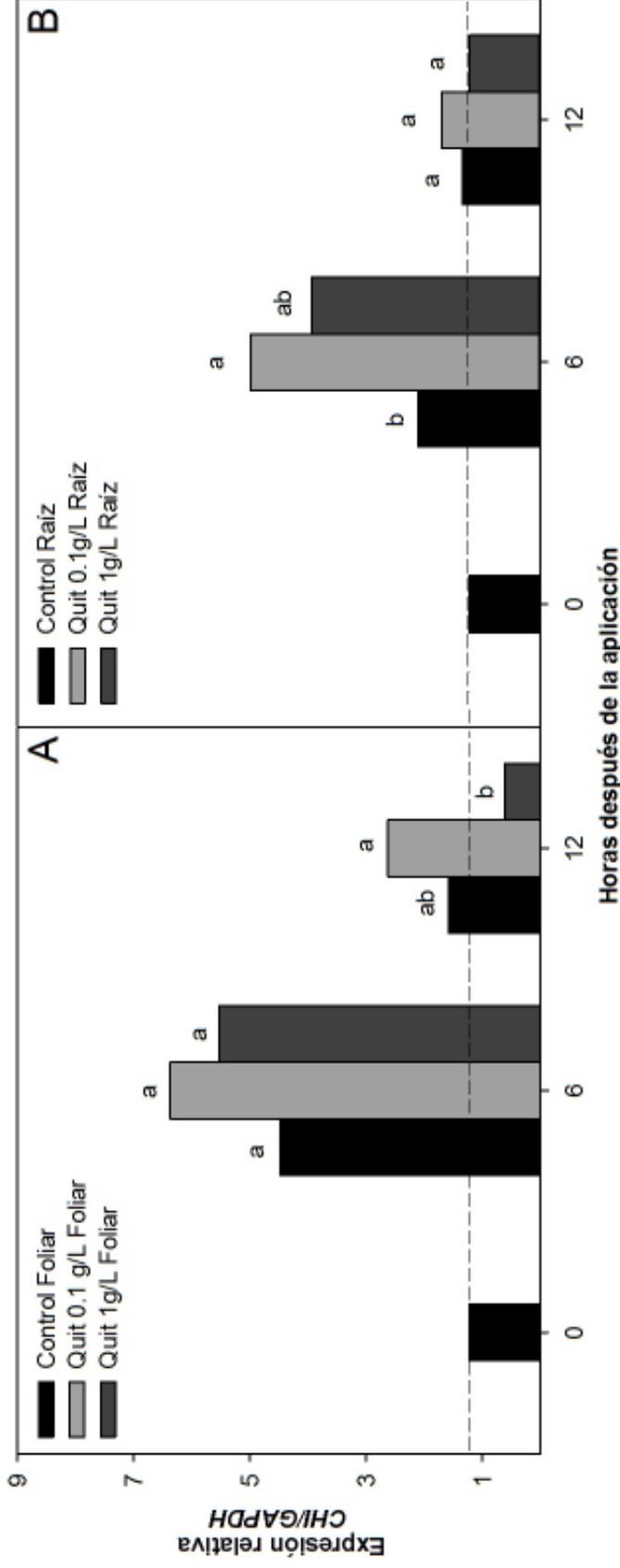


Figura 15. Expresión relativa del gen de *QUIT* en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con quitosano a diferentes concentraciones. Los tratamientos fueron aplicados por aspersión foliar (A) y adición al sustrato (B). Los datos son las medias  $\pm$  EE de las muestras por triplicado. Barras con literales diferentes entre tratamientos por hora indican diferencias significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

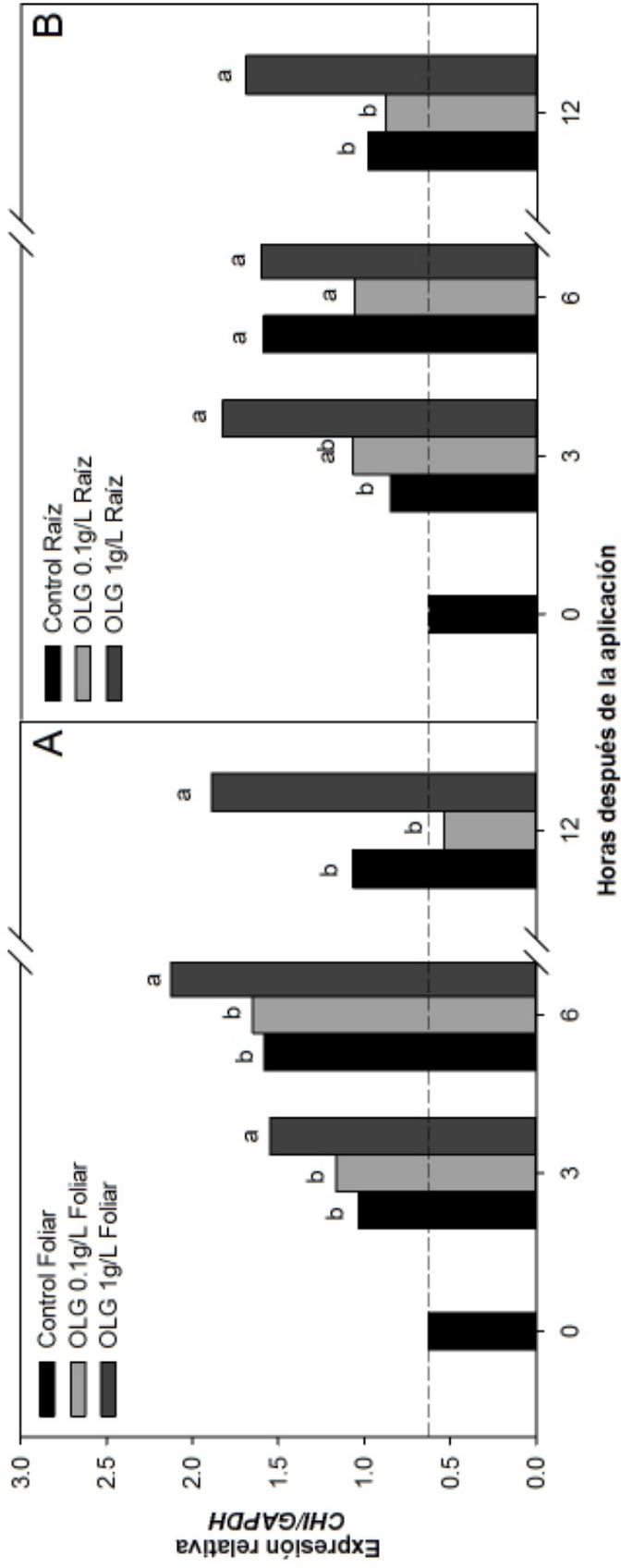


Figura 16. Expresión relativa del gen de *CHI* en hojas de trigo de 25 DDS tratadas con oligosacáridos de quitosano a diferentes concentraciones. Los tratamientos fueron aplicados por aspersión foliar (A) y adición al sustrato (B). Los datos son las medias  $\pm$  EE de las muestras por triplicado. Barras con literales diferentes entre tratamientos por hora indican diferencias significativas utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

A continuación se muestra un resumen de todos los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde se puede observar los incrementos en la expresión de los genes de defensa analizados y también como dependieron todas las variables y características de los compuestos para activar y modular dichas respuestas defensivas en plantas de trigo.

Tabla 4. Incrementos de la expresión de genes de defensa por la aplicación de quitosano y los oligosacáridos de quitosano.

Tratamiento	Concentración	Aplicación	Tiempo (horas)	<i>PAL</i>	$\beta$ -1-3 <i>GLU</i>	<i>QUIT</i>
Polímero	0.1g/L	Foliar	6	4.5X	-	-
			12	-	-	-
		Sustrato	6	-	-	2.9X
			12	-	-	-
	1g/L	Foliar	6	-	-	-
			12	-	-	-
		Sustrato	6	6.5X	-	-
			12	-	4.9X	-
Oligosacáridos	0.1g/L	Foliar	3	-	-	-
			6	-	-	-
			12	-	-	-
		Sustrato	3	-	-	-
			6	-	-	-
			12	-	-	-
	1g/L	Foliar	3	-	-	1.5X
			6	-	3.8X	1.3X
			12	-	-	1.8X
		Sustrato	3	-	-	2.2X
			6	-	2.X	-
			12	-	-	1.7X

## CONCLUSIÓN

La aplicación de la mezcla de oligosacáridos de quitosano de 3-4 GP ( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) indujo un incremento en la expresión temprana de genes de  $\beta$ -1-3 glucanasa (*GLU*) y quitinasa (*QUIT*), sin tener efecto sobre la expresión del gen de fenilalanina amonio-liasa, mientras que el polímero de quitosano de bajo peso molecular indujo incrementos en la expresión temprana del gen de fenilalanina amonio-liasa a las concentraciones de  $0.1$  y  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  y quitinasa a  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . La expresión temprana de los genes *GLU* y *QUIT* inducida por la mezcla de oligosacáridos de quitosano tiene mayor impacto en el desarrollo de la defensa de las plántulas de trigo que una inducción tardía de estos genes.

## RECOMENDACIONES

Ampliar los estudios sobre la inducción de defensa del trigo así como su protección contra fitopatógenos en condiciones in vivo mediante diferentes formas de aplicación de los compuestos de quitosano. Una ventaja adicional de estos inductores es que pueden ser obtenidos a partir de diversas fuentes, generándose así materiales con propiedades fisicoquímicas diferentes que logren detonar una señal específica y una respuesta fisiológica particular. Por lo cual, se torna conveniente que se continúe investigando intensamente en este campo de estudio, con la perspectiva de mejorar y diversificar sus aplicaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. . 2005. *How pathogens attack plants (Chapter five)*. 5th ed. New York, USA: Plant Pathology.
- Alimuniar, A., y R. Zainuddin. 1994. An economical technique for producing chitosan. Paper read at International Conference on chitosan, at Poland.
- Aziz, A., A. Heyraud, y B. Lambert. 2004. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* 218:767-774.
- Aziz, A., B. Poinssot, X. Daire, A. Adrian, A. Bézier, B. Lambert, J-M. Joubert, y A. Pugin. 2003. Laminarin Elicits Defense responses in Grapevine and Induces Protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:1118-1128.
- Badii, M.H., y J.L. Abreu. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas *International Journal of Good Conscience* 1 (1):82-89.
- Bahrke, S., J.M. Einarsson, J. Gislason, S. Haebel, M.C. Letzel, J. Peter-Katalinić, y M.G. Peter. 2002. Sequence analysis of chitooligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization postsorce decay mass spectrometry. *Biomacromolecules* 3:696-704.
- Barber, M.S., R.E. Bertram, y J.P. Ride. 1989. Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34:3-12.
- Barka, E.A., P. Eullaffroy, C. Climent, y G. Vernet. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports* 22:608-614.
- Bautista-Baños, S., A. Hernández-Lauzardo, M.G. Velásquez del Valle, M. Hernández-López, E. Ait Barka, E. Bosquez-Molina, y C.L. Wilson. 2006. Chitosan a potential natural compound to control pre-and postharvest disease of horticultural commodities. *Crop Protection* 25:108-118.
- Ben-Shalom, N., R. Ardi, R. Pinto, C. Aki, y E. Fallik. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection* 22:285-290.

- Boller, T. . 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 46:189-214.
- Boyle, C., y D.R. Walters. 2006. Saccharin-induced protection against powdery mildew in barley: effects on growth and phenylpropanoid metabolism. *Plant Pathology* 55:82-91.
- Brugnerotto, J., J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrières, y M. Rinaudo. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42:3569-3580.
- Buchholz, A. 2006. Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: properties of the lipophilic pathway. *Experimental Botany* 57:2501-2513.
- Cabrera, J.C., J. Messiaen, P. Cambier, y P. Van Cutsem. 2006. Size, acetylation and concentration of chitooligosaccharide elicitors determine the switch from defence involving PAL activation to cell death and water peroxide production in Arabidopsis cell suspensions. *Physiologia Plantarum* 127:44-56.
- Cabrera, J.C., y P. Van-Cutsem. 2005. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochemical Engineering Journal* 25:165-172.
- Carrión, G., F. Ruiz-Belin, y R. Alarcón-Mora. 1992. Control biológico de la roya del cafeto por *Verticillium lecanii* In *Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Fitopatología*. México.
- Cartaya, O., C. Peniche, y I. Reynaldo. 2009. Polímeros naturales recolectores de iones metálicos. *Revista Iberoamericana de polímeros* 10:81-94.
- Ceron-Garcia, A., G.A. Gonzalez-Aguilar, I. Vargas-Arispuro, M.A. Islas-Osuna, y M.A. Martinez-Tellez. 2011. Oligoglucans as Elicitors of an Enzymatic Antioxidant System in Zucchini Squash (*Cucurbita pepo* L.) Seedlings at Low Temperature. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6:52-61.
- Cote, F., K.S. Ham, M.G. Hahn, y C.W. Bergmann. 1998. Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions. Generation, perception and signal transduction. *Cellular Biochemistry-Plant-Microbe Interactions* 29:385-432.

- Day, R.B., M. Okada, Y. Ito, Tsukada K., H. Zaghouani, N. Shibuya, y G. Stacey. 2001. Binding Site for Chitin Oligosaccharides in the Soybean Plasma Membrane. *Plant Physiol* 126:1162-1173.
- Dixon, R.A., L. Achnine, P. Kota, C.J. Liu, M.S. Reddy, y L. Wang. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3 (5):371-390.
- Ebel, J., y E.G. Cosio. 1994. Elicitors of plant defense responses. *International Review of Cytology* 148 (1-36).
- Enríquez-Guevara, E.A., E. Aispuro-Hernández, I. Vargas-Arispuro, y M.A. Martínez-Téllez. 2010. Oligosacarinas derivadas de pared celular: actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:75-86.
- Falcón-Rodríguez, A.B., J.C. Cabrera, E. Ortega, y M.A. Martínez-Téllez. 2009. Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defense responses in roots and leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 4:192-200.
- Falcón-Rodríguez, A.B., D. Costales-Menéndez, E. Ortega-Delgado, O. León-Díaz, J.C. Cabrera-Pinto, y M.A. Martínez-Téllez. 2007. Evaluation of quitosan as an inhibitor of soil-borne pathogens and as an elicitor of defense markers and resistance in tobacco plants. *Spanish Journal of Agricultural Research* 5:533-541.
- Falcón-Rodríguez, A.B., D. Costales, J.C. Cabrera, y M.A. Martínez-Téllez. 2011. Chitosan physico-chemical properties modulate defense responses and resistance in tobacco plants against the oomycete *Phytophthora nicotianae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100 (3):221-228.
- Falcón, A.B., J.C. Cabrera, D. Costales, M.A. Ramírez, G. Cabrera, V. Toledo, y M.A. Martínez-Téllez. 2008. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. *World J Microbiol Biotechnol* 24 (1):103-112.
- FAO. *El cultivo de trigo* 2009. Available from <http://www.fao.org/>.

- Felix, G., K. Baureithel, y T. Boller. 1998. Desensitization of the perception system for chitosan fragments in tomato cells. *Plant Physiology* 117:643-650.
- Ferreira, B. R., S. Monteiro, R. Freitas, N.C. Santos, Z. Chen, M.L. Batista, J. Duarte, A. Borges, y R.A. Teixeira. 2006. Fungal Pathogens: The Battle for Plant Infection. *Plant Sciences* 25:505-524.
- Forján, H. *Trigo y la rotacion de cultivos* 2002. Available from <http://www.inta.gov.ar>.
- Garcia-Brugger, A., O. Lamotte, E. Vandelle, S. Bourque, D. Lecourieux, B. Poinssot, D. Wendehenne, y A. Pugin. 2006. Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:711-724.
- Hadwiger, L.A., T. Ogawa, y H. Kuyama. 1994. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Molecular Plant-Microbe* 7:531-553.
- Hahn, M.G. . 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34:387-412.
- Hall, S.A., R. Stratford, y M.S. Barber. *Mapping of a novel wheat phenylalanine ammonia-lyase to chromosome six using nullitetrasonic and ditelosomic stocks* 2000. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY005474.1>.
- Harish Prashanth, K.V., y R.N. Tharanathan. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview. *Trends in Food Science & Technology* 18 (3):117-131.
- Heath, M.C. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.
- Heil, M., A. Hilpert, W. Kaiser, y E. Linsenmair. 2000. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *Journal of Ecology* 88:645-654.
- Hématy, K., C. Cherk, y S. Somerville. 2009. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 12:406-413.

- Hernández-Ochoa, L., A. Gonzales-Gonzales, N. Gutiérrez-Mendez, L.N. Muñoz-Castellanos, y A. Quintero-Ramos. 2011. Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10 (3):455-463.
- Higa-Nishiyama, A., S. Ohsato, S. Banno, S.H. Woo, y M. Fujimura. *Cloning and characterization of six highly similar endo-1,3-beta-glucanase genes in hexaploid wheat* 2006. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AB244638.2>.
- Hong, L., W. Haiying, X. Changhu, y Y. Mei. 2002. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. *Enzyme and Microbial Technology* 31:588-592.
- Ito, Y., y N. Shibuya. 2000. Receptors for the microbial elicitors of plant defense responses. *Plant-Microbe Interactions*:269-295.
- Katan, J. 1995. Soil solarization research as a model for the development of new methods of disease control. *Phytoparasitica* 20:133-135.
- Kauss, H., W. Jeblick, y A. Domard. 1989. The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* 178:385-392.
- Kawakami, A. , y M. Yoshida. *Wheat-chitinase 2* 2002. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AB029935.1>.
- Khan, W., B. Prithviraj, y D. Smith. 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology* 160:859-863.
- Klarzynski, O., B. Plesse, J.M. Joubert, J.C. Yvin, M. Kopp, B. Kloareg, y B. Fritig. 2000. Linear  $\beta$ -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* 124:1027-1037.
- Kloepper, J.W., y C.M. Ryu. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. *Microbial root endophytes (Soil Biology)* 9:33-52.
- Kloepper, J.W., C.M. Ryu, y S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.

- Kombrink, E., y E. Schmelzer. 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European J. of Plant Pathol* 107:69-78.
- Lárez, C. 2008. Some potentialities of chitin and chitosan for uses related to agriculture in Latin America *Revista UDO Agrícola* 8:1-22.
- Li, J.R. , y X.S. Zhang. *Isolation and expression of wheat glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene* 2003. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY290728.1>.
- Lin, W., X. Hu, W. Zhang, W. John Rogers, y W. Cai. 2005. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *Plant Physiology* 162:937-944.
- Lira-Saldivar, R.H. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las actividades biocidas de la gobernadora (*Larrea tridentata*). *Revista mexicana de fitopatología* 21:214-222.
- Ma, H., R.P. Singh, y A. Mujeeb-Kazi. 1997. Resistance to stripe rust in durum wheats, A-genome diploids, and their amphiploids. *Euphytica* 94:279-286.
- Mauch, F., B. Mauch-Mani, y T. Boller. 1988. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue. *Plant Physiol* 88:936-942.
- Mendoza, C.C. 1993. Algunos factores fisiológicos y anatómicos que afectan las reacciones fuente-demanda en maíz (*Zea mays* L.). Tesis de doctorado, Colegio de postgraduados, Montecillo, Edo. de México.
- Meng, X., B. Li, J. Liu, y S. Tian. 2008. Physiological response and quality attributes of table grape fruits to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry* 106:501-508.
- Millet, Y.A., C.H. Danna, N.K. Clay, W. Songnuan, M.D. Simon, D. Werck-Reichhart, y F.M. Ausubel. 2010. Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell* 22:973-990.
- Muraki, E., F. Yaku, y H. Kojima. 1993. Preparation and crystallization of d-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8. *Carbohydrate Research* 239:227-237.

- Muzzarelli, R.A.A. 1977. Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. *Chitin. Pergamon Press*:164-167.
- Muzzarelli, R.A.A., M. Tomasetti, y P. Ilari. 1994. Depolymerization of chitosans with the aid of papain. *Enzyme and Microbial Technology* 16:110-114.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153:375-380.
- Paz-Lago, D., G. Cabrera, M. Ramírez, R. Pombo, y A. Gutiérrez. 1999. influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* a nivel de bioensayo. *Cultivos tropicales* 20:59-61.
- Pearce, R.B. , y J.P. Ride. 1982. Chitin and related compounds as elicitors of the lignification response in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 20:119-123.
- Pillai, C.K.S., P. Willi, y C.P. Sharma. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34 (7):641-678.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología* 25:78-82.
- Prapagdee, B., K. Kotchadat, A. Kumsopa, y N. Visarathanonth. 2007. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani f. sp. glycines*. *Bioresource Technology* 98:1353-1358.
- Randoux, B., D. Renard-Merlier, G. Mulard, S. Rossard, F. Duyme, J. Sanssené, J. Courtois, R. Durand, y P. Reignault. 2010. Distinct Defenses Induced in Wheat Against Powdery Mildew by Acetylated and Nonacetylated Oligogalacturonides. *Phytopathology* 100:1352-1363.
- Redpermacultura. *El método orgánico para el control de plagas. Redpermacultura* 2008. Available from <http://www.redpermacultura.org/>.
- Ribnicky, D.M., V. Shulaev, y I. Raskin. 1998. Intermediates of Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiology* 118:565-572.

- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31:603-632.
- Riveros, A.S. 2010. *Inducción de resistencia en plantas. Interacción planta-patógeno*. San José, Costa Rica: IICA y MUSALAC.
- Roby, D., A. Gadelle, y A. Toppan. 1987. Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 143 (3):885-892.
- Rodríguez-Pedroso, A.T, M.A. Ramírez-Arrebato, D. Rivero-González, E. Bosquez-Molina, L.L. Barrera-Necha, y S. Bautista-Baños. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos patógenos. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 15 (3):307-317.
- Rodríguez, A.T., M.A. Ramírez, R.M. Cárdenas, A. Falcón, y S. Bautista. 2006. Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:1-7.
- Roelfs, A.P., R.P. Sing, y E.E. Saari. 1992. Rust Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management. *CIMMYT, México D.F.*:81 p.
- Romanazzi, G., F. Nigro, A. Ippolito, D. Di Venere, y M. Salerno. 2002. Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science* 67:1862-1867.
- Sandford, P. 1989. Chitosan: commercial uses and potential applications. *In Chitin and Chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*:51-69.
- Sandoval, J.S., Osada, K.S., Vivar, F.H. y Benitez, R. . 1999. Correlacion entre resistencia en plántula y resistencia en planta adulta a la roya amarilla y a la escaldadura de la cebada. *Agrociencia* 33:415-422.
- Sareini, H.T. , y R.W. Thornburg. *cDNA sequence of wheat seed peroxidase 1* 2002. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF525425.1>.
- Sathiyabama, M., y R. Balasubramanian. 1998. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. *Crop Protection* 17:307-313.

- Schafer, J. F. . 1987. Rusts, smuts, and powdery mildew. In: Wheat and Wheat Improvement. 2nd Ed. Heyne, E. G. (ed.). edited by I. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA.
- 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 Physiol and Biochem* 46:941-950.
- Sharp, J.K., M. McNeil, y P. Albersheim. 1984. The primary structures of one elicitor active and seven elicitor inactive hexa- $\beta$ -glucopyranosyl-D-glucitol isolated from the mycelial cell walls of *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*. *J. of Biological Chem* 259:11321-11336.
- Shibuya, N., y E. Minami. 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:223-233.
- SIAFESON, Sistema de Alerta Fitosanitaria del Estado de Sonora. *Roya lineal o Roya amarilla del trigo Puccinia striiformis f. sp. tritici Eriks*. 2009. Available from <http://www.siafeson.com>.
- SIAP. *Agricultura* 2010. Available from <http://www.siap.gob.mx/>.
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino, W. Pfeiffer, y P. Figueroa-Lopez. 2004. Occurrence and impact of a new leaf rust race on durum wheat in northwestern Mexico from 2001 to 2003. *Plant Dis* 88:703-708.
- Solís-Moya, E., J. Huerta-Espino, H.E. Villaseñor-Mir, y G.A. Aguado-Santracruz. 2007. Roya lineal, fenología, rendimiento y sus componentes en trigo harinero (*Triticum aestivum* L.). *Agrociencia* 41:563-573.
- Stubbs, R.W. 1988. Pathogenicity analysis of yellow (stripe) rust of wheat and its significance in a global context. In: Breeding Strategies for Resistance to the Rust of Wheat. *CIMMYT, México D.F.*:23-38.
- Terbojevich, M., A. Cosani, y R.A.A. Muzzarelli. 1996. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. *Carbohydrate polymers* 29 (1):63-68.
- Torres, M.A., J.D.G. Jones, y J.L. Dangl. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141:373-378.

- van Loon, L.C. 1999. Occurrence and properties of pathogenesis-related proteins. *Pathogenesis-Related Proteins in Plants* CRC Press 1-19.
- van Loon, L.C., M. Rep, y C.M.J. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol* 44:135-162.
- Vander, P., K. Vårum, A. Domard, N.E. El Gueddari, y B. Moerschbacher. 1998. Comparison of the Ability of Partially N-Acetylated Chitosans and Chitooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves. *Plant Physiology* 118:1353-1359.
- Villaseñor, E. O. M., E.J. Huerta, y M.S.G. Leyva. 2003. Análisis de virulencia de la roya de la hoja (*Puccinia triticina* Ericks.) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en los valles altos de México. *Rev. Mex. Fitopat* 21:56-62.
- Vishu-Kumar, A.B., M.C. Varadaraj, R.G. Lalitha, y R.N. Tharanathan. 2004. Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1670 (2):137-146.
- Vivanco, J.M., E. Cosio, V.M. Loyola-Vargas, y H.E. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia* 341:68-75.
- Vorwerk, S. , S. Somerville, y C. Somerville. 2004. Comparison of proteinase inhibitor-inducing activities and phytoalexin elicitor activities of a pure fungal endopolygalacturonase, pectic fragments, and chitosan. *Plant Physiology* 76:833-836.
- Walters, D.R., y C. Boyle. 2005. Induced resistance and allocation costs: What is the impact of pathogen challenge? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66 (1-2):40-44.
- Wei, W., D. Yu, y W. Xiao. 2008. Physical properties of fungal chitosan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:2717-2720.
- Yafei, C., Z. Yong, Z. Xiaoming, G. Peng, A. Hailong, D. Yuguang, H. Yingrong, L. Hui, y Z. Yuhong. 2009. Functions of oligochitosan induced protein kinase in tobacco mosaic virus resistance and pathogenesis related proteins in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry* 47:724-731.
- Yalpani, M., y D. Pantaleone. 1994. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Research* 256 (1):159-175.

- Yamada, A., N. Shibuya, O. Kodama, y T. Akatsuka. 1993. Induction of phytoalexins formation in suspension cultured rice cells by *N*-acetylchitooligosacharide. *Biosci Biotechnol Biochem* 57 (3):405-409.
- Zamani, A., L. Edebo, B. Sjostrom, y J. Mohammad. 2007. Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. *Biomacromolecules* 8:3786-3790.
- Zhang, F., B. Feng, W. Li, X. Bai, Y. Du, y Y. Zhang. 2006. Induction of tobacco genes in response to oligochitosan. *Molecular Biology Reports* 34:35-40.
- Zhao, J., L. Davis, y R. Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv* 23:283-333.

# ANEXOS

## Alineación de secuencias para el diseño de los iniciadores de $\beta$ -1-3 *GLU*

```

4 -----
6 -----
3 AACCAGAGCACGATCGAGAGTGGACTAATAACTACGAACCGGAAGTTCTCGCCAACTAT 60
1 -----
5 -----
2 -----

4 -----
6 -----
3 TTCCAACCCGCCAAACAAGCCGCTCTTGGAACCCAGTCTACAGTCTACTCTATATAT 120
1 -----
5 -----
2 -----

4 -----
6 -----
3 TGGTTGTGCTGATTGGTACCCTTGCATGCAATAGGAAGCCTAGCTACTACTGTTGTAGT 180
1 -----GG 2
5 -----GAATTCGG 8
2 -----

4 -----CACAGTAGACGAGTACG-----CCCGTGCATAAC 29
6 -----TCCTAGCATAGC 12
3 ACCACAGTAGCCGAGTTCGTGCGTGCGCCAACTGTT-----TCCTAGCATAGC 228
1 CACGAGG-----GATC 13
5 CACGAGGCGGGACGTACGTGCGTGCATCGACTGTTTCTTCCCTCGCACAACAAGCTGGTC 68
2 -AAGCTG-----GTC 9
. *

4 AAGCTGACCGAGCTTCTGAAGATGGCGCGGCAGCGTACGTGCTCTGCCTCCGCGCTCGCG 89
6 AAGCTGGTTCGAGCTTCCGAAGATGGCGCGGCAGCGTACGTGCTCTGCCTCCGCGCTCGCG 72
3 AAGCTGGTTCGAGCTTCCGAAGATGGCGCGGCAGCGTACGTGCTCTGCCTCCGCGCTCGCG 288
1 GATCG-ATGGAGCTTCTCAAGATGGCGCGGCACGTACGG----- 52
5 GATCG-ATCGAGCTTCTGAAGATGGCGCGGCACGTACGG----- 107
2 GATCG-ATGGAGCTTCTCAAGATGGCGCGGCACGTACGG----- 48
. * * . ***** *****.*****

4 CTCGCCGTGGCGTTGGTCGTCGGAGT---CTTGGCGTCCATCCCTATCG---AGGTGGAA 143
6 CTCGCCGTGGCGTTGGTCGTCGGAAAT---CCTGGCGTCCATCCCTGTCG---AGGTGGAA 126
3 CTCGCCGTGGCGTTGGTCGTCGGAGT---CTTGGCGTCCATCCCTATCG---AGGTGGCA 342
1 -TGGCCATGGCGTTGGTCGTCGGAGT---CTTGGCGTCCATCACTATCGATCAGGTGCAA 108
5 -TCGCCATGGCGTGGTCGTCGGAGTGATCTTGGCGTCCATCACTATCGATCAGGTGCAA 166
2 -TGGCCATGGCGTTGGTCGTCGGAGT---CTTGGCGTCCATCACTGTCGATCAGGTGCAA 104
* * * .***** *****. * * *****. * * * * *

4 TCCATCGGGGTGTGCAACGGGATGATAGGCGACAGCCAGTCCCTGCCATCTCCGGCCGAC 203
6 TCCATCGGGGTGTGCAACGGGATGCAAGGCGACAGCCAGTCCCTGCCATCGCGGGCCGAC 186
3 TCCATCGGGGTGTGCAACGGGATGATAGGCGACAGCCAGTCCCTGCCATCGCGGGCCGAC 402
1 TCCATCGGGGTGTGCAACGGCAAGGTAGGCGACA-----ACCTGCCATCGCGGGCCGAG 162
5 TCCATCGGGGTGTGCAACGGCAAGGTAGGCGACA-----ACCTGCCATCGCGGGCCGAG 220
2 TCCATCGGGGTGTGCAACGGCAAGGTAGGCGACA-----ACCTGCCATCGCGGGCCGAG 158
***** ***** *: * :.***** .***.*** * *****

```





```

4 -----
6 AAGAGCCATAAA----- 1211
3 AAGATCCATCCATTGTGTTTTGGAAATAAGGATCGG 1438
1 -----
5 -----
2 -----

```

## Alineación de secuencias para el diseño de los iniciadores de *QUIT*

```

2 ---ATCCAAC-CATGTCCAC--GCTGAGAGCGCGGTG-----TGC----GACG----- 38
3 GCAGTGTGACACACAATCACCAGCTGAGCGGACTCTGCTTCATTGCCCAAGATGAGAGGA 60
1 -----

2 GCCGTCCTGGCCGTCGTCCTGGCGGGCGCCGCGGTACGCCGGC-CACGGCCGAGCAGTG 97
3 GTTGTGGTGGTGGCCATGCTGGCCCGGCCCTTCGCCGTGTCTGCGCACG-CCGAGCAATG 119
1 -----CCTGCAAGCCCTCT-----CCTGCGCTACACCG---CAC-----AGGAGTG 39
      ** * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

2 CGGCTCGCAAGCCGG-CGGCGCCAAGTGCGCCGACTGCCTGTGCTGCAGCCAGTTCGGGT 156
3 CGGCTCGCAGGCCGG-CGGGGCGACGTGCCCAACTGCCTCTGCTGCAGCAAGTTCGGTT 178
1 CATTACACGAGCTGATCAGCTGAAGGTGAGTTG---GCCTATG-----GCGAGGTTTGCT 91
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

2 TCTGCGGCACCACCTCCGACTACTGCGGCCCCCGCT-GCCAGAGCCAGTGCCTGGCTGC 215
3 TCTGCGGCACCACCTCCGACTACTGCGGCACCCGGCT-GCCAGAGCCAGTGCATGGCTGC 237
1 GCCCT--CGCCGTGTGCG-CCGCCGGC-CTCCTGCTCGCCGTGGCG--GCGGGGGGTGC 144
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

2 GGTGGCGGC-----GGCGCGGGGTGGCCTCCATCGTG 248
3 AGCGGGCGGCACCCCGGTACCGGTACCGACCCCTCCGGCGGGCGGTCTCCTCCATTATC 297
1 CGCGGGC-----CAG-GGCGTGGGCTCGGTATC 172
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

2 TCCAGGGACCTCTTCGAGCGGTCTCTGCTCCATCGCAACGACGCGAGCGTGCCTGGCCCGC 308
3 TCGCAGTCGCTCTTCGACCAGATGCTGCTGCACCGCAACGACGCGCGGTGCCTGGCCAAAG 357
1 ACGCGGTGCGGTGTACCGAGCATGCTGCCCAACCGCGACAACCTCGTGTGCCCGGCCAGA 232
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

2 GGGTTCTACAGTACGACGCCTTCTGGCCCGCGGGCGGTTCCCGGCCTTCGGCACC 368
3 GGGTTCTACAACCTACGGCGCCTTCGTCGCCCGCCCAACTCGTTCTCGGGGCTTCGGCACC 417
1 GGGCCCGCCCAACACCTTCCCGGGCTTCGGCACC 292
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

2 ACCGAGACCTGGACACGCGGAAGCGGGAGGTGGCGCCTTCTTCGGCCAGACCTCTCAC 428
3 ACAGGTAGCACCGACGTCAAGAAGCGCGAGGTGGCCGCTTCTTCGCTCAGACTTCCCAC 477
1 ACCGGCAGCGCCGACGACATCAAGCGGACCTCGCCGCTTCTTCGGCCAGACCTCCCAC 352
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

2 GAGACCACCGCGGGTGGCCACCGCGCCCGACGGCCCTTCTCATGGGGCTACTGCTTC 488
3 GAGACGACCGCGGGTGGCCGACGGCGCCCGACGGCCCTACTCCTGGGGCTACTGCTTC 537
1 GAGACCACCGGAGGG--ACGAGAGCGCT-GCCGACCAGTTCAGTGGGGCTACTGCTTC 409
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

2 AAGCAGGAGCAGGGC-TGCCCGCCGAGTACTGCGACCAGAGCGCCGACTGGCCGTGCGC 547
3 AACCAGGAGCGCGGCCACCTCCGA-CTACTGCACGCCGAGCTCGCAGTGGCCATGTGC 596
1 AAGGAAGAGATAAGC-----AA-----GGCCACGTC- 435
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

2 ACCCGCAAGCAGTACTATGGCCCGGGCCCATCCAGTCCACCCACAACCTACAACCTACGG 607
3 GCCGGCAAGAAGTACTTCGGCGCGGGCCCATCCAGATCTCACACAACCTACAACCTACGG 656
1 -CCCACCA----TACTATGGACGGGACCCATCCAATTGACAGGGCGGTCCAACCTACGA 489
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

