



Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.

**EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA EN RESPUESTA  
A LA APLICACIÓN DE BIOELICITORES EN FRUTO DE  
TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

---

Por:

**Q.A. Daniela Grissel Téllez Escobedo**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

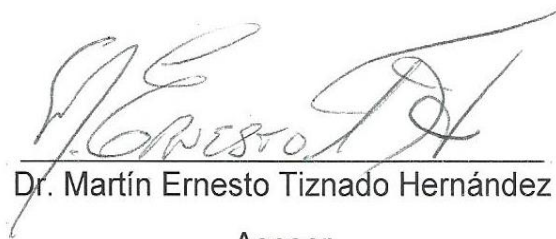
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Daniela Grissel Téllez Escobedo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



---

Dra. Rosalba Troncoso Rojas

Directora de Tesis



---

Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández

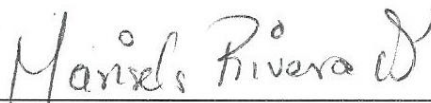
Asesor



---

Dra. Angela Corina Hayano Kanashiro

Asesora



---

Dra. Marisela Rivera Domínguez

Asesora

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). 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 General del 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. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT, por la oportunidad económica otorgada a lo largo de 2 años para seguir con mi formación profesional con un posgrado, así como también el financiamiento de material necesario para su realización por medio de este proyecto.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.), por concederme un espacio como estudiante de maestría en ciencias y con ello, darme la oportunidad de crecer tanto personal como profesionalmente con los conocimientos adquiridos que cada uno del personal investigador-docente me brindó.

A la Dra. Rosalba Troncoso Rojas por darme la oportunidad de alcanzar una meta más en mi vida, además de guiarme en este camino de enseñanza, superación y retos a lo largo de mi estancia en CIAD, a mi comité de tesis integrado por el Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández, la Dra. Marisela Rivera Domínguez y la Dra. Angela Corina Hayano Kanashiro, por sus asesorías y sugerencias que ayudaron a enriquecer este proyecto de tesis a lo largo de mi estancia en el posgrado.

A mis compañeros de trabajo en el laboratorio de Biotecnología Vegetal y Postcosecha Isabel Jiménez, Andrés Pacheco y al M.C. Alberto Sánchez, por el apoyo y gran ayuda brindada, así como también, por compartir momentos de estrés, presión y felicidad.

A la Coordinación de Tecnología en Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) por el apoyo en la infraestructura, equipo y asesoría académica de investigadores y técnicos, en especial a Dra. María Islas, Dra. Carmen Contreras, al M. C. Javier Ojeda, M. C. Eduardo Trillo, Dr. Julio Tafolla y a los estudiantes de doctorado Alhelí Ochoa, Guillermo Berumen y Rigel Fernández, así como también a la coordinación de Ciencia de los Alimentos y a la coordinación de Nutrición, en especial a la Dra. Silvia Moya y la Dra. Maricela Montalvo.

A Francisco Eliezer Sánchez, Idaly Morales, José María Anaya, Armida Orrantía, Lucía Angulo y Aarón Santiaguín, porque más que compañeros de generación, se han convertido en unas personitas muy especiales para mí, por todo el apoyo, ayuda y ratos de convivencia.

A Carlos Ballesteros, por todo el apoyo y gran ayuda brindada a lo largo de este camino lleno de retos y de superación tanto personal como profesional, pero sobre todo, por creer en mí.

## DEDICATORIA

A mis padres Gloria Escobedo y Martín Téllez, porque son un gran ejemplo a seguir de lucha y perseverancia, por hacer de mí una persona que nunca se deja vencer, y sobre todo, por el amor, cariño y apoyo brindado en todo momento.

A mis hermanos Martín y Luis, por ser mi fuente de inspiración para darles de mí un ejemplo a seguir, que con el amor y cariño brindado, son parte de esas ganas de seguir adelante en todo lo que me propongo.

A Carlos, por el simple hecho de seguir siendo parte de mi vida, porque me ayudaste a creer en mí y seguir adelante a pesar de todas las dificultades que se me presentaron en el camino, además de darme amor, cariño, apoyo y comprensión en todo momento.

A mis amigos, compañeros, profesores y a todos aquellos que fueron parte de otra gran meta en mi vida.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
Lista de Figuras	ix
Lista de Cuadros	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
II.1 Generalidades del Fruto de Tomate	4
II.2 Enfermedades Postcosecha en Tomate	5
II.3 Pudrición en Fruto de Tomate por <i>Alternaria</i>	6
II.4 Mecanismo de Defensa	8
II.4.1 Proteínas Relacionadas con la Patogenicidad: Quitinasa	10
II.4.1.1 Clasificación	11
II.4.1.2 Regulación de los genes	12
II.4.2 Proteínas Relacionadas con la Patogenicidad: Peroxidasa	13
II.4.3 Activación de las Moléculas de Señalización en el Mecanismo de Defensa	15
II.4.3.1 Señalización por Ácido Jasmónico	16
II.4.3.2 Señalización por Etileno	17
II.5 Factores de Transcripción	19
II.5.1 Factor de Transcripción de AJ	19
II.5.2 Factor de Transcripción de ET	20
II.6 Elicitores	22
II.6.1 Bioelicitores	23
II.6.1.1 Aplicación de bioelicitores en frutos	24
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>IV. OBJETIVO</b>	<b>26</b>
IV.1 Objetivos Específicos	26
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
V.1 Materia Prima	27
V.2 Preparación del Bioelicitor	27
V.3 Aplicación del Bioelicitor	28
V.4 Extracción de ARN Total	28
V.5 Síntesis de ADNc	29
V.6 Cuantificación de los Niveles de Expresión Génica	31
V.7 Análisis Estadístico	32
V.3 Aplicación del Bioelicitor	28

## CONTENIDO (continuación)

<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	33
VI.1 Estado de Madurez del Fruto de Tomate	33
VI.2 ARN Total y Síntesis de ADNc	34
VI.3 Análisis <i>in silico</i> de los Oligonucleótidos	36
VI.4 Expresión Relativa de los Genes que Codifican para POD, Chi y SIERF1	37
<b>VII. CONCLUSIÓN</b>	45
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	46



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Morfología de <i>Alternaria alternata</i> .	7
2	Activación del mecanismo de defensa en respuesta a la interacción planta-patógeno.	18
3	Estado de madurez del fruto de tomate.	33
4	Análisis electroforético del ARN total.	35
5	Análisis electroforético de ADNc.	36
6	Efecto del bioelicitor en la expresión relativa del gen que codifica para Chi en fruto de tomate.	39
7	Efecto del bioelicitor en la expresión relativa del gen que codifica para POD en fruto de tomate.	41
8	Efecto del bioelicitor en la expresión relativa del gen que codifica para el factor de transcripción SIERF1 en fruto de tomate.	43

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de genes de defensa por PCR en tiempo real.	32
2	Análisis de PCR <i>in silico</i> de los diferentes oligonucleótidos.	37
3	Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos específicos y genes de referencia.	38

## RESUMEN

El tomate posee gran importancia económica en México y el mundo. Después de su cosecha y durante el almacenamiento refrigerado, puede ser infectado por el hongo *Alternaria alternata*. Una posibilidad para el control de este patógeno y reducir las pérdidas postcosecha es la inducción de la respuesta de defensa natural mediante la aplicación de bioelicitores. Se ha demostrado que los bioelicitores preparados a partir de *Alternaria* sp. disminuyeron el deterioro por el patógeno en frutos de tomate. Actualmente, se desconoce su efecto en la activación de los genes de defensa en tomate. El presente trabajo evaluó el efecto de bioelicitores a partir de *A. alternata* y tejido vegetal sobre la expresión de los genes de defensa que codifican para quitinasa (Chi1), peroxidasa (POD) y el factor de transcripción SIERF1, en fruto de tomate. El bioelicitor se elaboró y preparó a dos concentraciones (0.2 g/L; 2 g/L). Los frutos se asperjaron con ambos tratamientos, se almacenaron a 20°C y se tomaron muestras del pericarpio a diferentes tiempos: 0, 0.5, 2, 4, 6 y 24 h. El ARN total se extrajo de tomate mediante la técnica de precipitación por cloruro de litio y posteriormente se obtuvo el ADNc. Se realizó una cuantificación relativa de la expresión de los genes de defensa mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) utilizando Ubiquitina como gen normalizador. Se utilizaron oligonucleótidos que codifican para las enzimas quitinasa y peroxidasa y el factor de transcripción SIERF1. La aplicación del bioelicitor indujo un aumento en los niveles de expresión génica durante las primeras horas del tratamiento. Se observó una máxima expresión relativa para Chi1 a la media hora del tratamiento, con una expresión de 2.97 veces mayor con respecto al testigo al tiempo 0; mientras que el tratamiento indujo un incremento en la expresión relativa para POD a las 4 h de exposición, la cual fue 10 veces mayor. Asimismo, la expresión del transcrito que codifica para SIERF1 fue estimulada por el bioelicitor, registrándose un incremento significativo (25.45 veces mayor respecto al testigo al tiempo 0), a las 2 h de exposición. El bioelicitor obtenido de *A. alternata* enriquecido con tejido vegetal, indujo en forma inmediata la

expresión de los genes que codifican para el factor de transcripción SIERF1 y para las proteínas relacionadas a la patogenicidad (quitinasa y peroxidasa), involucradas en el mecanismo de defensa natural del tomate.

**Palabras clave:** *Alternaria alternata*, tomate, bioelicitador, genes de defensa, SIERF1.

## ABSTRACT

Tomato has a great economic importance in Mexico and worldwide. After harvest and during cold storage, tomato could be infected by the fungus *Alternaria alternata*. One possibility to control this pathogen and reduce post-harvest losses is the induction of natural defense response by the use of bioelicitors. It has been shown that bioelicitors from *Alternaria* sp. decreased the pathogen decay in tomato fruits. Currently, the effect of bioelicitors in activating defensive genes in tomato is unknown. This study evaluated the effect of bioelicitors prepared with *A. alternata* and plant tissue on the expression of defense genes that encode for Chitinase (Chi1), Peroxidase (POD) and the transcription factor SIERF1 in tomato fruit. The bioelicitor was developed and prepared at two concentrations (0.2 g/L; 2 g/L). The fruits were sprayed with both treatments, stored at 20°C and the pericarp samples were taken at different times: 0, 0.5, 2, 4, 6 and 24 h. Total RNA was extracted from tomato using the technique of precipitation by lithium chloride and later cDNA was obtained. A relative quantification of the expression of defense genes by real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using Ubiquitin as housekeeping gene. Oligonucleotides coding for Chitinase, Peroxidase and the transcription factor SIERF1 were used. The application of bioelicitor induced an increase in the gene expression levels during the first hours after treatment. A maximum relative expression for Chi1 was observed after 0.5h of treatment, with an expression of 2.97 fold change compared to the control at time 0; while an increase in the relative expression for POD was induced at 4 h of exposure, showing a significant 10-fold expression. Furthermore, expression of transcript encoding SRF1 was stimulated by the bioelicitor, recorded a significant increase (25.45 times higher than the control at time 0) at 2 h of exposure. The bioelicitor obtained from *A. alternata* and plant tissue immediately induced expression of genes encoding transcription factor SIERF1 and proteins related to pathogenicity (chitinase and peroxidase), involved in the natural defense mechanism of tomato.

**Keywords:** Alternaria, tomato, bioelicitor, defense genes, SIERF1.

## I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más comunes para la industria hortofrutícola es el deterioro de frutas y hortalizas en postcosecha, ya que representa pérdidas económicas importantes. Se estima que alrededor del 20-25% de las cosechas se deterioran por patógenos durante el manejo postcosecha, incluso en países desarrollados (Alkan y Fortes, 2015).

Entre los agentes causales del deterioro en el tomate se encuentra el hongo *Alternaria*, que infecta plantas y frutos económicamente importantes. Tiene cerca de un centenar de especies que se pueden encontrar en varios lugares de todo el mundo (Kakvan et al., 2009). Durante el manejo postcosecha de los frutos, este hongo penetra el tejido donde permanece en estado latente hasta que las condiciones favorecen la infección (Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014).

Para el control de este patógeno, se han utilizado varios métodos, incluyendo el control químico como el uso de diferentes fungicidas; sin embargo, ninguno de ellos ha tenido un éxito completo. Además, su uso indiscriminado ha llevado al desarrollo de resistencia en las poblaciones de hongos fitopatógenos, siendo uno de los problemas más importantes en la agricultura (Kakvan et al., 2009; Báez-Flores et al., 2011).

Por otro lado, la tendencia mundial se dirige hacia la reducción del uso de fungicidas en los productos y por lo tanto, hay un fuerte interés público y científico a buscar alternativas ecológicas más seguras que ayuden a reducir las pérdidas por deterioro en los productos cosechados (Benhamou, 1996).

Una alternativa para reducir o inhibir el desarrollo de este tipo de enfermedades, es la inducción de la respuesta de defensa natural (NDR, por sus siglas en inglés), ya que activa la síntesis de metabolitos secundarios (fitoanticipinas y fitoalexinas), realiza modificaciones en las defensas estructurales (lignificación); aumenta los niveles de actividad enzimática como quitinasa y glucanasa; y comienza la producción inmediata de especies reactivas de oxígeno (Sánchez-Estrada et al., 2009). Estos cambios limitan la penetración y desarrollo de patógenos en los tejidos del hospedero (Prusky et al., 2013).

La protección de la planta puede ser activada por elicitores o activadores físicos, químicos y biológicos. En el caso de los activadores o inductores de tipo biológico, éstos han sido utilizados en forma muy activa. Se han utilizado extensivamente fragmentos de pared celular fúngico para inducir la activación de los genes de defensa que se expresan durante las interacciones planta-patógeno (Terry y Joyce, 2004; Sánchez-Estrada et al., 2009). Además, se ha reportado el uso de cepas no virulentas de microorganismos patogénicos que inducen la resistencia sistémica adquirida en el tejido vegetativo hospedero y en frutos postcosecha (Egusa et al., 2008).

Las respuestas de defensa de las plantas se activan por la percepción de la presencia de moléculas que muestran el patrón molecular asociado a microorganismos (MAMPs, por sus siglas en inglés). Se ha demostrado que la señalización mediada por ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) tienen una función importante tanto en la resistencia basal como en la resistencia específica (Benhamou, 1996; Egusa et al., 2008; Terry y Joyce, 2004).

Cabe mencionar que el tomate (*Solanum lycopersicum*), es susceptible a infecciones causadas por *Alternaria alternata*, por lo cual se ha utilizado como modelo de investigación, para el desarrollo de alternativas ecológicas como la aplicación de bioelicitores (Egusa et al., 2008; Sánchez-Estrada et al., 2009; Troncoso-Rojas et al., 2013).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de bioelicitors derivados de *Alternaria alternata* en la expresión de genes de defensa en fruto de tomate.



## II. ANTECEDENTES

### II.1 Generalidades del Fruto de Tomate

Entre las hortalizas, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tiene una alta importancia económica a nivel mundial y una gran popularidad por ser cultivado en todo el mundo, por lo que es considerada la hortaliza más consumida después de la papa. El consumo de esta hortaliza es una parte importante de la dieta humana y es considerada como una de las principales fuentes de minerales, vitamina C y E, carotenos y flavonoides. Es uno de los principales vegetales cultivados en el mundo, siendo China, Estados Unidos, Turquía, India, Egipto, Italia, España, Brasil y México, los principales países productores (Blancard et al., 2011; FAO, 2012; SIAP, 2012).

En México, de acuerdo con estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) la producción anual en el año 2012 fue de 2,838,369.87 ton cosechadas en una superficie mayor a 55,237.38 ha. El 80.5% de la producción de tomate se llevó a cabo en diez estados de la república: Sinaloa, Michoacán, Baja California, Veracruz, San Luis Potosí, Nayarit, Baja California Sur, Jalisco, Morelos y Zacatecas (SIAP, 2012). Por otro lado, la producción anual de tomate según lo reportado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para México durante el año 2015, fue de 2,715,000 ton cosechadas en una superficie de 54,300 ha (USDA, 2015).

El fruto de tomate después de alcanzar el estado rojo maduro firme, es altamente susceptible a ser atacado por microorganismos (bacterias y hongos), los cuales, provocan una reducción en la vida postcosecha (Mahovic et al.,

2002). En general, el tiempo de vida postcosecha del tomate depende de la variedad, estado de madurez del fruto y de las condiciones de almacenamiento. Si se almacena en estado de madurez rojo a una temperatura de 7°C -10°C, puede durar con buena calidad de 8 a 10 días (Suslow y Cantwell, 2013).

## II.2 Enfermedades Postcosecha en Tomate

Las enfermedades postcosecha causan pérdidas económicas considerables de frutas y hortalizas durante la transportación, almacenamiento, distribución y comercialización. En el caso particular del fruto de tomate, éste es afectado por diversas plagas y enfermedades (Mahovic et al., 2002).

Los patógenos que afectan la calidad del fruto de tomate son muy diversos y variados, pero el más importante agente causal de pérdidas postcosecha son las infecciones por hongos (Abdelmallek et al., 1995; Juárez-Becerra et al., 2010).

Estos patógenos además de ser responsables de grandes pérdidas, también pueden causar cambios considerables en la calidad del fruto de tomate (Abdelmallek et al., 1995; Cota, et al., 2007).

Después de la cosecha el fruto de tomate es afectado por los hongos: *Alternaria alternata* (pudrición negra, Zitter y Wien, 1984), *Botrytis cinerea* (pudrición por moho gris), *Geotrichum candidum* (pudrición ácida), *Fusarium* spp. (Ignjatov et al., 2012), *Phytophthora* sp., y *Rhizopus stolonifer* (pudrición algodonosa; Ceponis et al., 1986). *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* son los principales hongos que infectan al tomate durante su maduración y almacenamiento refrigerado (Snowdon, 2010).

### II.3 Pudrición en Fruto de Tomate por *Alternaria*

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl pertenece al género dictiospórico del filo Ascomycota y al grupo Dematiaceae, hongos imperfectos (Fungi Imperfecti) (Rotem, 1998). Las colonias son de crecimiento rápido y macroscópicamente presentan un aspecto veloso, al principio de color gris, después adquieren tonos verde oliváceo oscuro en el centro y reverso y con un borde gris blanquecino que rodea la colonia. Microscópicamente se observan conidióforos simples, tabicados, de forma alargada u ovoide (Figura 1). En el extremo del conidióforo se forman unos conidios de color pardo, con septos transversales y verticales (muriformes) de disposición irregular. La reproducción es por gemación de la célula a partir de la cual se genera un nuevo conidio (Pryor y Michailides, 2002).

*Alternaria* es un hongo de gran importancia, ya que afecta a frutos de tomate en campo y en postcosecha causando la enfermedad del hongo negro, además, puede comportarse como oportunista o infectar por sí solo. El ataque se caracteriza por las lesiones iniciales que aparecen en la superficie del fruto y aumentan cubriendo el fruto, son de color marrón oscuro, irregulares, varían en tamaño, afectan al tejido epidérmico y presentan hundimiento (Guerrero-Rodríguez et al., 2007; Hall et al., 1980; Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014).

*Alternaria alternata*, es uno de los hongos más comunes que se encuentran en la naturaleza; vive y se multiplica en la materia orgánica muerta cuando la humedad está presente, además, se puede encontrar en las hojas muertas y senescentes en campos de tomate antes de la maduración del fruto. La esporulación de *A. alternata* es óptima a 27°C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35°C. La actividad de agua mínima para el desarrollo es 0.88 y la óptima casi 1.00. El crecimiento se reduce a la mitad en una atmósfera con más de 15% CO<sub>2</sub> o con 2.8% O<sub>2</sub>. (Hall et al., 1980; Lacey, 1989).

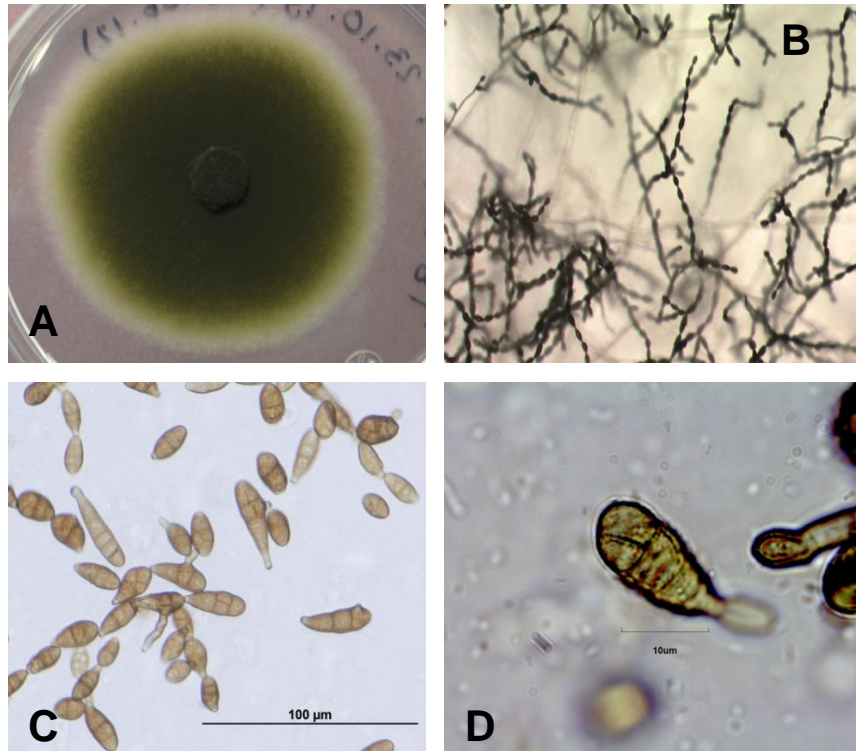


Figura 1. Morfología de *Alternaria alternata*. **A**, Colonia of *A. alternata* en agar Papa Dextrosa. **B**, Cadena de conidias y tipo de ramificación de *A. alternata*. **C**, Conidias a 40X. **D**, Conidia a 100X. (Fotografías proporcionadas por: (A) y (B) Profesor Barry Pryor, Plant Pathology, Universidad de Arizona, Tucson, Arizona, USA.)

Debido a que es un fitopatógeno débil capaz de colonizar únicamente tejido muerto, infecta los tomates y causa lesiones visibles sólo después de que el fruto ha madurado. Las infecciones a veces ocurren en el fruto en estado inmaduro (verde), pero sólo una o dos células de la epidermis se ven afectadas y las lesiones no se desarrollan, incluso después de la maduración del fruto (Hall et al., 1980; Troncoso-Rojas y Tiznado-Hernández, 2014).

## II.4 Mecanismos de Defensa

En la naturaleza, las plantas se encuentran constantemente desafiando a los fitopatógenos mediante una amplia gama de respuestas que les permite de manera temprana reconocer, detener y contrarrestar la infección (Prusky et al., 2013). En el transcurso de la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos a nivel fisiológico, bioquímico y genético para resistir, adaptarse y sobrevivir al ataque de virus, bacterias, hongos, nematodos, insectos y otros factores de estrés biótico. Dichas defensas pueden estar presentes antes del ataque por parte del patógeno, o pueden formarse en respuesta a su presencia (Durrant y Dong, 2004).

Las plantas poseen una serie de barreras en su superficie o cerca de ella que las protegen contra diferentes factores ambientales, como la radiación, la desecación, así como factores bióticos entre los que se encuentran los organismos dañinos. Estas barreras son inespecíficas y a menudo forman la primera línea de defensa contra las enfermedades (Arauz, 1998).

Este tipo de defensa preformada también llamada constitutiva, son estructuras o sustancias químicas presentes en la planta antes de la infección del patógeno. Algunos ejemplos de defensas físicas constitutivas son los tricomas, ceras de la cutícula; pared celular de las células de la epidermis; el tamaño, localización y forma de estomas y lenticelas que actúan como barreras que dificultan la penetración de algunos patógenos (Madriz, 2002; Hematy et al., 2009).

Por otro lado, las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales tiene funciones relacionadas con las interacciones de la planta con el ambiente. Las defensas químicas constitutivas presentes en la planta antes de que se lleve a cabo el reconocimiento, son de origen diverso con alta actividad biológica. Las plantas sintetizan una amplia variedad de sustancias con propiedades tóxicas o inhibitorias como fenoles, lignina, taninos, saponinas, antocianinas, flavonoides, glucosinolatos, lectinas, así como ciertas

enzimas como  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas, peroxidasas, proteínas tipo taumatina, tioninas, oxalato oxidasa, proteínas de transferencia no específica de lípidos, entre otros (Arauz, 1998; Kliebeinstein et al., 2004; Ebrahim et al., 2011; Alkan y Fortes, 2015).

La defensa inducida por agentes bióticos involucra el reconocimiento entre planta-patógeno y la activación de una cadena compleja de mecanismos de defensa que llevan a la inactivación de los patógenos en el órgano infectado y a la inducción de mecanismos de defensa en tejidos alejados del punto de infección (Arauz, 1998; Alkan y Fortes, 2015).

La resistencia inducida, es una forma de defensa que involucra la expresión de genes y activación de caminos metabólicos que ocurren como consecuencia del fenómeno de reconocimiento específico entre la planta y el patógeno. Este fenómeno se explica mediante el modelo de la teoría del gen por gen, el cual se define por la expresión de un gen de resistencia (R) en la planta, el cual puede interactuar directa o indirectamente con el producto del gen de avirulencia (avr) del patógeno invasor. Las proteínas R actúan como receptor y las proteínas activadoras avr como ligando (Madriz-Ordeñana, 2002; Stange et al., 2007).

El modelo más simple que explica esta interacción requiere que los productos del gen R reconozcan las señales que dependen del gen avr y disparen la cadena de eventos de transducción de señales que culminan en la activación de mecanismos de defensa y detienen el crecimiento del patógeno. Entre estas respuestas se incluye la respuesta hipersensible (RH) que se produce en las interacciones incompatibles y conlleva a una muerte celular programada, localizada en el sitio de infección (Camarena-Gutiérrez, 2006; Panthee y Chen, 2010).

Además de la RH, también se encuentran las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR), que constituyen un grupo heterogéneo de proteínas, tóxicas para los patógenos y se acumulan predominantemente en los espacios

extracelulares. Se inducen diferencialmente dependiendo de la especie vegetal y del tipo de infección que ha sufrido la planta. Entre las PR se encuentran PR9 con actividad de peroxidasas, así como también, PR3 y PR8 de actividad quitinasa. Dado que quitina, es de los principales constituyentes de la pared celular de hongos, la acción de quitinasas se asocia con actividad antifúngica. Estas son proteínas hidrolíticas que degradan la pared celular de los hongos (Stange et al., 2007).

Algunas PR9 inducidas que se expresan durante la patogénesis, tienen naturaleza ácida y básica, y son un tipo específico de peroxidasas que pueden actuar en el reforzamiento de la pared celular y aumentan la resistencia contra un gran número de patógenos (Simonetti et al., 2009).

#### **II.4.1 Proteínas Relacionadas con la Patogenicidad: Quitinasa**

Las quitinasas son enzimas presentes en bacterias, hongos, animales, y plantas. Son endo  $\beta$ -1,4-glucoaminidasas, las cuales hidrolizan los enlaces  $\beta$ -glucosídicos de la cadena principal reduciendo la N-acetilglucosamina a quitina o peptidoglucano. Su sustrato está presente en la pared celular de muchos hongos, así como en los insectos y nemátodos, que son los principales agentes patógenos y plagas de plantas de cultivo (Datta et al., 1999; Fukamizo et al., 2013).

Existen varias nomenclaturas para quitinasas, como glicosilhidrolasas, proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), entre otras. A partir de la comparación entre secuencias, las quitinasas se clasificaron en 7 clases, algunas ácidas y otras básicas. La identificación de varias PR con función de quitinasa, dio lugar a su inclusión en una nueva nomenclatura de las PR (Margis-Pincheiro et al., 1993; Meins et al., 1994; Fukamizo et al., 2008).

PR-3 se convirtió en el nombre para quitinasas relacionadas con las clases I, II, IV, V, VI y VII, mientras que las quitinasas de clase III fueron asignadas con el nombre PR-8. Las PR-4, están clasificadas en 2 tipos, la clase I que es inducida por daño físico y la clase II muestra similar actividad a las quitinasas ácidas. Por último, PR-11 son un nuevo tipo de quitinasas, las cuales han sido detectadas en tabaco y muestran ser inducidas por varios tipos de estrés inclusive por una infección viral. La quitinasa PR-3 corresponde además con la familia 19 de glicosilhidrolasas; PR-8 y PR-11 con la familia 18 de glicosilhidrolasas (Datta et al., 1999; Bravo et al., 2003; Solis et al., 2007).

II.4.1.1 Clasificación. La clase I tienen un pro péptido C-terminal que ayuda en la orientación vacuolar. Además, tienen un dominio de unión a quitina (CBD, por sus siglas en inglés) rico en prolina y glicina. La clase II son quitinasas ácidas y carecen de un CBD. Debido a que no incluyen ciertos aminoácidos en la estructura primaria, no poseen uno de los cuatro lazos necesarios para la N-glicosilación; está más relacionado a la clase I. La clase III son únicas en estructura y no tienen ninguna relación con cualquier otra clase de quitinasas vegetales. Generalmente tienen actividad lisosomal y parecen estar más estrechamente relacionadas con las quitinasas bacterianas (Mérillon y Ramawat, 2011; Ebrahim et al., 2011).

Las quitinasas de las clases IV, V, VI, y VII pertenecen a la familia PR-3. La estructura de las quitinasas de clase IV es similar a la clase I, excepto que poseen menos aminoácidos. Además de lo anterior, representan un grupo de quitinasas extracelulares, como las quitinasas de la clase II. Las quitinasas de la clase V no son similares a quitinasas vegetales conocidas pero tienen similitud significativa en secuencia a exoquitinasas bacterianas. Las quitinasas de la clase VI son homólogas a quitinasa de remolacha azucarera que poseen sólo la mitad del CDB (Ebrahim et al., 2011).



II.4.1.2 Regulación de los genes. La mayoría de las quitinasas de las familias PR-8 (C<sub>HIB</sub>) y PR-11 (C<sub>HIC</sub>) son inducidas cuando las plantas están infectadas por un patógeno. Una abundancia relativa de las distintas familias en el tejido infectado varía de una planta a otra. PR-8 es la quitinasa más abundante tras la infección en pepino, mientras que en tabaco sólo se producen pequeñas cantidades (Samac y Shah, 1991; Lawton et al., 1992).

La mayoría de las quitinasas que corresponden a la familia PR-3 (C<sub>HIA</sub>) también son inducidos por patógenos, existe una regulación diferencial de los diferentes genes dentro de una sola planta. En el tabaco, por ejemplo, los genes de clase I se expresan constitutivamente en las raíces. Las mismas quitinasas también se acumulan en la epidermis de las hojas en una manera dependiente a la edad; son inducidas por etileno y reprimidos por la auxina y citoquinina (Keefe et al., 1990; van Buuren, et al., 1992)

En el caso de papa, dos genes de las quitinasas de la familia PR-4 (C<sub>HID</sub>) se han clonado en un único fragmento genómico. Ambos genes fueron inducidos por herida, pero con diferentes especificidades de tejido: ARN win1 se acumula en hojas y tallo, pero no en las raíces o tubérculos, mientras que el ARN win2 solamente se acumula en las raíces y tubérculos (Stanford et al., 1990).

Asimismo, existe una regulación en la expresión de los genes dependiendo del patógeno. En tomate por ejemplo, la expresión de los genes que codifican para una isoforma ácida de la quitinasa correspondiente a la clase III fue inducida en respuesta a la infección causada por *Fusarium oxysporum*, y en un genotipo resistente al patógeno los transcritos se acumularon rápidamente durante las primeras 24 h post-inoculación (Oliveira et al., 2012). En cambio, al aplicar *Trichoderma harzianum* en plantas de tomate, se indujo la expresión del gen que codifica a una isoforma ácida de la quitinasa correspondiente a la clase II; mientras que al aplicar la micorriza *Glomus intraradices*, la expresión de ese mismo gen fue baja. Estos resultados sugieren que la isoforma ácida de la quitinasa clase II está involucrada en la resistencia sistémica adquirida (Ene et al., 2013).

## II.4.2 Proteínas Relacionadas con la Patogenicidad: Peroxidasa

La peroxidasa de los vegetales son glicoproteínas que contienen un grupo hemo que catalizan la oxidación por  $H_2O_2$  de una amplia gama de sustratos orgánicos e inorgánicos, tales como el citocromo C, nitrito, ácido ascórbico, indol aminas, y el ion yoduro. Se encuentra implicada en una amplia gama de procesos fisiológicos, tales como el metabolismo de la auxina, la biosíntesis de etileno, la formación de lignina, la respiración, los procesos de luz mediada, el crecimiento y la senescencia. Además, la actividad de la peroxidasa está relacionada con el mecanismo de defensa en la planta contra patógenos (Datta et al., 1999; Cosio y Dunand, 2009).

La pared celular vegetal constituye una de las primeras líneas de defensa contra la invasión de patógenos y las peroxidasas catalizan la oxidación de ácido hidroxicinámico, la oxidación de fenol, el entrecruzamiento de polisacáridos, la reticulación de monómeros de extensión, la lignificación y suberización. Aunque la participación directa de un mismo tipo de peroxidasa en defensa no se ha demostrado de manera concluyente, se han propuesto peroxidasas extracelulares o de unión a la pared para mejorar la resistencia por la construcción de una barrera de pared celular que pueda impedir la entrada de patógenos y la propagación (Chang et al., 2012).

Las plantas contienen múltiples isoformas de peroxidasas que responden a los distintos estímulos en diferentes o similares formas, por lo que son muy importantes para la autodefensa en los tejidos vegetales en respuesta a diversos tipos de estrés biótico, incluyendo la infección por patógenos (Rawal et al., 2013).

Las peroxidasas (EC 1.11.1.X) de la superfamilia vegetal se puede dividir en tres grandes categorías; peroxidasas de clase I (EC 1.11.1.5/6/11), son intracelulares; clase II (EC 1.11.1.13/14), incluye peroxidasas fúngicas extracelulares; y clase III (EC 1.11.1.7), incluyen principalmente peroxidasas

extracelulares en vegetales, que se secretan a través del retículo endoplásmico (Cosio y Dunand, 2009). Algunas peroxidasas de clase III que no son extracelulares, están dirigidos a la vacuola por un propéptido C-terminal (Welinder, 1992).

Entre las proteínas inducidas durante la defensa de las plantas y que cumplen un papel clave en varias respuestas metabólicas, se encuentran las peroxidasas de la clase III. En la literatura, varias abreviaturas se utilizan para este tipo de peroxidasas (POD, POX, Prx, Px, y PER), pero de acuerdo con las anotaciones de genes, el uso de POD parece ser la opción más adecuada. Son miembros de una gran familia multigénica y están involucrados en una amplia gama de procesos fisiológicos en todo el ciclo de vida de la planta (Almagro et al., 2009).

POD (clase III) son de naturaleza glicoproteica, y se encuentran en vacuolas y paredes celulares. Muestran una amplia gama en requerimiento de sustrato con una especificidad de sustrato moderado pero perceptible para los fenoles y un grado inusual de la estabilidad térmica (Morales y Barceló, 1997; Passardi et al., 2005).

Las POD son una clase bien conocida dentro de las proteínas PR, ya que se inducen en tejidos de la planta huésped mediante la infección por patógenos. Estas peroxidasas pertenecen a la familia PR-9, que son un tipo específico de peroxidasas que pueden catalizar el reforzamiento de la pared celular y aumentan la resistencia contra un gran número de patógenos; además, tienen naturaleza ácida y básica (Van Loon et al., 2006; Simonetti et al., 2009).

### **II.4.3 Activación de las Moléculas de Señalización en el Mecanismo de Defensa**

Las respuestas de defensa o inmunidad primaria de las plantas se activan por el reconocimiento de estructuras conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs / MAMPs) a través de las proteínas receptoras llamadas receptores de reconocimiento de patrones (PRRS) como efecto de las vías de transducción de señales (Mejía-Teniente et al., 2010).

La señalización de defensa está conducida por diversas moléculas que le permiten a la planta responder a un amplio rango de estímulos (Figura 2). La principal función de estas moléculas de señalización consiste en traducir los estímulos extracelulares reconocidos por receptores de la célula para la activación de genes específicos, que en completa coordinación realizan respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo externo agresor. Los señalizadores ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) juegan un papel importante tanto en la resistencia basal como en la resistencia específica (Egusa et al., 2008; Vidhyasekaran, 2008).

El AJ, AS y ET son importantes reguladores de la expresión de genes de defensa (Hammond-Kosack y Parker, 2003; Bari y Jones, 2009). Estas rutas de defensa actúan antagónicamente, AS participa en la resistencia a patógenos biotróficos y AJ-ET están involucrados en las respuestas a patógenos necrotróficos, y forman parte de una red de señalización compleja que determina la respuesta de defensa de la planta (Mejía-Teniente et al., 2010; Salgado, 2012).

El ácido salicílico y etileno pueden actuar sinérgicamente o antagónicamente durante la activación de genes de defensa ante un patógeno específico. Por otra parte, AJ/ET actúan sinérgicamente para inducir la expresión de ciertos genes de defensa tales como defensinas y proteínas relacionadas con la patogenicidad en la regulación de diferentes respuestas a estrés. Por ejemplo,

cuando la planta se encuentra bajo exposición por ozono, ET es necesario para el desarrollo de lesiones, mientras que AJ limita el daño inducido por ozono, o por heridas (mecánicas o bióticas) y desarrollo exagerado de la curvatura del hipocotilo (Devadas et al., 2002; Lorenzo y Solano, 2005; Zhang et al., 2011).

La selección de la respuesta más adecuada a cada uno de estos estímulos está determinada en parte por la interacción, positiva o negativa, que se establece entre estas dos rutas de señalización. Se ha reportado que la poca sensibilidad de ET da lugar a un aumento o disminución de la gravedad de la enfermedad dependiendo de la combinación planta-patógeno (O'Donnell et al., 2001). Se cree que una vía de señalización mediante AJ-ET es necesaria para inducir la resistencia de *Arabidopsis* a patógenos necrótrofos, tales como *Botrytis cinerea* y *Erwinia carotovora* (Anderson et al., 2004; Lorenzo y Solano, 2005).

II.4.3.1 Señalización por ácido jasmónico. Es un metabolito lipídico derivado del ácido linoleico, que actúa como molécula señalizadora de la respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés y participan en diversos procesos de desarrollo, entre los que destaca, como regulador en defensa a patógenos necrótrofos e insectos herbívoros (Lorenzo y Solano, 2005; Salgado, 2012).

La señalización dependiente de AJ se debe al incremento de su síntesis en respuesta al ataque de patógenos y consecuentemente a la alta expresión de genes de defensa como PDF1.2 (defensina). Mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la síntesis de AJ, exhiben una marcada susceptibilidad a patógenos necrótrofos, como los hongos *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* o *Phyitium* sp. y a bacterias, como *Erwinia carotovora* (Leyva, 2008).

El gen PDF1.2 de *Arabidopsis* es comúnmente usado como marcador para caracterizar la respuesta de defensa dependiente de AJ. En algunos casos el incremento de AJ puede ser acompañada por el incremento de etileno (ET) (Glazebrook et al., 2005; Bari y Jones, 2009). La evidencia de que el AJ actúa en la señalización de defensa fue demostrada en tomate en respuesta al ataque

de herbívoros en donde se observó acumulación de inhibidores de proteasa y un aumento de su concentración (Turner et al., 2002).

II.4.3.2 Señalización por etileno. El etileno es una hormona gaseosa sintetizada como consecuencia del ataque de patógenos en interacciones compatibles e incompatibles. Además participa en el proceso de maduración de frutos climatéricos, como es el caso del tomate (Suslow y Cantwell, 2013)

El etileno se sintetiza a partir de la metionina, que es convertida a S-adenosilmetionina por la S-AdoMet sintasa (ADS). La S-adenosil-metionina es una molécula donadora de grupos metilo en plantas y está implicada en reacciones de metilación, tanto de lípidos, como de proteínas y de ácidos nucleicos. La S-adenosil-metionina es convertida en 5'-metiltioadenosina por la enzima ACC sintasa (ACS) y a través del ciclo de Yang, vuelve a producir metionina y ácido 1-aminociclopropano (ACC), un ácido carboxílico precursor del etileno. El ACC es oxidado por la ACC oxidasa (ACO) dando lugar a etileno, cianuro y dióxido de carbono. La conversión llevada a cabo por la ACS se considera la etapa limitante del proceso de síntesis (Leyva, 2008).

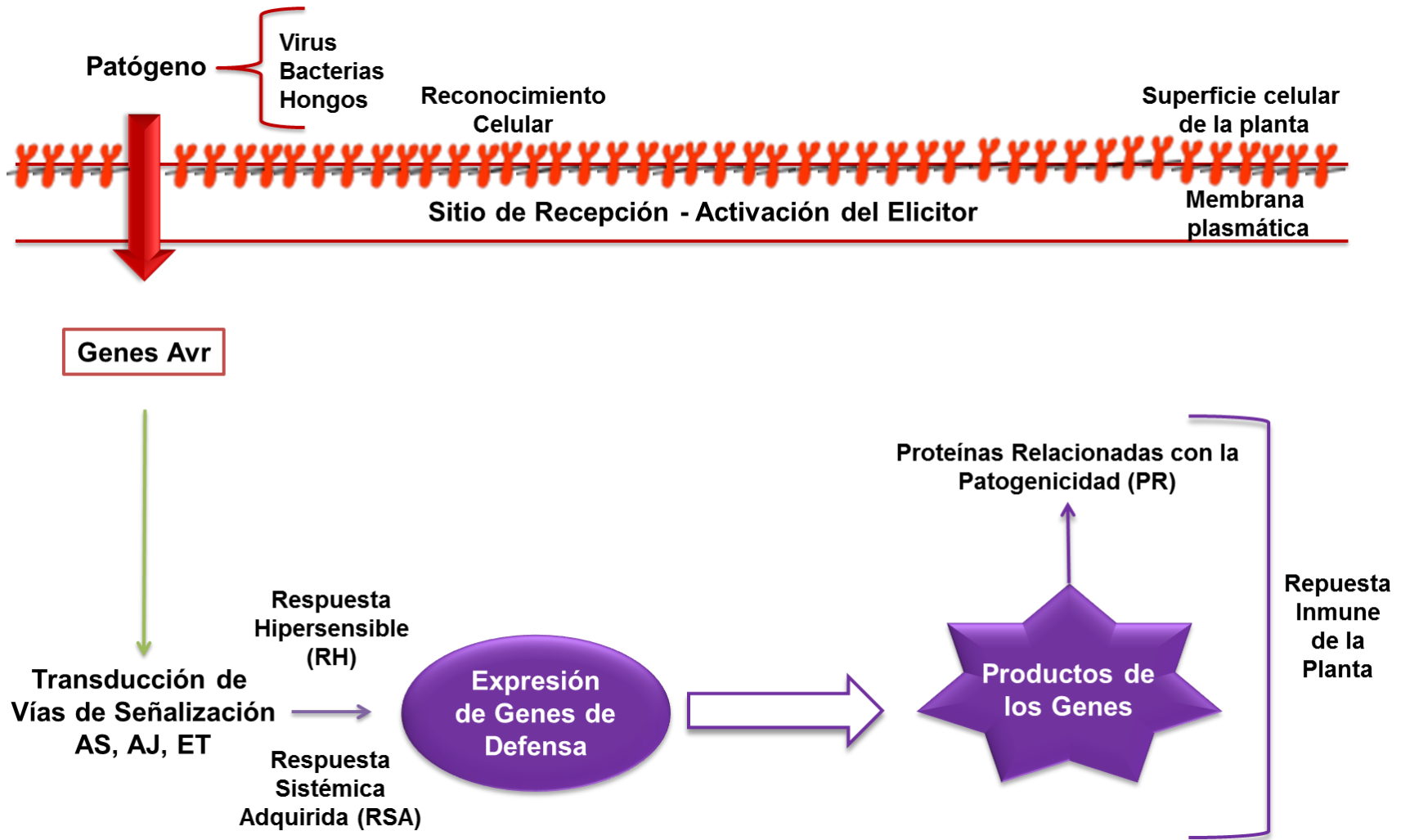


Figura 2. Activación del mecanismo de defensa en respuesta a la interacción planta-patógeno (Salgado, 2012).

Uno de los primeros efectos de la señalización del etileno es una alteración de la expresión de varios genes. El etileno induce la síntesis de ARNm de numerosos genes, como los genes que codifican la celulasa, así como genes relacionados con la maduración y genes de la biosíntesis del etileno. Se han identificado las secuencias específicas en los promotores de los genes regulados por etileno, llamadas elementos de respuesta al etileno (EREs) (Taiz y Zeiger, 2007).

## II.5 Factores de Transcripción

La activación de las respuestas de defensa de las plantas a través de PMAPs / MAMPs se da por efecto de las vías de transducción de señales, éstas se inician con la percepción de la señal de estrés y en parte inducen una serie de factores de transcripción que controlan la expresión de genes cuyos productos contribuyen a proteger y reparar las células del daño causado por el estrés (Mejía-Teniente et al., 2010). El estudio de genes que codifican para estos factores de transcripción constituye un enfoque muy efectivo para producir plantas tolerantes al estrés, ya que un solo gen puede alterar la expresión de un gran número de genes, dando como resultado una respuesta mucho más amplia y eficaz (García y Capiati, 2011).

### II.5.1 Factor de Transcripción Regulados por AJ

Los mecanismos del camino de traducción de señal por AJ no son bien entendidos. Usando *Arabidopsis* se han realizado varias investigaciones para descubrir mutantes en componentes de la ruta de señalización por AJ (Jordán y Casaretto, 2006).



Uno de los genes de defensa que se activa mediante la ruta de señalización por AJ, es el *a coi1* (mutante de *Arabidopsis*), cuyo locus codifica a una proteína involucrada en la degradación de proteínas por el proteosoma, lo que sugiere a este mecanismo como una forma de regulación de la señalización de AJ. Este mecanismo ha sido demostrado con los patógenos *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicota* y el pulgón *Myzus persicae* (Ellis et al., 2002; Xu et al., 2002).

Otro mutante de *Arabidopsis*, *mpk4* presenta reducida expresión por metil jasmonato (MeJA) de los genes PDF1.2 y THI2.1 que codifican para una defensina y tionina, respectivamente. No obstante, este mutante expresa en forma constitutiva genes de defensa PR (relacionados con patogénesis) y que normalmente son inducidos por ácido salicílico (Petersen et al., 2000).

Por otro lado, MYC2, miembro de la familia de represores transcripcionales JAZ, es un regulador transcripcional de la señalización mediada por AJ, reprimiendo la respuesta defensiva frente a patógenos necrótrofos (regulando la expresión de PDF1.2). Además, activa las respuestas a estrés oxidativo, a la herida o al ataque de insectos, en las que además está involucrado el etileno (Chini et al., 2007; Dombrecht et al., 2007; Lorenzo et al., 2004; McGrath et al., 2005).

## **II.5.2 Factor de Transcripción Regulado por ET**

Los componentes clave que median los efectos del etileno en la expresión génica son la familia de los factores de transcripción EIN3. Hay al menos cuatro genes similares a EIN3 en *Arabidopsis* y se han identificado homólogos en tomate y tabaco. En respuesta a una señal de etileno, los homodímeros de EIN3 o sus parálogos (proteínas estrechamente relacionadas), se unen al promotor de un gen llamado ERF1 (factor de respuesta al etileno 1) y se activa su transcripción (Jia et al., 2013).

ERF1 es un elemento importante en la activación de los mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos necrótrofos además de regular *in vivo* la expresión de genes de defensa. ERF1 codifica una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción llamadas proteínas de unión al ERE (EREBP), que fueron identificadas inicialmente en tabaco como proteínas que se unían a secuencias ERE. Varios EREBP se inducen rápidamente en respuesta al etileno (Solano et al., 1998; Ju et al., 2012).

El etileno en las plantas activa genes como EIN2 que codifica una proteína integral de membrana que interacciona con la proteína CTR1 (cinasa) cuya función es de regulación negativa. La desrepresión de EIN2 por parte de CTR1 induce la activación a su vez de factores de transcripción presentes en el núcleo que inducen la expresión de genes dependientes de ET como PDF1.2 (Ju et al., 2012).

El factor de respuesta a etileno de tomate está codificado por el gen SIERF1. Se compone de 204 aminoácidos y pertenece al subgrupo ERF1 de la familia AP2/ERF. La proteína SIERF1 tiene un dominio altamente conservado compuesto de 58 aminoácidos. Este dominio se une específicamente al motivo GCC (un elemento cis presente en el promotor de algunos genes de defensa y sensibles al etileno) para regular la expresión de genes reprimidos (Zhang et al., 2005). La expresión de SIERF1 no sólo interviene positivamente en los procesos de desarrollo de la planta, de maduración del fruto y de ablandamiento en el tomate (Li et al., 2007), sino también da una mayor resistencia al estrés osmótico (Lu et al., 2011). Se ha reportado que SIERF1 juega un papel importante en la respuesta inducida por etileno y en las vías de defensa de estrés abiótico (Pan et al., 2013)

## II.6 Elicitores

Los elicitores son moléculas estables de bajo peso molecular que inducen la respuesta de defensa inmune en plantas. Son sintetizados o liberados a partir de precursores poliméricos durante la infección y son reconocidos en la planta por un receptor (proteína), el cual activa la expresión de genes de defensa. Existen dos grupos de elicitores, bióticos y abióticos, donde aquellas moléculas naturales o bióticas proceden de tejido aislado de la planta (elicitores endógenos) o de aislados del fitopatógeno (elicitores exógenos) y son capaces de inducir respuestas estructurales y/o bioquímicas asociadas a la resistencia de la planta frente al organismo que la ataca. Por otro lado, se les denomina elicitores abióticos a todos aquellos inductores químicos y físicos como iones de metales pesados, inhibidores de ciertas etapas metabólicas, radiación UV, algunos antibióticos y fungicidas (Radman et al., 2003; Terry y Joyce, 2004; Teniente-Mejía et al., 2010).

Los inductores químicos modifican la interacción planta-patógeno de manera que se asemeja a una interacción incompatible con los mecanismos relacionados con la defensa inducida antes o después de la exposición. La mayoría de las investigaciones se han enfocado hacia activadores químicos en enfermedades pre-cosecha. Sin embargo, los elicitores químicos aplicados antes y/o después de la cosecha también han demostrado mejorar o mantener la respuesta natural de defensa (RND) en un gran número de cultivos hortícolas cosechados (Terry y Joyce, 2004).

La inducción de la RND en cultivos hortícolas utilizando inductores físicos ha recibido una atención creciente en los últimos años. El principal modo de acción de muchos inductores físicos es la desinfección de los productos. Por lo tanto, las infecciones causadas por esporas y/o micelio de hongos sobre las capas celulares en frutas y hortalizas se eliminan y/o son destruidos (Terry y Joyce, 2004).

Los elicitores abióticos inducen la respuesta de defensa en la planta cuando son administrados en dosis relativamente altas, en comparación a los inductores o elicitores bióticos los cuales son activos a dosis muy bajas. Cuando se aplican, no causan síntomas de estrés o acumulación de compuestos tóxicos que sensibilicen al tejido de la planta, por el contrario, mejoran su resistencia a infecciones posteriores (Teniente-Mejía et al., 2010).

### **II.6.1 Bioelicitores**

Actualmente se conocen diferentes elicitores biológicos que incluyen: glucósidos; oligosacáridos procedentes de hongos fitopatógenos como los glucanos o los derivados de la quitina, o los derivados de la pared celular de la planta como el xilano (Hurlbert y Preston, 2001); glicoproteínas (Wendehenne et al., 1995); péptidos (Nurnberger et al., 1994), ácidos grasos (Mikeš et al., 1997; Kashulin, 2000), entre otros.

Diversos microorganismos antagónicos son capaces de inducir reacciones de defensa en el tejido huésped. Algunos inductores bióticos y extractos biológicos, como extractos de pared celular de levaduras, pueden incrementar las reacciones de defensa en plantas y en frutos como manzana (de Capdeville et al., 2003), zanahorias (Mercier et al., 2000), toronja (Droby et al., 2002), pera (Tian et al., 2006), entre otras. Asimismo se han utilizado extensivamente fragmentos de pared celular fúngico para inducir la activación de los genes de defensa que se expresan durante las interacciones planta-patógeno. Además, se ha reportado el uso de cepas no virulentas de microorganismos saprófitos o patogénicos que inducen la resistencia sistémica adquirida en el tejido vegetativo hospedero y en frutos postcosecha (Egusa et al., 2008).

II.6.1.1 Aplicación de bioelicitores en frutos. Los bioelicitores de origen vegetal o microbiano son capaces de inducir reacciones de defensa en el tejido huésped (Nel et al., 2006).

En plantas se ha demostrado ampliamente la activación de genes de defensa mediante la utilización de bioelicitores; sin embargo, la información publicada sobre el efecto de estas biomoléculas en la activación de genes en frutos es muy limitada. Tal es el caso del estudio publicado por Sánchez-Estrada et al., en el 2009, donde encuentran la se activación de enzimas y compuestos fenólicos relacionados con la defensa natural en fruto de melón, por medio de un elicitador fúngico con el cual se estimuló la respuesta de defensa natural e indujo resistencia contra *F. oxysporum*.

Por otro lado, Troncoso-Rojas et al., en el 2013, evaluaron el efecto de un elicitador fúngico enriquecido con tejido de vegetal en el metabolismo de fenilpropanoides y la resistencia contra la pudrición de *Fusarium* spp, obteniendo como resultados un aumento de la síntesis de compuestos fenilpropanoides, incluyendo el ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido vanílico, naringina-7-O-glucósido, rutina y kaempferol-3-glucósido, además una reducción en el desarrollo de la pudrición por *Fusarium* spp en tomate durante el almacenamiento a 20° C, concluyendo que la vía de fenilpropanoide es parte de la respuesta de defensa en el fruto del tomate.

De Capdeville et al., en el 2003, evaluaron la capacidad de Hairpin (proteína de la bacteria *Erwinia amylovora*) para inducir resistencia al moho azul causado por *Penicillium expansum* en fruto de manzana durante postcosecha. Se encontró que la expresión de los genes PR es uno de los mecanismos por los que actúa el Hairpin en manzanas, inhibiendo así el ataque del hongo.

La expresión de los genes de defensa del fruto varía considerablemente de acuerdo al patógeno, y/o a los elicitores biológicos, por lo que los frutos pueden generar una gran cantidad de respuestas de defensa.

### III. HIPÓTESIS

Los bioelicitors derivados del cultivo de *Alternaria alternata* con tejido vegetal inducen la expresión de genes de defensa en fruto de tomate.

## IV. OBJETIVO

Evaluar el efecto del bioelicitador obtenido *Alternaria alternata* enriquecido con tejido vegetal sobre la expresión de genes que codifican para las enzimas de defensa quitinasa y peroxidasa, así como el factor de transcripción SIERF1 en fruto de tomate.

### IV.1 Objetivos Específicos

1. Elaborar el bioelicitador a partir de *Alternaria alternata* con tejido vegetal.
2. Cuantificar los cambios en el nivel de expresión de los genes en fruto de tomate que codifican a las proteínas quitinasa y peroxidasa, así como el factor de transcripción SIERF1, producidos por efecto del bioelicitador bajo diferentes tratamientos.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1 Materia Prima

Se utilizó fruto de tomate tipo bola variedad Estrella originario de Culiacán, Sinaloa, México. Fue seleccionado por tamaño, peso, color y libre de daños visuales. Se determinó la producción de etileno y CO<sub>2</sub> para establecer el estado de madurez de los frutos, mediante un cromatógrafo de gases Varian Star 3400, dotado de un detector de conductividad térmica para la cuantificación del CO<sub>2</sub> y de ionización de llama para la cuantificación de etileno (Agilent Technologies, Walnut Creek, CA).

### V.2 Preparación del Bioelicitor

Se aisló *Alternaria alternata* del fruto de tomate comercial, en agar papa dextrosa (PDA). Las características de las colonias y esporas de *Alternaria alternata* fueron analizadas y confirmadas de acuerdo a Pryor y Michailides (2002). El bioelicitor se preparó de acuerdo a la metodología reportada por Sánchez-Estrada y colaboradores (2009). Se cortaron círculos de aproximadamente 1 cm de diámetro de los márgenes de una colonia de *A. alternata* de 7 días de crecimiento.



Se agregaron al caldo papa dextrosa y se adicionó pericarpio de fruto de tomate liofilizado a una concentración de 12 g/L, se mantuvieron en agitación constante en un agitador orbital (Lab-Line Instruments modelo 3527), a 22°C por 7 días. Después de este tiempo se esterilizó a 121°C, 15 lb de presión, se filtró con papel whatman #1, se secó en una estufa a 65°C por 24 h y, se molió en un molino de café (KitchenAid, modelo. BCG111OB) hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Por último, se disolvió en agua destilada para obtener dos concentraciones: 0.2 g/L y 2 g/L (Troncoso-Rojas et al., 2013).

### V.3 Aplicación del Bioelictor

Los frutos de tomate se desinfectaron con NaClO a 200 ppm, se lavaron con agua destilada y se dividieron en tres lotes. Dos de los lotes fueron aplicados con el bioelictor por aspersion, a las concentraciones de 0.2 g/L y 2 g/L, respectivamente. El tercer lote fue tratado con agua estéril, considerándose éste como testigo. Los frutos se colocaron a 20°C y se tomó una muestra de 3 frutos por cada tratamiento a diferentes tiempos: 0, 0.5, 2, 4, 6, y 24 horas. Se tomó el pericarpio de cada fruto, se cortó en trozos pequeños y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

### V.4 Extracción de ARN Total

Se siguió el protocolo propuesto López-Gómez y Gómez-Lim (1992) con algunas modificaciones. Se tomó 1 g de pericarpio de tomate congelado con N<sub>2</sub> líquido y pulverizado, se le añadió 1 mL de buffer de extracción (2% SDS, 1% β-mercaptoetanol, EDTA 50 mM, y tris-base 150 mM con un pH de 7.5 ajustado con ácido bórico 1 M) y se agitó vigorosamente en vortex por 1 min. Se añadió inmediatamente etanol frío y se agitó en vortex por 40 s. Se agregó acetato de

potasio 5M y se agitó vigorosamente en vortex por 1 min. Se añadió cloroformo-alcohol isoamílico 49:1 y se agitó por 15 s (no vortex). Se centrifugó por 20 min a 20, 000 x *g* a 4°C. Se recuperó la fase acuosa, se agregó fenol-cloroformo 1:1 y se centrifugó por 10 min a 12,000 x *g* a 4°C. Posteriormente se recuperó la fase acuosa, se agregó cloroformo-alcohol isoamílico 49:1 y se centrifugó por 10 min a 12,000 x *g* a 4°C. A la fase acuosa se le agregó LiCl 3M y se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó por 20 min a 20, 000 x *g* a 4°C y se realizó un lavado con etanol frío al 75%. Finalmente se re suspendió el pellet con 30 µL de agua DEPC.

Se determinó la concentración y pureza del ARN total por espectrofotometría, utilizando un equipo Nano Drop 1000 (Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en ng/µL. Asimismo, se determinó la pureza en el NanoDrop 1000 en base a la relación 260/280. Se evaluó la integridad (calidad) del ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) como solución amortiguadora, GelRed como colorante de bandas y Blue/Orange como buffer de carga; a 40 V por 1 h, en una cámara de electroforesis modelo Enduro. Los geles fueron visualizados mediante un sistema fotodocumentador Bio-Rad. El ARN total aislado se almacenó a -80°C para sus análisis posteriores.

## V.5 Síntesis de ADNc

Para evaluar la expresión de los genes que codifican para las enzimas peroxidasa, quitinasa y el factor de transcripción SIERF 1, se procedió como primer paso a la síntesis de la cadena complementaria (ADNc), utilizando el kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) y el kit RQ1 RNase-Free DNase de la casa comercial Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. El protocolo consistió en añadir a la muestra resuspendida de ARN total, 1 µL RQ1 DNasa 10x buffer, 1 µL RQ1 DNasa,

0.25  $\mu\text{L}$  RNasaOUT (Invitrogen), 0.1  $\mu\text{L}$  DTT y se llevó a 10  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas. Posteriormente se incubó a 37°C por 30 min. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de la solución RQ1 DNasa (stop solution). Se incubó a 65°C por 10 min y se tomaron 3  $\mu\text{L}$  para comprobar que la muestra se encontraba libre de ADN genómico.

Se tomaron 8  $\mu\text{L}$  de ARN total (200 ng aproximadamente) y se le añadió 1  $\mu\text{L}$  de Oligo dT, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (10mM) y un 1  $\mu\text{L}$  de los oligonucleótidos antisentido específicos para los genes de interés, ésto último para aumentar la eficiencia de amplificación de los genes específicos, según lo reportado por Feng y colaboradores (2012). Se incubó a 65°C por 5 min. y se colocó en hielo por 1 min. Posteriormente se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de buffer RT 10x, 1 $\mu\text{L}$  de RNasaOUT y 19  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas. Se agitó suavemente, se centrifugó brevemente y se incubó a 42°C por 2 min. Se le añadió 1  $\mu\text{L}$  de enzima transcriptasa reversa MMLV-RT (SuperScript™ II, 200U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen, USA). Se mezcló e incubó a 42°C durante 50 min, posteriormente a 70°C por 15 min. Se colocó en hielo y centrifugó brevemente. Se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de RNasa H y se incubó a 37°C por 20 min.

El ADNc sintetizado se cuantificó por espectrofotometría, utilizando un equipo Nano Drop 1000. Para comprobar la síntesis de ADNc se realizó una amplificación por PCR a las siguientes condiciones: etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 4 min, seguido por 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C, y extensión final a 72°C por 10 min, con 40 ciclos. Los productos de PCR fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, con el cual se evaluó la calidad de la síntesis del ADNc, utilizando TBE (Tris-Borato-EDTA) como solución amortiguadora, GelRed como colorante de bandas y Blue/Orange como buffer de carga; a 80 V por 40 min, en una cámara de electroforesis modelo Enduro. Los geles fueron visualizados mediante un sistema fotodocumentador Bio-Rad. El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C para su posterior uso.

## V.6 Cuantificación de los Niveles de Expresión Génica

Se realizó un análisis de expresión relativa por PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el kit comercial iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD), utilizando un termociclador StepOne Real time PCR System (Applied Biosystems). Se utilizaron 5 µL de ADNc como templado, y se mezclaron con 10 µL de la mezcla master mix SYBR Green 2x, 1 µL de una mezcla conteniendo los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos (500nM), ajustado a un volumen de 20 µL con agua libre de nucleasas.

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron tomados de estudios publicados por otros autores. Los oligonucleótidos amplifican fragmentos de tamaño similar a los genes que codifican para las proteínas de defensa quitinasa (Chi1, Pan et al., 2013), peroxidasa (POD, Upadhyay et al., 2014) y el factor de transcripción SIERF1 (Pan et al., 2013), así como los genes constitutivos ubiquitina (Ub3) y TIP41. Se realizó un análisis de PCR *in silico* para determinar si cumplían con las características recomendadas, como el tamaño del amplicón, %CG y TM (Cuadro 1).

Para cada par de oligonucleótidos se realizó una prueba de rangos dinámicos de acuerdo al protocolo reportado por Nolan et al., (2006). Se utilizó una dilución seriada (1:5) a partir de 100 ng del ADNc sintetizado de cada una de las muestras tomadas de los frutos aplicados o no con los bioelicitores y a los distintos tiempos evaluados. Se determinó la eficiencia de amplificación graficando el logaritmo de la concentración de ADNc contra el Ct de la amplificación. La eficiencia de amplificación se calculó a partir de la pendiente de la gráfica, de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Life Technologies). Las condiciones para la amplificación fueron: 2 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de: 15 s a 95 °C y 60s a 60 °C.

La cuantificación relativa de los transcritos se determinó de acuerdo al método descrito por Livak y Schmittgen (2001), mediante la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . El método consta de una comparación relativa entre un gen constitutivo y el blanco. Para esta prueba se analizaron dos repeticiones por tratamiento. Finalmente, se efectuó una corrección logarítmica (Rieu, 2009) para normalizar los datos de expresión relativa antes del análisis de varianza.

## V.7 Análisis Estadístico

El diseño experimental para este trabajo fue completamente al azar con arreglo factorial 3X6, donde las variables independientes fueron: (A) la concentración del bioelicitor y (B) los tiempos de muestreo. La expresión de genes de defensa fue la única variable dependiente. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 5%. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey-Kramer. Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico NCSS versión 2010.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de genes de defensa por PCR en tiempo real.

Gen	Sentido	Secuencia	Bases	Autor
SIERF1	Fw	5'-TTAGGCACTTTTGAGACAGCAGA-3'	24	Pan et al., 2013
	Rv	5'-AAGATGTTTGTGGCATGTTTGG-3'	22	
POD	Fw	5'-TGGAGGTCCAACATGGCAAGTTCT-3'	24	Upadhyay et al., 2014
	Rv	5'-TGCCACATCTTGCCCTTCCAAATG-3'	24	
Chi1	Fw	5'-TGAGAGAATACTTGTGCATCGAAA-3'	24	Pan et al., 2013
	Rv	5'-TGACAATATCTCCTATAGAACCCA-3'	24	
Ubi3	Fw	5'-ACACCATCGACAATGTGAAAGCCA-3'	24	Pan et al., 2013
	Rv	5'-TCAATCGCCTCCAGCCTTGTTGTA-3'	24	
TIP41	Fw	5'-GCTGCGTTTCTGGCTTAGG-3'	19	Expósito- Rodríguez et al., 2008
	Rv	5'-ATGGAGTTTTGAGTCTTCTGC-3'	22	

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI.1 Estado de Madurez del Fruto de Tomate

Los frutos de tomate utilizados en el presente estudio mostraron a 20°C una velocidad de producción de etileno y de CO<sub>2</sub> de 5.80 µl/kg-hr y 18.20 ml/kg-hr, respectivamente, valores que corresponden a un estado de madurez rojo claro. Estos resultados coinciden con el estudio reportado por Suslow y Cantwell, (2013) quienes obtuvieron una concentración de 4.3 a 4.9 µl/kg-hr para etileno y de 14 a 20 ml/kg-hr para CO<sub>2</sub>, por lo que concluyeron que el fruto de tomate se encontraba en el estado de madurez 4 (Figura 3). En esta etapa de maduración, el fruto es susceptible a ser infectado por patógenos, pero también es capaz de activar su mecanismo de defensa para contrarrestar el ataque microbiano, a través de enzimas de defensa, o bien la síntesis de metabolitos con actividad antimicrobiana (Prusky et al., 2013).

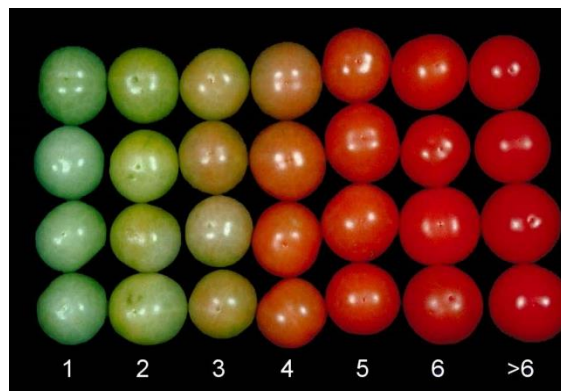


Figura 3. Estado de madurez del fruto de tomate, (Suslow y Cantwell, 2013).

## VI.2 ARN Total y Síntesis de ADNc

Los frutos de tomate expuestos o no al bioelicitor y analizados a distintos tiempos posteriores a la exposición, presentaron un contenido de ARN total entre 6.17 y 10.11  $\mu\text{g/g}$ . Wang y colaboradores (2009) reportaron valores de ARN total en un rango de 15 a 34  $\mu\text{g/g}$  peso fresco para fruto de tomate, los cuales son similares a los encontrados en este trabajo.

La concentración de ácidos nucleicos se determina a 260 nm comparada contra un blanco, y dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente 260/280 para calcular la pureza del ARN total. Un ARN total puro presenta una relación aproximada a 2.0, aunque si presenta una relación de 1.8 se considera aceptable (Rojas et al., 2011; Rienth et al., 2014). Otro indicador de la presencia de impurezas, es la lectura a 230 nm, que corresponde a la presencia de hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. El cociente 260/230 de un ARN puro es de 2.2 aproximadamente (Rojas et al., 2011).

En este trabajo, la relación de absorbancias a 260/280 fue de 1.80 a 2.14 y a 260/230 de 1.80 a 2.29, por lo que se considera una muestra libre de contaminantes. Sin embargo, los valores por arriba de 2 y 2.2 en ambas relaciones se podrían deber a la precipitación por LiCl, un agente eficiente para precipitar de forma selectiva el ARN (Hernández Guzmán y Guzmán-Barney, 2013)

Una característica importante que indica un buen proceso de extracción de ARN total, pero además es un requisito indispensable para la síntesis de ADNc, es la evaluación de la integridad de ARN. Por lo anterior, se evaluaron las muestras de ARN extraído en un gel de agarosa al 1% bajo condiciones desnaturalizantes (buffer MOPS 1x), lo cual permitió observar bandas definidas para los fragmentos 28S y 18S del ARN ribosomal de la muestra de tomate (Figura 4),

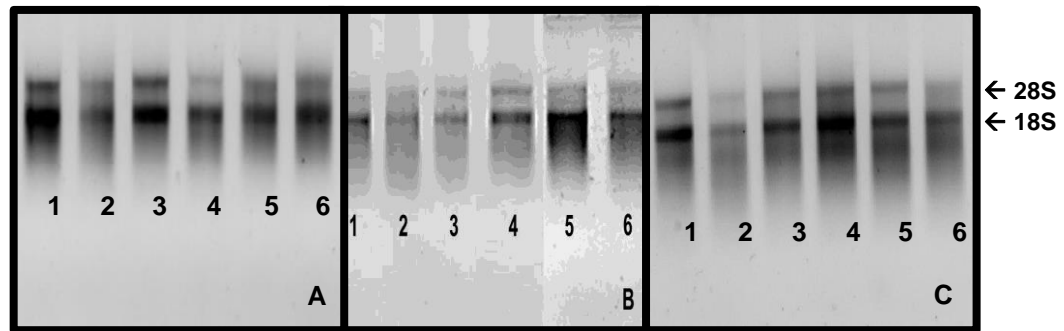


Figura 4. Análisis electroforético del ARN total extraído de frutos de tomate expuesto al bioelicitador, a diferentes tiempos. Tiempos de exposición: (1). 0 h, (2). 0.5 h, (3). 2 h, (4). 4 h, (5). 6 h y (6). 24 h. Concentración de bioelicitador: A) Testigo, B) 0.2 g/L y C) 2 g/L.

El ARN total se usó como molde para la síntesis de la primera cadena de ADN mediante la reacción de transcripción reversa (RT). Partiendo de 1 µg de ARN total, el rendimiento de la síntesis de ADNc fue de 8.78 a 17.49 µg. La relación de ~ 1.8 a una absorbancia de 260nm y 280 nm para ADNc es generalmente aceptable, lo que garantiza resultados más precisos en cuanto a pureza (NanoDrop Technologies, 2007). En el presente trabajo, la relación 260/280 nm obtenida fue de 1.70 a 1.80, lo que indica que se encuentra libre de contaminantes y es confiable a utilizar como templado para PCR en tiempo real (Rivas et al., 2011).

El proceso de síntesis de ADNc y el de eliminación de ADN genómico, fueron evaluados mediante una reacción de PCR. Al analizar el producto de PCR obtenido mediante un gel de agarosa al 2%, se observaron las bandas correspondientes al tamaño del amplicón esperado para cada gen (Figura 5), además no se observó amplificación en el ARN sometido al proceso de limpieza, por lo que esto indica un adecuado y eficiente proceso de síntesis de ADNc.



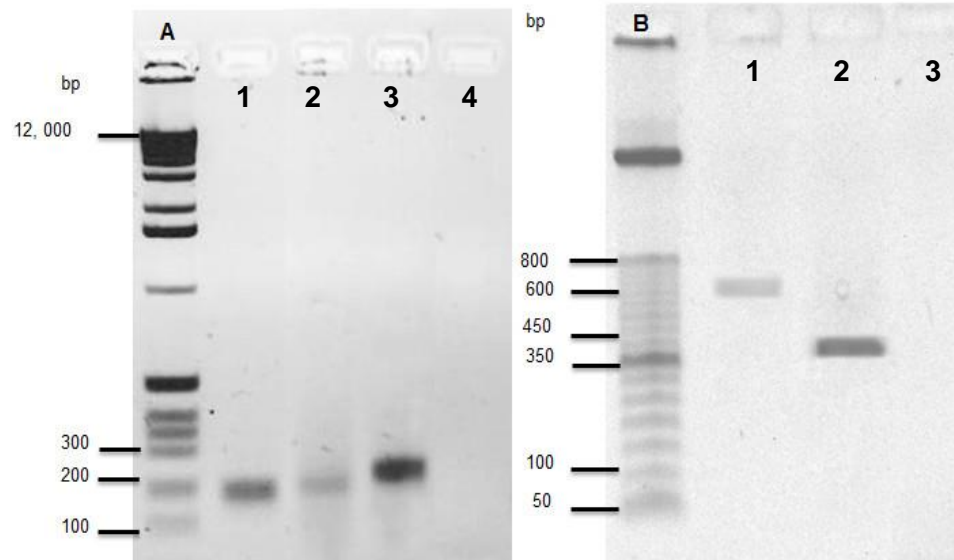


Figura 5. Análisis electroforético del ADNc. A) Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen); 1. SIERF1, 2. POD, 3. TIP41 y 4. Control negativo. B) Marcador de peso molecular 50 bp DNA Ladder (Invitrogen); 1. Chi, 2. Ubi y 3. Control negativo.

### VI.3 Análisis *in silico* de los Oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos específicos utilizados para cada uno de los genes evaluados en el presente trabajo, se tomaron de publicaciones recientes (SIERF1 y Chi1, Pan et al., 2013; Ubiquitina, Upadhyay et al., 2014; POD y TIP41, Expósito-Rodríguez et al., 2008). Las secuencias se enviaron a la base de datos de Sol Genomics Network (<http://solgenomic.net>) y mediante la técnica de PCR *in silico* se determinó el tamaño del amplicón para cada uno de los oligonucleótidos, observándose tamaños entre 122 y 639 pb (Cuadro 2). Estudios previos reportan que el tamaño del amplicón a detectar por medio de la técnica de PCR en tiempo real, debe de ser pequeño (entre 100-150 pb) para lograr una alta especificidad. Si los amplicones que se generan son grandes, la eficiencia de la reacción puede disminuir considerablemente (Tamay de Dios et al., 2013). Sin embargo, a pesar que el tamaño de ciertos amplicones usados en este trabajo fue mayor a lo recomendado, no se observó una disminución en

la especificidad, pero si se observaron porcentajes de eficiencia de la reacción mayores al 100%.

Por otro lado, los valores de %GC y de temperatura de hibridación (Tm) se encuentran próximos a lo recomendado por Thornton y Basu (2011), quienes reportan valores de %GC= ~50% y de Tm= 59-68°C (cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de PCR *in silico* de los oligonucleótidos específicos y de referencia.

Gen	Sentido	Secuencia	Bases	% GC	Tm (°C)	Tamaño Amplicón (pb)
SIERF1	Fw	5'- TTAGGCACTTTTGAGACAGCAGA-3'	24	45.8	57.2	122
	Rv	5'- AAGATGTTTGTGGCATGTTTGG -3'	22	40.9	54.5	
POD	Fw	5'-TGGAGGTCCAACATGGCAAGTTCT-3'	24	50.0	60.7	197
	Rv	5'-TGCCACATCTTGCCCTTCCAAATG-3'	24	50.0	60.3	
Chi1	Fw	5'-TGAGAGAATACTTGTGCATCGAAA-3'	24	37.5	54.3	639
	Rv	5'-TGACAATATCTCCTATAGAACCCA-3'	24	37.5	2.6	
Ubi3	Fw	5'-ACACCATCGACAATGTGAAAGCCA -3'	24	45.8	59.2	410
	Rv	5'-TCAATCGCCTCCAGCCTTGTTGTA-3'	24	50.0	60.5	
TIP41	Fw	5'-GCTGCGTTTCTGGCTTAGG-3'	19	57.9	56.6	235
	Rv	5'-ATGGAGTTTTTGAGTCTTCTGC-3'	22	40.9	53.2	

% GC = Contenido de guanina y citosina

Tm = Temperatura de hibridación.

#### VI.4 Expresión Relativa de los Genes que Codifican para POD, Chi y SIERF1

La expresión de los genes que codifican al factor de transcripción SIERF1 y las enzimas de defensa peroxidasa y quitinasa, se determinó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando el fluoróforo SYBR Green, y se calculó de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  reportado por Livak y

Schmittgen (2001). Se utilizaron como genes constitutivos la ubiquitina (Ubi3) y a TIP41.

Los resultados de la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos se presentan en el Cuadro 3. Se puede observar que en casi todos los casos la eficiencia de amplificación estuvo dentro del rango de 90-110%, con excepción del gen constitutivo TIP41, cuya eficiencia fue de 115%. De los dos genes constitutivos evaluados, la ubiquitina presentó los valores de Ct más constantes durante el desarrollo del estudio, por lo que este gen se utilizó como normalizador en el proceso de cuantificación de la expresión de los genes específicos.

Cuadro 3. Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos específicos y genes de referencia.

Gen	Eficiencia (%)
Quitinasa	99.31
Peroxidasa	103.03
SIERF1	104
Ubiquitina	108.21
TIP41	115

Los resultados del análisis de expresión relativa del gen que codifica para la enzima quitinasa en frutos de tomate expuestos al bioelicitor durante 24 horas se presentan en la Figura 6. Se puede observar un efecto del bioelicitor en los niveles de expresión génica. La aplicación de una concentración de 2 g/L causó un incremento ( $p < 0.05$ ) en la expresión de Chi1 en frutos de tomate expuestos por 0.5 y 24 horas, incremento que fue 2.97 y 2.12 veces respectivamente, mayor con respecto al testigo al tiempo 0. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la expresión de este gen en tomates expuestos al bioelicitor a ambas concentraciones con respecto al testigo ni durante los

tiempos de exposición 2, 4 y 6 h (cuadro 4). Estos resultados coinciden con estudios previamente publicados, descritos a continuación.

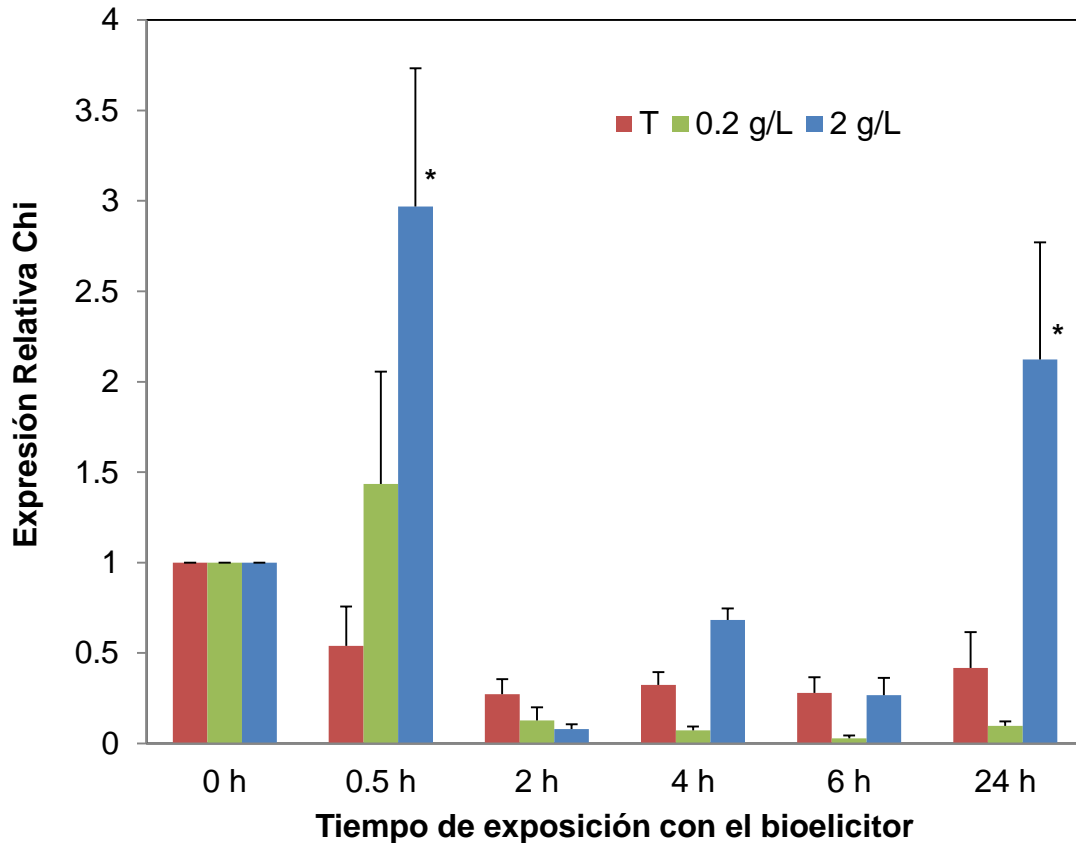


Figura 6. Expresión relativa del gen que codifica para quitinasa en fruto de tomate. T= Testigo; concentración de bioelicitor= 0.2 g/L y 2 g/L. Se presenta la media  $\pm$  error estándar. \* Diferencia significativa por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los datos fueron calculados según la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

Recientemente, Uma y colaboradores (2014) realizaron un estudio en el cual evaluaron el efecto de la infección por *Magnaporthe grisea* y *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* sobre la expresión génica en tomate. Los autores observaron que el hongo *A. alternata* indujo una expresión del transcrito que codifica para quitinasa de 3.35 a 4.87 veces. La quitinasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de quitina, uno de los componentes mayoritarios de la pared celular de los hongos. Generalmente, la quitinasa presenta bajos niveles de expresión en

las células vegetales y se acumula en respuesta al ataque fúngico (Veronese et al., 2003; Cota et al., 2006).

El aumento en el nivel de expresión del transcrito que codifica para la quitinasa observado en el presente estudio, puede ser en respuesta a los fragmentos de pared celular del hongo contenidos en el bioelicitor y que fueron asperjados sobre la superficie del tomate. Asimismo, debido a que el hongo fue cultivado en presencia de tejidos de fruto, es muy probable que haya desarrollado las estructuras que requiere para llevar a cabo la infección, por lo que la presencia de estas estructuras probablemente también influyó en la activación del mecanismo de defensa del fruto.

En la Figura 7, se presenta la expresión relativa del gen que codifica para la enzima POD en tomates expuestos al bioelicitor durante 24 horas. Los resultados muestran una reducida expresión durante las primeras 2 horas post-tratamiento, no hubo diferencias significativas en la expresión al exponer los frutos al bioelicitor a ambas concentraciones con respecto al testigo. Sin embargo, a las 4 horas posteriores a la exposición del bioelicitor a una concentración de 2 g/L, se registró un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la expresión génica, observándose una expresión 10 veces mayor con respecto al testigo al tiempo 0. Posteriormente, los niveles de expresión fueron bajos a las 6 y 24 horas, sin diferencias significativas entre tratamientos, lo cual podría sugerir que el transcrito fue degradado después de que se realizó la síntesis de la proteína.

Se ha propuesto que las peroxidasas juegan un papel en la regulación del crecimiento del fruto debido a que las peroxidasas pueden estar involucradas en el incremento de la rigidez de las paredes celulares de la fruta (Andrews et al., 2002). Asimismo, se ha reportado su participación en la producción de especies reactivas de oxígeno, los cuales están activos en las vías de señalización en el mecanismo de defensa de plantas (Laloi et al., 2004), en respuesta al estrés y ataque por patógenos (Cosio y Dunand, 2009). Wang y colaboradores (2015) evaluaron la expresión de 4 genes que codifican a

peroxidasa en frutos de tomate. Los autores reportaron que la expresión del gen *LePrx09* fue altamente inducida en el mesocarpio del fruto, 2 h posteriores a la infección por *Alternaria solani*, sugiriendo que ese gen participa en la respuesta temprana al ataque por patógenos.

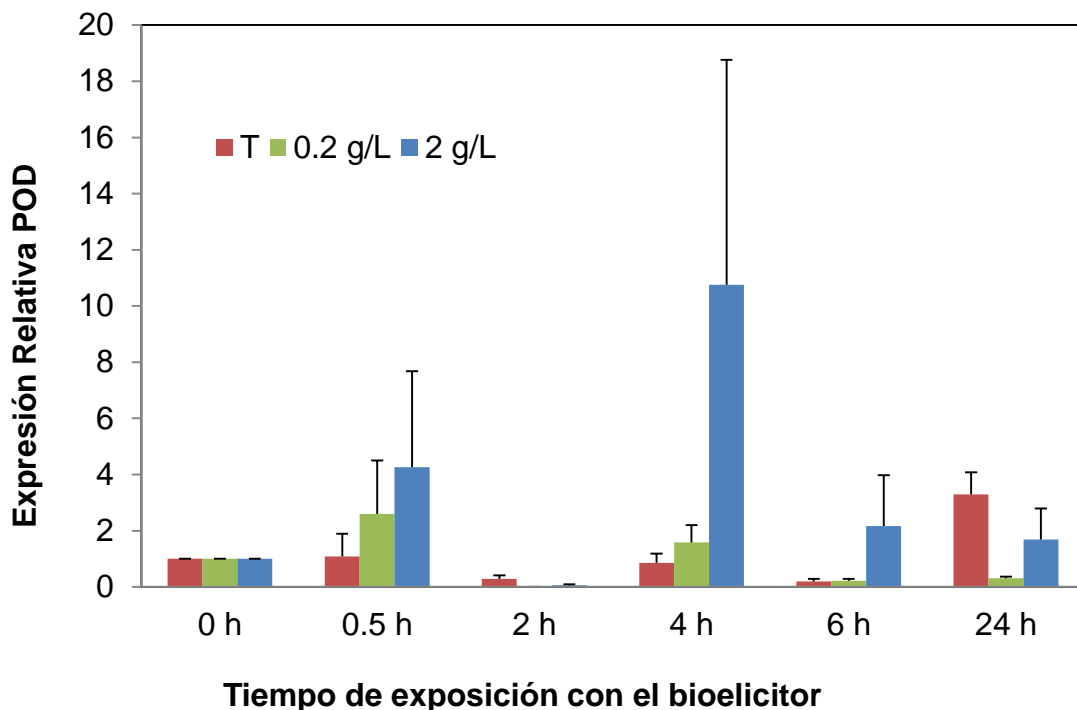


Figura 7. Expresión relativa del gen que codifica para peroxidasa normalizado con el gen constitutivo ubiquitina en fruto de tomate. T= Testigo; concentración de bioelicitor= 0.2 g/L y 2 g/L. Se presenta la media  $\pm$  error estándar. Los datos fueron calculados según la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

Por otra parte, Upadhyay y colaboradores (2012), evaluaron el efecto de la infección por *Alternaria solani* en la expresión de genes de defensa en dos genotipos de fruto de tomate (resistente y susceptible al tizón), donde se observó una represión génica con valores de -7.30 veces menos para el genotipo resistente y 1.8 veces más para el genotipo susceptible con respecto al testigo, a las 24 horas de inoculación. Estos datos sugieren que la peroxidasa no participa directamente en la defensa.

Los resultados de la expresión del transcrito que codifica al factor de transcripción SIERF1 en frutos de tomate expuestos al bioelicitor durante 24 horas, se presentan en la Figura 7. El análisis de varianza indicó diferencias significativas entre los diferentes tiempos de muestreo y tratamientos (Cuadro 4).

Como se puede apreciar en la Figura 8, al inicio del experimento se observó un bajo nivel de expresión. La aplicación del bioelicitor a una concentración de 0.2 g/L indujo la expresión del transcrito que codifica al SIERF1, observándose un incremento de 25.45 veces la expresión del gen en los frutos después de 2 h de exposición. Posteriormente, se registró una disminución en la expresión génica, no existiendo diferencias significativas entre tratamientos después de las 4, 6 y 24 h de exposición.

En un estudio realizado en el cual inocularon frutos de tomate con el hongo necrótrofo *Rhizopus nigricans*, evaluaron la expresión del factor de transcripción SIERF1 y su participación en la regulación de los mecanismos de resistencia contra patógenos postcosecha. Los autores reportaron que la expresión relativa del gen que codifica a SIERF1 fue de 8 veces mayor en comparación con los frutos testigo. La expresión de este gen indujo además un incremento en los niveles de transcrito que codifican para enzimas de defensa, como la quitinasa (Chi1), cuyo nivel de expresión fue mayor a lo esperado, aunque no se especifican los valores encontrados. Los autores sugieren que SIERF1 aumenta la resistencia contra patógenos a través de la regulación positiva de los genes de defensa (Pan et al., 2013).

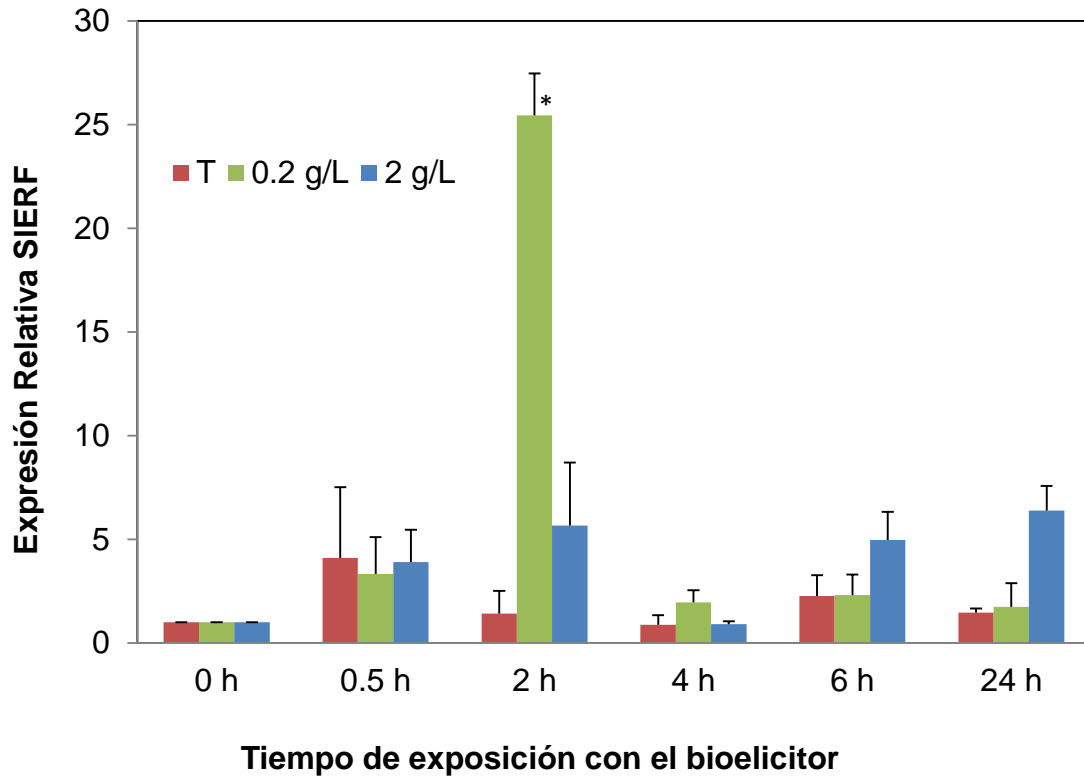


Figura 8. Expresión relativa del gen que codifica para el factor de transcripción SIERF1 normalizado con el gen constitutivo ubiquitina en fruto de tomate. T= Testigo; concentración de bioelicitor= 0.2 g/L y 2 g/L. Se presenta la media  $\pm$  error estándar. \* Diferencia significativa por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los datos fueron evaluados según la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

En otro estudio realizado por Wang y colaboradores (2011), se evaluó el efecto del elicitor oligandrina, una proteína secretada por el hongo *Pythium* spp, sobre la expresión del factor de transcripción ERF2 y los genes de defensa  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa en fruto de tomate inoculados con *Botrytis cinerea*. Los autores observaron un incremento de 6.6 y 7.4 veces los niveles de expresión de ERF2 con respecto a los frutos testigo, a las 8 y 24 horas posteriores al tratamiento con oligandrina. Asimismo, observaron un incremento en la expresión de los genes de defensa, en donde la quitinasa registró 4.6 veces más la expresión con respecto al testigo, 24 horas posteriores al tratamiento.



Un elicitor biótico o bioelicitador, como ya se ha descrito anteriormente, puede inducir el mecanismo de defensa en plantas, así como también en fruto (Terry y Joyce, 2004; Sánchez-Estrada et al., 2009). Los resultados en este trabajo revelan una temprana activación por efecto del bioelicitador de la vía de señalización dependiente de etileno, y consecuentemente, una inducción del gen SIERF1, así como también, un aumento en la expresión de los genes que codifican para peroxidasa y quitinasa.

La expresión de los genes de defensa se han considerado como marcadores de la resistencia sistémica adquirida (Ward et al., 1991). Por lo que el incremento en la expresión de quitinasa y peroxidasa por efecto del bioelicitador, podría sugerir un incremento en la resistencia del fruto confiriéndole protección contra el ataque de patógenos en postcosecha.

## VII. CONCLUSIÓN

La aplicación del bioelicitador a una concentración de 0.2 g/L indujo una mayor expresión del gen que codifica para el factor de transcripción SIERF1 en tomate, con un tiempo de exposición de 2 h; mientras que los genes que codifican para quitinasa y peroxidasa presentaron una mayor expresión a las 0.5 y 4 h de exposición respectivamente, a la concentración de 2 g/L.

El bioelicitador obtenido de *A. alternata* enriquecido con tejido vegetal, indujo en forma inmediata la expresión de los genes que codifican para el factor de transcripción SIERF1 y para las enzimas relacionadas a la patogenicidad (quitinasa y peroxidasa), involucradas en el mecanismo de defensa natural en tomate.

## VIII. REFERENCIAS

- Abdelmallek, A.Y., Hemida, S.K. y Bagy, M.M.K. 1995. Studies on fungi associated with tomato fruits and effectiveness of some commercial fungicides against 3 pathogens. *Mycopathologia*, 130(2): 109-116.
- Almagro, L., Ros, L.G., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Barceló, A.R., y Pedreño, M. A. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*. 60(2): 377-390.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert y P.R., Kazan, K. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16:3460-3479.
- Andrews, J., Adams, S.R., Burton, K.S., y Evered, C.E. 2002. Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *Journal of experimental botany*. 53(378): 2185-2191.
- Arauz, L.F. 1998. Fitopatología, un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. Primera edición. San José. 519 pp.
- Baez-Flores, M. E., Troncoso-Rojas, R., Islas Osuna, M. A., Rivera Dominguez, M., Pryor, B., y Tiznado-Hernandez, M.E. 2011. Differentially expressed cDNAs in *Alternaria alternata* treated with 2-propenyl isothiocyanate. *Microbiological Research*. 166(7): 566-577.
- Bari, R., y Jones J.D.G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*. 69: 473-488.
- Benhamou, N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*. 1(7): 233-240.

- Blancard, D. 2011. Enfermedades del tomate. Identificar, conocer, controlar. Editores Mundi-Prensa Libros. Primera edición. Madrid. 679 pp
- Bravo, J.M., Ocampo, S., Murillo, I., Coca, M., y San, S.B. 2003. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of pathogenesis related protein 4 (PR-4) family of maize. *Plant Molecular Biology*. 52: 745-759.
- Camarena-Gutiérrez, G. 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 12: 25-30.
- Ceponis M.J., Cappellini R.A. y Lightner G.W. 1986. Disorders in tomato shipments to the New York Market, 1972-1984. *Plant Dis*. 70(3): 261-265
- Chini, A., Grant, J.J., Seki, M., Shinozaki, K., y Loake, G.J. 2004. Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *Plant Journal*. 38: 810-822.
- Chang, M.L., Chen, N.Y., Liao, L.J., Cho, C.L., y Liu, Z.H. 2012. Effect of cadmium on peroxidase isozyme activity in roots of two *Oryza sativa* cultivars. *Botanical Studies*. 53(1): 31-44.
- Cooper, G.M. 2007. *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press. Cuarta edición. Washington D.C. 129-132.
- Cosio, C., y Dunand, C. 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of experimental botany*. 60(2): 391-408.
- Cota, I.E., Troncoso-Rojas, R., Sotelo-Mundo, R., Sanchez-Estrada, A., y Tiznado-Hernandez, M.E. 2007. Chitinase and beta-1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Scientia Horticulturae*. 112(1): 42-50.
- Datta, S.K., y Muthukrishnan, S. 1999. *Pathogenesis-related proteins in plants*. Edit. CRC press. Primera edición. Boca Raton. 291 pp.

- De Capdeville G., Beer S.V., Watkins C.B., Wilson C.L., Tedeschi L.O., Aist, J.R. 2003. Pre- and post-harvest harping treatments of apples induces resistance to blue mold. *Plant Disease*. 87:39-44.
- Devadas, S.K., Enyedi, A., Raina, R. 2002. The *Arabidopsis* hrl1 mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *The Plant Journal*. 30: 467-480.
- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Servicio Agrícola Exterior. 2015.  
[http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Tomato%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_6-8-2015.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Tomato%20Annual_Mexico%20City_Mexico_6-8-2015.pdf)
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., y Kazan, K. 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 19: 2225-2245.
- Duroux, L., y Welinder, K.G. 2003. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *Journal of Molecular Evolution*. 57(4): 397-407.
- Durrant, W.E., y Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185–209.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B, Cohen, L., Daus, A., Goldschmid, E. y Porat, R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit with the biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*. 92: 393-399.
- Ebrahim, S., Usha, K., y Singh, B. 2011. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Sci Against Microb Pathog.* 2: 1043-1054.
- Egusa, M., Akamatsu, H., Tsuge, T., Otani, H., y Kodama, M. 2008. Induced resistance in tomato plants to the toxin-dependent necrotrophic pathogen *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 73(4-5): 67-77.
- Ellis, C., Karafyllidis, L., y Turner, J.G. 2002. Constitutive activation of Jasmonate signaling in *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced

- resistance to *Erysiphe cichoreacearum*, *Pseudomonas syringae* and *Myzus persicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15: 1025-1030.
- Ene, M., Alexandru, M., Negut, D.C., Sesan, T.E. 2013. Class II acidic chitinase expression in tomatoes treated with *Trichoderma* and AM fungi. *Romanian Biotechnological Letters*. 18(5): 8645-8656.
- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A.A., Borges-Pérez, A., y Pérez, J.A. 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology*, 8(1): 131.
- FAO. 2012. (<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>)
- Feng, L., Lintula, S., Ho, T.H., Anastasina, M., Paju, A., Haglund, C., Stenman U.H., Hotakainen, K., Orpana, A., Kainov, D. y Stenman, J. 2012. Technique for strand-specific gene-expression analysis and monitoring of primer-independent cDNA synthesis in reverse transcription. *Biotechniques*. 52: 263-270.
- Fukamizo, T., Sasaki, C., Tamoi, M. 2003. Plant chitinases: structure-function relationships and their physiology. *Foods Ingredients J. Jpn.* 208(8),
- García, M.N.M. y Capiati, D.A. 2011. Utilización de factores de transcripción como herramienta biotecnológica para incrementar la tolerancia a la sequía en plantas. *Química Viva*. 10(3): 187-199.
- Guerrero-Rodríguez, E., Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F. D., Flores-Olivas, A., Sandoval-López, V., y Jasso-Cantú, D. 2007. Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* DC en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. *Revista mexicana de Fitopatología*, 25(1): 48-53.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43:205-227.
- Hall, D.H., Teviotdale, B.L., y Paulus, A.O. 1980. Blackmold of Ripe Tomato Fruit. UC Davis, Vegetable Research and Information Center. 1-3

- Hammond-Kosack, K., y Parker E.J. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Ocurrent Opinion in Biotechnology*. 14: 177-193.
- Hématy, K., Cherk, C., y Somerville, S. 2009. Host-patogens warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*. 12: 406-413.
- Hernández Guzmán, A.K., y Guzmán-Barney, M.M. 2013. Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección por RT-PCR del Potato yellow vein virus (PYVV) en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja. 15(1): 61-70
- Hurlbert J.C., Preston J.F. 2001. Functional characterization of a novel xylanase from a corn strain of *Erwinia chrysanthemi*. *J Bacteriol*. 183: 2093–2100.
- Jordán, M., y Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. En: Squeo, F.A. y Cardemil, L. *Fisiología vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena. XX-XX
- Kakvan, N., Zamanizadeh, H., Hajmansoor, S., Taheri, H., y Morid, B. 2009. Pathogenic and genetic diversity of *Alternaria alternata* isolates from Tangerine hybrids of Iran, based on RAPD-PCR technique. *Phytopathology*. 99(6): S60-S60.
- Keefe, D., Hinz, U., y Meins Jr, F. 1990. The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of  $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta*. 182(1): 43-51.
- Kliebenstein, D. J. 2004. Secondary metabolites and plant environmental interactions: A view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant Cell Environmental*. 27: 675-684.
- Lacey, J. 1989. Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology*. 67(s18): 11s-25s.
- Laloi, C., Apel, K., y Danon, A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current opinion in plant biology*. 7(3): 323-328.

- Lawton, K., Ward, E., Payne, G., Moyer, M., y Ryals, J. 1992. Acidic and basic class III chitinase mRNA accumulation in response to TMV infection of tobacco. *Plant molecular biology*. 19(5): 735-743.
- Leyva Pérez, M. 2008. Mecanismos de respuesta frente a la infección por *Botrytis cinerea* en *Solanum lycopersicum*. Estudio de las Beta-1, 4-endoglucanasas y de tratamientos inductores. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Tesis doctoral. 231 pp.
- Li, Y.C., Zhu, B.Z., Xu, W.T., Zhu, H.L., Chen, A.J., Xie, Y.H., Shao, Y. y Luo, Y.B., 2007. LeERF1 positively modulated ethylene triple response on etiolated seedling plant development and fruit ripening and softening in tomato. *Plant Cell Reports*. 26: 1999–2008.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta T}$  method. *Methods*. 25: 402-408.
- Lopez-Gomez, R., y Gomez-Lim, M.A. 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience*. 27(5): 440-442.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., y Solano, R. 2004. Jasmonate-insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16: 1938-1950.
- Lorenzo, O. y Solano, R. 2005. Señalización de Ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal*. net. 1: 1-16.
- Lu, C.W., Shao, Y., Li, L., Chen, A.J., Xu, W.Q., Wu, K.J., Luo, Y.B. y Zhu, B.Z., 2011. Overexpression of SIERF1 tomato gene encoding an ERF-type transcription activator enhances salt tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology*. 58: 118–125.
- Madriz, O. K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plantas*. 63: 23-32.



- Mahovic, M.J., Sargent, S.A., Bartz, J.A., y Lon Kan, E.E. 2002. Guide to identifying and controlling postharvest tomato diseases in Florida, Document of the Horticultural Sciences Department. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Margis-Pinheiro, M., Martín, Ch., Didierjean, L., y Burkard, G. 1993. Differential expression of bean chitinase genes by virus infection, chemical treatment and UV irradiation. *Plant Molecular Biology*. 22: 659-668.
- McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.R., Udvardi, M.K., y Kazan, K. 2005. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiol.* 139: 949-959.
- Meins, F., Fritig, B., Linthorst, H.J., Mikkelsen, J.D., Neuhaus, J.M., y Ryals, J. 1994. Plant chitinase genes. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12(2): S22-S28.
- Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M.M., Ocampo-Velazquez, R.V., Herrera-Ruiz, G., Chapa-Oliver, A.M., y Guevara-González, R.G. 2010. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 9155-9162.
- Mercier J. Roussel, D., Charles M-T., Arul J. 2000. Systemic and local responses associated with UV-induced and pathogen induced resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrot. *Phytopathology*. 90: 981-986.
- Mérillon, J.M., y Ramawat, K.G. 2011. *Plant Defence: Biological Control* Springer Science & Business Media. Primera edición. New York. 412 pp.
- Mikeš, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Ricci, P., Blein, J.P. 1997. The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett.* 416: 190-192.
- Morales, M., y Barceló, A.R. 1997. A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*. 45(2): 229-232.
- NanoDrop Technologies, 2007.  
([http://www.bio.davidson.edu/gcat/protocols/NanoDrop\\_tip.pdf](http://www.bio.davidson.edu/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf))

- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., Viljoen, A. 2006. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. *Plant Pathology*. 55: 217-223.
- Nurnberger D., Nennstiel T., Jabs W.R., Sacks K., Hahlbrock J., Scheel D. 1994. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*. 78: 449-460.
- O'Donnell, P.J., Jones, J.B., Antoine, F.R., Ciardi, J. y Klee, H.J. 2001. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant Journal*. 25: 315-323.
- Oliveira, J.D.A.D., Alves de Almeida, C.M., Dos Santos, C.M.T., Menezes, L.V.L., Da Silva, M.V. 2012. Isolation and characterization of chitinase from tomato infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J. Phytopathology*. 160: 741-744.
- Pan, X.Q., Fu, D.Q., Zhu, B.Z., Lu, C.W., y Luo, Y.B. 2013. Overexpression of the ethylene response factor SIERF1 gene enhances resistance of tomato fruit to *Rhizopus nigricans*. *Postharvest Biology and Technology*. 75: 28-36.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., y Dunand, C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant cell reports*. 24(5): 255-265.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B. y Sharma, S.B. 2000. *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*. 103(7): 1111-1120.
- Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., Fluhr, R., 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 155-176.
- Pryor, B.M., y Michailides, T.J. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathol*. 92: 406-416.

- Promega Corporation. 1996. Protocols and Applications Guide.  
(<https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/rq1%20rnase-free%20dnase%20protocol.pdf>)
- Radman R, Saez R, Bucke C., Keshavarz T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 37: 91-102.
- Rawal, H.C., Singh, N.K., y Sharma, T.R. 2013. Conservation, divergence, and genome-wide distribution of PAL and POX A gene families in plants. *International Journal of Genomics*. 2013: 1-10.
- Rienth, M., Torregrosa, L., Ardisson, M., De Marchi, R. y Romieu, C. 2014. Versatile and efficient RNA extraction protocol for grapevine berry tissue, suited for next generation RNA sequencing. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 20(2): 247-254.
- Rivas, F., Proaño, K., Jiménez, P., León-Reyes, A. 2011. Análisis de la expresión del gen PR-1, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectado con *Phytophthora infestans*. *Revista Digital VI Congreso Ciencia y Tecnología ESPE*. 1-11.
- Rojas, L., Portal, O., y Jiménez, E. 2011. Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos. *Biotecnología vegetal*. 11(4): 213-222.
- Rotem, J. 1998. The genus of *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. The American Phytopathological Society, USA.
- Salgado Siclán M.L. 2012. Inductores de Resistencia a TuMV en *Arabidopsis thaliana* (L). Heynh. Tesis Doctoral. 82 pp
- Samac, D.A., Hironaka, C.M., Yallaly, P.E., y Shah, D.M. 1990. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 93(3): 907-914.
- Sanchez-Estrada, A., Tiznado-Hernandez, M.E., Ojeda-Contreras, A.J., Valenzuela-Quintanar, A.I., y Troncoso-Rojas, R. 2009. Induction of Enzymes and Phenolic Compounds Related to the Natural Defence Response of Netted Melon Fruit by a Bio-elicitor. *Journal of Phytopathology*. 157(1): 24-32.

- SIAP. 2012. (<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>)
- Simonetti, E., Veronico, P., Melillo, M., Delibes, A., Andrés, F. M. y López-Braña, I. 2009. Analysis of class III peroxidase genes expressed in roots of resistant and susceptible wheat lines infected by *Heterodera avenae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 22: 1081-1092.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q.M., Ecker, J.R. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ethylene-insensitive3 and ethylene-responsefactor1. *Genes Dev*. 12: 3703-3714.
- Solis, J., Medrano, G y Ghislan, M. 2007. Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*. 164: 1071-1082
- Suslow, T. V. y Cantwell, M. 2013. Tomato: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. (<http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Tomato/>)
- Stanford, A.C., Northcote, D.H., y Bevan, M.W. 1990. Spatial and temporal patterns of transcription of a wound-induced gene in potato. *The EMBO journal*. 9(3): 593.
- Stange, C., Briceño, E., Latorre, B.A., Arce-Johnson, P. 2007. Interacción Planta Patógeno. En: Squeo, F.A. y Cardemil, L. *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena. La Serena. XX-XX
- Taiz, L., y Zeiger, E. 2007. *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I. Tercera edición. Castellón de la Plana. 1338 pp.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2(2): 70-78.
- Terry, L.A., y Joyce, D.C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*. 32(1): 1-13.
- Thornton, B., y Basu, C. 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 39(2): 145-154.

- Tian, S., Wan, Y., Qin, G. y Xu, Y. 2006. Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70: 729-734.
- Troncoso-Rojas, R., Sanchez-Estrada, A., Carvallo, T., Gonzalez-Leon, A., Ojeda-Contreras, J., Aguilar-Valenzuela, A. y Tiznado-Hernandez, M.E. 2013. A fungal elicitor enhances the resistance of tomato fruit to *Fusarium oxysporum* infection by activating the phenylpropanoid metabolic pathway. *Phytoparasitica*. 41(2): 133-142.
- Troncoso-Rojas R., Tiznado-Hernández M.E. 2014. *Alternaria alternata* (black rot, black spot). En: Bautista-Baños, S. *Postharvest Decay of Fruits and Vegetables: Control Strategies*. Elsevier. Filadelfia. 147-188.
- Turner, G.J., Ellis, C. y Devoto, A. 2002. The Jasmonate Signal Pathway. *The Plant Cell*. 14: S153-S164.
- Uma, B., y Rao, P.A. 2014. Overlapping sets of transcripts from host and non-host interactions of tomato are expressed early during non-host resistance. *Plant Omics Journal*. 7(1): 19-27.
- Upadhyay, P., Rai, A., Kumar, R., Singh, M., y Sinha, B. 2014. Differential expression of pathogenesis related protein genes in tomato during inoculation with *A. solani*. *Journal of Plant Pathology Microbiology*. 5: 217
- Van Buuren, M., Neuhaus, J. M., Shinshi, H., Ryals, J., y Meins Jr, F. 1992. The structure and regulation of homeologous tobacco endochitinase genes of *Nicotiana sylvestris* and *N. tomentosiformis* origin. *Molecular and General Genetics MGG*. 232(3): 460-469.
- Van Loon, L.C., Rep, M., y Pieterse, C.M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- Veronese, P., Ruiz, M.T., Coca, M.A., Hernandez-Lopez, A., Lee, H., Ibeas, J.I., Damsz, B., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. y Narasimhan, M.L. 2003. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiology*. 131(4): 1580-1590.

- Vidhyasekaran, P. 2008. Fungal pathogenesis in plants and crops. Molecular Biology and host defense mechanisms. Second Edition. CRC Press. 509 pp.
- Wang, A.Y., Lou, B.G., Xu, T., y Lin, C. 2011. Defense responses in tomato fruit induced by oligandrin against *Botrytis cinerea*. African Journal of Biotechnology. 10(22): 4596-4601.
- Wang, C.J., Chan, Y.L., Shien, C.H., y Yeh, K.W. 2015. Molecular characterization of fruit-specific class III peroxidase genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). Journal of plant physiology. 177: 83-92.
- Wang, H.M., Yin, W.C., Wang, C.K. y To, K.Y. 2009. Isolation of functional RNA from different tissues of tomato suitable for developmental profiling by microarray analysis. Bot stud. 50: 115-125.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahi-Goy, P., Metraux, J.P. y Ryals, J.A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. The Plant Cell. 3(10): 1085-1094.
- Welinder, K.G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Current Opinion in Structural Biology. 2(3): 388-393.
- Wendehenne, D., Binet, M.N., Blein, J.P., Ricci, P. y Pugin, A. 1995. Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. FEBS Lett. 431: 203-207.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D. y Xie, D. 2002. The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. Plant Cell. 14: 1919-1935.
- Zitter T.A. y Wien H.C. 1984. Outbreak of *Alternaria alternata* causing fruit rot of tomato in upstate New York. Plant Dis. 68: 628.
- Zhang, L., Jia, C., Liu, L., Zhang, Z., Li, C. y Wang, Q. 2011. The involvement of jasmonates and ethylene in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin-induced tomato cell death. Journal of experimental botany. 62(15): 5405-5418.