

**AGENTES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS COMO INDUCTORES DE  
RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE PAPA**

**ESMERALDA GONZÁLEZ GALLEGOS**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN  
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**



**BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA  
JUNIO DE 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**

**“AGENTES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS COMO INDUCTORES DE RESISTENCIA  
A ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE PAPA”**

**T E S I S**

**ESMERALDA GONZÁLEZ GALLEGOS**

**Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada  
como requisito parcial para optar al grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**COMITÉ PARTICULAR**

Asesor Principal:


  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Melchor Cepeda Siller

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila, México, Junio, 2015

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida y por poner a las personas adecuadas que contribuyeron en esto.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada para para realizar el posgrado.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y por el apoyo otorgado al proyecto, al **Departamento de Parasitología Agrícola** por abrirme sus puertas a pesar de ser ajena al área y a cada maestro por el conocimiento transmitido.

Al **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo** por dirigir esta tesis, por la confianza depositada en mí para realizar el proyecto, por su paciencia y apoyo, por procurar siempre todo lo necesario para facilitarnos el trabajo, pero principalmente gracias por sus consejos y por compartir su sabiduría, fue un gusto trabajar con usted. Al resto de mi comité de asesores **Dr. Gabriel Gallegos Morales** y **Dr. Melchor Cepeda Siller**, gracias por formar parte del mismo y por sus conocimientos transmitidos.

Al **Departamento de Horticultura**, por su hospitalidad y apoyo, en especial a Julia, Erika y a la Dra. Susana González, gracias por el conocimiento brindado.

Al **Centro de Investigación en Química Aplicad (CIQA)** a la MC. Lourdes Guillén por la disponibilidad y apoyo.

Al **Dr. Sergio Sánchez Peña** por sus consejos, conocimiento y especial sentido del humor para hacer más amenas las cosas.

Al **Dr. Juan Alberto** por su gran ayuda y apoyo tanto profesional como moral, en verdad muchas gracias.

**A mis compañeros y amigos de la UAAAN**, especialmente a Mayo por su incondicional apoyo, por estar siempre ahí a pesar de todo y a Salvador por su también incondicional ayuda, les estaré siempre agradecida; a Iñaky por sus conocimientos compartidos, por tolerarme y por su apoyo para realizar parte del proyecto; a Cristy por compartir su conocimiento y experiencia y estar siempre dispuesta a ayudar de la manera más amable, a Silvia, Blanquita, Zubiri, Roberto, Julio, Héctor y Agustín por el apoyo moral o asesoría dada en algún punto del proyecto. A mis compañeros de generación Irving y Diego por su asesoría y ánimos para culminar la tesis.

A las personas que en alguna etapa formaron parte de este proyecto de vida, gracias por el apoyo brindado en su momento.

## DEDICATORIA

A mi madre, **Claudia Gallegos García**, por representar todo en mi vida, por ser el sustento y pilar de ella, por su amor, por todo el apoyo brindado, por alentarme a seguir adelante y cumplir mis propósitos aun cuando implican sacrificios para ella, por preocuparse y darme palabras de ánimo cuando las necesito, por entender cuando no pude estar con ella por estar con pendientes de la escuela, por todo gracias.

# **COMPENDIO**

**AGENTES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS COMO INDUCTORES DE  
RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE PAPA**

**POR  
ESMERALDA GONZÁLEZ GALLEGOS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN  
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
CALZADA ANTONIO NARRO  
No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA  
JUNIO DE 2014**

**Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo - Asesor principal-**

## RESUMEN

El uso excesivo de plaguicidas para el control de enfermedades en plantas es un problema actual en los campos agrícolas por lo que es una prioridad entre los investigadores debido a que los sistemas actuales de producción demandan la protección de los cultivos con métodos novedosos y ecológicos compatibles con la agricultura sostenible que representen una alternativa viable a la aplicación de productos químicos ya que es una demanda del consumidor contar con alimentos libres de residuos de plaguicidas. Una alternativa es potenciar mediante la estimulación apropiada la respuesta defensiva natural de las plantas, fenómeno conocido como inducción de resistencia, que además de proveer un control eficiente de enfermedades puede incrementar el rendimiento en los cultivos.

El objetivo del presente estudio fue determinar el incremento en los niveles endógenos de ácido salicílico, ácido jasmónico, fenoles totales, actividad peroxidasa, fenilalanina amonio liasa y proteínas totales como indicadores del aumento en las defensas de las plantas por la acción de agentes bióticos y abióticos. En plantas de papa se aplicaron los tratamientos que consistieron en: T1= esporas de *Bacillus* spp. y  $10^8$  cfu/mL, *Pseudomonas fluorescens*  $10^8$  cfu/mL a una concentración de 0.5%, T2= solución acuosa de ácido jasmónico de origen microbiano a 1500 ppm al 0.2% y T3= mezcla del T1 al 0.5% + T2 al 0.1%; el T4= Milor® (Clorotalonil + Metalaxil) al 0.5% y el T5= testigo absoluto (agua).

Se observó la producción de ácido salicílico con el T4 (Milor®) desde la primera hora de muestreo alcanzando una concentración hasta 492% (112.05 µg/g PS) más elevada que el Testigo, a las 3 h con la aplicación de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* (T1) se obtuvo el pico máximo de producción de AS con 114.02 µg/g PS, es decir, 469% más que el Testigo. No se detectaron niveles de AJ en las plantas Testigo, se indujo la producción de AJ con la aplicación del T4 (Milor®) con la máxima concentración (1572.18 µg/g PS) en la primera hora de muestreo, con los tratamientos biológicos se detectaron niveles de AJ similares a las 6 h, el T1 (*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*) alcanzó 550.02, el T2 (ácido jasmónico 1500 ppm) 833.32 y el T3 (T1+T2) 562 µg/g PS. La aplicación de los tratamientos no estimuló la acumulación de compuestos fenólicos ya que no se observaron diferencias significativas entre las plantas tratadas y las del Testigo. En la concentración de proteínas totales, en la primera hora de muestreo, el T4 Milor® presentó niveles de 25.125 mg/g PS, a las 3 h el T1 (*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*) alcanzó 23.29 mg/g PS. En la producción de fenilalanina amonio liasa el mejor tratamiento a las 3 h fue el T4 Milor®, los tratamientos biológicos T1 (*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*), T2 (ácido jasmónico de origen microbiano 1500 ppm) y T3 (T1 + T2) también mostraron incrementos significativos comparados con el Testigo. De los tratamientos, el único capaz de inducir la producción de la enzima peroxidasa fue el T3 (T1= *Bacillus* spp. y *P. fluorescens* + T2= AJ de origen microbiano 1500 ppm), los niveles alcanzados estuvieron entre 0.37 y 1.97 U/L

## ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CUADROS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	4
El Cultivo de Papa y su Importancia.....	4
Principales Plagas y Enfermedades.....	5
Control de las Enfermedades en Plantas.....	6
Mecanismos de Defensa de las Plantas.....	9
Defensa Constitutiva.....	9
Defensa Inducible.....	11
Resistencia Sistémica Adquirida.....	12
Resistencia Sistémica Inducida.....	14
Inductores de Resistencia.....	15
Inductores Bióticos.....	15
Inductores Abióticos.....	16
Hormonas de Plantas.....	16
Inducción de Resistencia.....	18
Fenilalanina Amonio Liasa (PAL).....	18
Compuestos Fenólicos.....	19
Peroxidasa (POD).....	20
MATERIALES Y METODOS.....	22
Material Vegetal.....	22
Tratamientos y Muestreo.....	22
Cuantificación de Ácido Salicílico.....	23
Cuantificación de Ácido Jasmónico.....	24
Cuantificación de Fenoles Totales.....	25
Taninos Hidrolizables.....	26
Taninos Condensados.....	26
Cuantificación de Proteínas.....	27
Cuantificación de Fenilalanina Amonio Liasa.....	27
Cuantificación de Peroxidasa.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	49
LITERATURA CITADA.....	51



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tratamientos empleados para evaluar el efecto de agentes bióticos y abióticos como inductores de resistencia a enfermedades en papa.	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Producción de AS en hojas de papa en diferentes tiempos. T1= <i>Bacillus</i> spp. y <i>P. fluorescens</i> , T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua).....	30
2	Producción de AJ en hojas de papa en diferentes tiempos. T1= <i>Bacillus</i> spp. y <i>P. fluorescens</i> , T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua).....	35
3	Producción de Fenoles totales en hojas de papa en diferentes tiempos. T1= <i>Bacillus</i> spp. y <i>P. fluorescens</i> , T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua).	39
4	Producción de proteínas totales en hojas de papa en diferentes tiempos. T1= <i>Bacillus</i> spp. y <i>P. fluorescens</i> , T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua).....	42
5	Actividad enzimática PAL en hojas de papa en diferentes tiempos. T1= <i>Bacillus</i> spp. y <i>P. fluorescens</i> , T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua).....	44
6	Actividad enzimática Peroxidasa en hojas de papa en diferentes tiempos. T1= <i>Bacillus</i> spp. y <i>P. fluorescens</i> , T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua).....	46

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa es uno de los principales cuatro productos alimenticios a nivel mundial, es de vital importancia debido a su alto valor nutricional y es considerado un alimento estratégico para la seguridad alimentaria de cientos de millones de personas del mundo en desarrollo. La papa es apreciada como un tesoro enterrado con frecuencia subestimado, este resistente tubérculo crece rápidamente, es adaptable, produce mucho y responde con pocos insumos.

En México, la papa se siembra en tres ciclos, por lo que se cosecha durante todo el año, su costo de producción es alto debido a los costos elevados de semilla, bajos rendimientos y alta inversión para el control de plagas y enfermedades. El control de las enfermedades en papa está basado principalmente en el uso de plaguicidas de origen sintético que en ocasiones para algunas enfermedades alcanzan hasta 30 aplicaciones por cultivo con resultados con frecuencia poco satisfactorios ya que no se tiene un control eficiente debido a la aparición de patógenos resistente a estos productos químicos.

Existen evidencias de una grave contaminación derivada del uso de plaguicidas que además de afectar al medio ambiente mediante la contaminación de

suelos, mantos freáticos y agroecosistemas, repercuten en la salud de jornaleros y consumidores ya que los plaguicidas son utilizados indiscriminadamente sobrepasando las fechas y dosis de aplicación lo que trae como consecuencia la aparición de genotipos del patógeno resistentes a los plaguicidas químicos y el aumento en los costos de producción que de antemano son elevados para este cultivo, lo que representa una enorme desventaja ya que con la implementación del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) en México, los productores han tenido la necesidad de ser más eficientes para mejorar su competitividad, reducir sus costos de producción y adaptarse a la volatilidad del mercado.

Por lo anterior, es imperante la búsqueda de alternativas menos contaminantes, de baja residualidad que puedan implementarse como tácticas de manejo integrado que optimicen el control de enfermedades en el cultivo para permitir así una producción más sustentable, eficiente y económica que disminuya en lo posible las aplicaciones de productos químicos y el deterioro del medio ambiente.

## **OBJETIVO**

Evaluar la aplicación de agentes bióticos y abióticos y su potencial como inductores de resistencia a enfermedades en el cultivo de papa.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar el incremento en los niveles endógenos de ácido salicílico, ácido jasmónico, fenoles totales, proteínas totales, actividad peroxidasa y fenilalanina amonio liasa como indicadores del aumento en las defensas de las plantas por la acción de agentes bióticos y abióticos.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### El Cultivo de Papa y su Importancia

La papa (*Solanum tuberosum* L.) constituye uno de los productos alimenticios más importantes a nivel mundial, debido a su valor nutricional, ocupa el cuarto lugar después del trigo, maíz y arroz (Sifuentes y Macías, 2014)).

La producción mundial de papa en fresco ha aumentado en los últimos años, pasando de 308 millones de toneladas a 322 millones entre 1998 y 2007. Gracias a su alto valor nutritivo, adaptabilidad a diversos climas y sistemas de cultivo, es uno de los diez alimentos de mayor expansión en su producción en los países en desarrollo, particularmente los de mayor población como China e India, los cuales ocupan el primero y segundo lugar de los países productores de papa respectivamente, seguidos por Estados Unidos (Devaux *et al.*, 2010). En México se siembran 62,201 Ha de papa con una producción de 1,629,938 ton (SIAP, 2013).

Esta solanácea tiene un fuerte impacto económico en las zonas donde se cultiva debido a las diversas labores que demanda en la siembra, cosecha y comercialización con 8,700 productores, 77,800 familias, sin contar la agricultura

de subsistencia, 17,500 empleos directos, 51,600 empleos indirectos, 6´900,000 jornales año-1 (70 jornales por ha), valor de la producción por más de \$11,363 millones de pesos en inversiones por un monto de alrededor 2,246, millones de dólares (CONPAPA, 2013).

Es una de las hortalizas que se cultiva a lo largo de todo el año agrícola y cuyo producto se destina prácticamente al consumo interno, ya que la exportación es escasa. La papa es de vital importancia debido a su alto valor nutricional por lo que se considera un alimento estratégico para la seguridad alimentaria ya que es una fuente fácilmente digerible, prácticamente libre de grasa, con valores mínimos de azúcares solubles y comparado con otras fuentes ricas en almidón, aporta pocas calorías a la dieta (Estévez-Ochoa, 2012).

### **Principales Plagas y Enfermedades**

Al mismo tiempo que ha aumentado la producción de papa, han aumentado las amenazas y desafíos para obtener un sistema de cultivo económico con mayores rendimientos debido a diversos factores limitantes como son las diferentes plagas y enfermedades que afectan tanto a la planta como al tubérculo. Dentro de dichas enfermedades las más comunes causadas por bacterias son la sarna común provocada por *Streptomyces scabies*, pierna negra y pudrición blanda por *Pectobacterium carotovorum*, marchitez bacteriana o vaquita por *Ralstonia solanacearum*, pudrición anular por *Clavibacter*

*michiganensis* subsp. *sepedonicus* y la punta morada de la papa por el fitoplasma *Candidatus liberibacter solanacearum*. Los virus que afectan el cultivo son el PVY, PVX, PVS y PLRV, mientras que los nematodos encontrados son principalmente *Meloidogyne* sp., *Globodera rostochiensis* y *Globodera palida*. Así mismo, las principales enfermedades causadas por hongos son la costra negra por *Rhizoctonia solani*, la pudrición seca por *Fusarium* spp., la roña o sarna polvorienta por *Spongospora subterranea*, marchites por *Verticillium* sp., pudrición rosada por *Phytophthora erythroseptica*, mancha plateada por *Helminthosporium solani*, tizón temprano por *Alternaria solani* y el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*, siendo esta última uno de los principales factores limitantes para este cultivo (Castro y Contreras, 2011; Lozoya-Saldaña, 2010; Montesdeoca *et al.*, 2013).

### **Control de las Enfermedades en Plantas**

Los plaguicidas constituyen el método habitual de lucha contra las plagas, enfermedades y malezas que afectan a los cultivos agrícolas. La continua necesidad de producir más alimentos para una población que presenta un rápido crecimiento ha hecho que estos compuestos químicos de origen sintético, tengan un papel fundamental para garantizar la protección y la calidad de los diferentes cultivos (Orta, 2002).

Los beneficios aportados por los productos químicos han ido acompañados de una serie de perjuicios, algunos de ellos tan graves que ahora representan una amenaza para la supervivencia a largo plazo de importantes ecosistemas,



como consecuencia de la perturbación de las relaciones depredador-presa y la pérdida de biodiversidad. Además, los plaguicidas pueden tener importantes consecuencias en la salud humana. Según la base de datos de la American Chemical Society, en 1993 se habían identificado más de 13 millones de productos químicos, a los que se sumaban cada año unos 500 000 nuevos compuestos. Por ejemplo, en los Grandes Lagos de América del Norte, la International Joint Commission ha estimado que hay más de 200 productos químicos que pueden provocar problemas en el agua y en los sedimentos del ecosistema de los Grandes Lagos. Como en la carga ambiental de productos químicos tóxicos figuran compuestos tanto agrícolas como no agrícolas, es difícil separar los efectos ecológicos y sanitarios de los plaguicidas y los debidos a compuestos industriales que de forma intencionada o accidental se liberan en el medio ambiente. Sin embargo, existen pruebas abrumadoras de que el uso agrícola de los plaguicidas tiene importantes efectos en la calidad del agua y provoca serias consecuencias ambientales. Así, la agricultura es considerada una de las pocas actividades donde se descargan deliberadamente en el medio ambiente productos químicos para acabar con algunas formas de vida (FAO, s.f.).

El exceso de dependencia de los plaguicidas, particularmente en algunos países desarrollados con sistemas de cultivo intensivo, ha dado lugar a considerables problemas, entre ellos el desarrollo de plagas resistentes a los productos químicos utilizados para su control, la destrucción de los enemigos naturales de las plagas, la expansión de las poblaciones de especies que antes

no se consideraban plagas, la contaminación de suelos, mantos freáticos y agroecosistemas, además del daño que ocasionan en la salud de jornaleros y consumidores ya que los plaguicidas son utilizados indiscriminadamente sobrepasando las fechas y dosis de aplicación lo que desemboca en un aumento en los costos de producción hasta en un 30% por el alto número de aplicaciones de químicos durante el ciclo del cultivo (Frías *et al.*, 2001).

Lo anterior representa un problema actual en los campos agrícolas y es una prioridad entre los investigadores la búsqueda de métodos novedosos y ecológicos para la protección de los cultivos que representen una alternativa viable a la aplicación de productos químicos que además puedan implementarse como tácticas de manejo integrado que optimicen el control de enfermedades en plantas para permitir una producción más sustentable, eficiente y económica que disminuya en lo posible las aplicaciones de productos sintéticos y el deterioro del medio ambiente (Kuc, 2001).

Una alternativa es potenciar mediante la estimulación apropiada la respuesta defensiva natural de las plantas (Al-Mughrabi, 2008), fenómeno conocido como inducción de resistencia, que además de proveer un control eficiente de enfermedades puede incrementar el rendimiento en los cultivos (Abd-El-Kareem *et al.*, 2001).

## **Mecanismos de Defensa de las Plantas**

Es ampliamente conocido que las plantas poseen un eficiente sistema de vigilancia que involucran complejos mecanismos de señalización y transducción de señales a nivel celular para defenderse del ataque de los patógenos; han evolucionado hasta localizar o reconocer las moléculas extrañas como parte de una táctica sofisticada de defensa. Teóricamente, tienen los genes necesarios para responder a la agresión, esta respuesta puede ser en forma constitutiva o preexistente del tipo estructural y bioquímica al estar presente de una manera permanente en la planta o no constitutiva e inducida, cuando el ataque del patógeno o la interacción entre éstos, es suficiente para activarlos y desencadenar umbrales tóxicos de sustancias que confieren protección no sólo en el sitio de infección, sino también en tejidos distales y que bloquean la instalación del patógeno. La combinación de características estructurales y reacciones bioquímicas que utilizan las plantas para defenderse de los patógenos difieren en las distintas interacciones hospedante-patógeno. Además, incluso al tratarse del mismo hospedante y patógeno, las combinaciones varían con la edad de la planta, el tipo de órganos y tejidos de ésta al ser atacados y el estado nutricional de la planta así como condiciones climáticas (Agrios, 2005).

### **Defensa Constitutiva**

La defensa constitutiva o preexistente incluye barreras físicas y bioquímicas presentes en la planta antes de la infección del patógeno, la

primera línea de defensa es su superficie, la cual el patógeno debe penetrar para causar infección. Algunas defensas estructurales incluyen la cantidad y calidad de la cera y de la cutícula que cubren a las células epidérmicas, la estructura de las paredes celulares de estas últimas, el tamaño, localización y forma de los estomas y lenticelas, y por último, la presencia en la planta de tejidos protegidos por paredes celulares gruesas que obstaculizan el avance del patógeno.

Aunque las características estructurales proporcionen a las plantas varios grados de defensa contra el ataque de los patógenos, es evidente que esta resistencia no estriba tanto en las barreras estructurales sino en las sustancias que producen sus células antes o después de la infección. Dentro de la defensa bioquímica preexistente, se encuentra ciertas sustancias que las plantas exudan a través de sus raíces y órganos aéreos, éstos exudados fungitóxicos parecen tener una función inhibitoria ante el ataque de algunos patógenos. Varios tipos de compuestos fenólicos y taninos se encuentran en las células de las hojas o frutos jóvenes y pueden participar como factor en la resistencia de los tejidos jóvenes a algunos microorganismos patógenos. Otro tipo de sustancias preformadas son las saponinas como la tomatina y avenacina que tienen actividad antifúngica, por otro lado, algunas proteínas funcionan como inhibidores de las enzimas hidrolíticas de los patógenos que intervienen en la degradación de la pared celular del hospedante, las células vegetales también contiene enzimas como las glucanasas y las quitinasas que causan la

degradación de los componentes de la pared celular del patógeno (Agrios, 2005).

### **Defensa Inducible**

Aun cuando el patógeno rompe mecánicamente las barreras físicas de defensa de las plantas, éstas producen una gran variedad de sustancias antimicrobianas a través de la superficie de sus raíces y de los demás órganos aéreos, algunos de estos compuestos liberados tienen una función inhibitoria ante el ataque de ciertos patógenos, la resistencia ocurre cuando una o más de estas sustancias alcanzan una concentración suficiente para inhibir el avance de la infección.

La defensa inducible es un mecanismo de respuesta activo que involucra cambios en el metabolismo de las plantas que pueden desarrollar un aumento en la resistencia a la infección por patógenos por el tratamiento con una amplia variedad de inductores tanto bióticos como abióticos. La percepción de estos elicitores específicos o generales por las plantas no solo permite el reconocimiento de los patógenos, sino que posibilita la transducción de señales para la activación de los mecanismos de respuesta. El entrecruzamiento entre las vías de señalización brinda un potencial regulatorio que permite la activación de una combinación óptima de respuestas en dependencia del patógeno específico que esté atacando (Baker *et al.*, 1997).

Dentro de la defensa inducible se reconocen dos vías principales que están involucradas en la inducción de resistencia en la planta: la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y la Resistencia Sistémica Inducida (RSI), éstas pueden ser diferenciadas por la naturaleza del inductor y las rutas regulatorias que involucran (Kunkel y Brooks, 2002).

### **Resistencia Sistémica Adquirida**

La RSA es activada por agentes bióticos como microorganismos patógenos o por abióticos con la aplicación exógena de sustancias que actúan como elicitores y confiere protección contra un amplio espectro de patógenos, se caracteriza por presentar una reacción hipersensitiva y el aumento local y sistémicos de los niveles endógenos de ácido salicílico (AS) en la planta, así como por la regulación de un gran conjunto de genes incluyendo genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Spoel *et al.*, 2003). La mayoría de las proteínas PR son hidrolasas como las glucanasas (PR-2), quitinasas (PR-3), peroxidasas (PR-9), defensinas (PR-12), tioninas (PR-13) y las proteínas que transfieren lípidos además de la producción de defensinas y fitoalexinas (PR-14) (Díaz-Puentes, 2009). También ocurre el aumento de la lignificación de las paredes celulares, una respuesta hipersensible y la síntesis de fitoalexinas que confieren protección a la planta contra posteriores ataques (Mogollón y Castaño, 2011). Se sabe que el ácido salicílico, es la molécula involucrada en las vías de la RSA, es una fitohormona que actúa como

señalizador y regulador de las respuestas de las plantas frente a patógenos y al estrés abiótico (Mauch-Mani y Métraux, 1998).

La biosíntesis del AS en plantas deriva de la ruta del shikimato-fenilpropanoides, se sintetiza a partir de la fenilalanina que por acción de la enzima fenilalanina-amonio-liasa (PAL) es convertida en ácido cinámico y este es transformado en ácido benzoico o ácido orto-cumárico mismos que se supone son los precursores del AS (Raskin, 1992).

El AS se encuentra en los tejidos de las plantas en forma libre o conjugada como glucósidos, ésteres, amidas y ácidos dihidroxibenzoicos. Algunos autores sugieren que cuando se requiere de AS una parte proviene de las reservas de formas conjugadas, mientras que otra proviene de la actividad de la PAL (Henning *et al.*, 1993; Raskin, 1992). Los niveles endógenos de AS en las plantas varían considerablemente en función de la etapa fenológica y las condiciones ambientales, sin embargo, se ha comprobado que la aplicación exógena de este compuesto hormonal incrementa la resistencia en las plantas tratadas (Wildermuth *et al.*, 2002), defensa que está relacionada al modo de ataque y forma de obtención de nutrientes por parte del patógeno (biotrófos o necrótrofos) (Glazebrook, 2005). De acuerdo a estudios realizados en *Arabidopsis thaliana*, la defensa contra patógenos biotrófos generalmente implica la señalización dependiente de AS, mientras que la defensa inducida contra insectos herbívoros y patógenos necrótrofos es la dependiente de AJ (Gutjahr y Paszkowski, 2009).

## Resistencia Sistémica Inducida

Otro tipo de resistencia, la RSI ha demostrado ser efectiva contra enfermedades virales, bacterianas y fúngicas, es regulada por el ácido jasmónico (AJ) y se produce cuando las raíces son colonizadas por ciertas rizobacterias promotoras del crecimiento, por heridas o por daño causado por insectos herbívoros (Clarke *et al.*, 2000). La RSI tiene muchas similitudes con la defensa inducible por patógenos (RSA) que proporciona resistencia en las partes no infectadas de la planta contra un amplio espectro de patógenos.

En plantas el AJ se sintetiza a partir del ácido linolénico que se libera de las membranas lipídicas y es convertido en AJ. Su síntesis también puede activarse por herbivoría, que comúnmente daña a las hojas y otros tejidos, así como por heridas causadas por un daño mecánico. Esto ocurre mediante la inducción de cientos de genes que codifican para proteínas para la síntesis y percepción de los jasmonatos, así como proteínas implicadas en el flujo de iones y en la adaptación al estrés en general (Reymond *et al.*, 2000).

El AJ induce la formación de tricomas en hojas, los cuales confieren protección a la lámina foliar, otra función esencial es en la activación de la inmunidad en contra de patógenos que se alimentan de tejidos muertos como es el caso de algunos hongos necrotróficos o de ciertas bacterias que causan enfermedades a la planta (Gutjahr y Paszkowski, 2009).



## **Inductores de Resistencia**

En ausencia de un ataque por fitopatógenos, los mecanismos de defensa de las plantas pueden ser inducidos por agentes físicos o químicos. Estos inductores, también llamados elicitores son sustancias que inducen cambios fisiológicos en la planta. Las plantas responden a este estrés por la activación de un arreglo de mecanismos, similar a la respuesta de defensa por infecciones de patógenos o estímulos ambientales afectando el metabolismo y aumentando la síntesis de fitoquímicos. El uso de inductores como herramienta para aumentar el contenido fitoquímico en plantas aplicado solo o en combinación en selectos puntos de tiempos del crecimiento vegetal no debería ser confundido con la fertilización convencional administrada durante el ciclo de producción de la planta o antes de la cosecha. Los inductores pueden ser clasificados como compuestos bióticos y abióticos, también las hormonas de las plantas ácido salicílico (AS) y jasmonatos son considerados como elicitores (Baenas *et al.*, 2014).

Baenas *et al.*, (2014) clasifica a los inductores de la siguiente forma de acuerdo a su naturaleza:

### **Inductores Bióticos.**

Se consideran lipopolisacáridos, polisacáridos como pectina y celulosa de la pared celular, chitosán, quitina y glucanos, alginato, goma arábica y extracto de levadura; proteínas como glicoproteínas, criptogeína, oligandrina, celulasa,

pectoliasa, hidrolizados de proteína de pescado, lactoferrina; toxinas de patógeno como la coronatina, extracto de orégano y esporas fúngicas, micelio de la pared celular y pared celular microbiana.

### **Inductores Abióticos.**

Agentes químicos como ácido acético, benzotriazol, silicón, etanol, etileno, biorregulador prohexadiona, sales inorgánicas como  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{VSO}_4$ ; iones metálicos como  $\text{CO}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ .

Agentes físicos como sequía,  $\text{CO}_2$ , alteración en la composición de gas, temperatura extrema, alta presión, alta o baja osmolaridad, radiación UV, estrés salino, heridas y ozono.

### **Hormonas de Plantas.**

Ácido jasmónico, metil jasmonato, metil salicilato, ácido salicílico, etileno, citoquinina, giberelina  $\text{GA}_3$ .

Además de la clasificación de los inductores de acuerdo a su naturaleza, también pueden ser clasificados de acuerdo a su interacción con la planta hospedante como “inductores generales” como carbohidratos, proteínas de pared celular, oligosacáridos, etc. que inducen mecanismos no específicos para la inducción de respuesta de defensa en diferentes cultivares de plantas, y como “inductores específicos” de hongos, bacterias, virus o de origen vegetal, que afectan sólo a cultivares específicos de plantas hospedantes con la

presencia del correspondiente gen de resistencia en la planta asociada con el gen específico de resistencia contra el patógeno.

Otros ejemplos de inductores bióticos incluyen en sí la infección por patógenos y por rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas como algunas especies del género *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Agrobacterium* y microorganismos no patógenos como especies de *Trichoderma*, que además de ser eficaces agentes de control biológico pueden producir antibióticos o sideróforos que conducen a la inducción de resistencia (Alizadeh *et al.*, 2013; Akram *et al.*, 2013b). También se señala que diversos extractos vegetales como los obtenidos de *Lippia graveolens*, *Cymbopogon citratus*, *Azadirachta indica*, *Eliopsis longipes* entre otros, poseen moléculas con actividad antimicrobiana que incluso pueden actuar como inductores de resistencia que además de disminuir los daños causados por los patógenos, pueden favorecer el incremento en altura, longitud de raíz, rendimiento y biomasa total de las plantas (Ghazanfar, 2011; González-Morales *et al.*, 2011; Obledo *et al.*, 2004).

Así mismo, entre otros inductores abióticos se pueden citar el fosetil aluminio, ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido  $\beta$ -aminobutírico, etileno, fosfato de potasio, sodio o magnesio; así como acibenzolar-S-metil (ASM), menadiona, bisulfito de sodio y fosfitos (Gómez y Reis, 2011; Méndez *et al.*, 2010). En general son productos químicos o moléculas que actúan en algún punto de las vías de señalización implicadas en la resistencia a enfermedades

(Walters *et al.*, 2005), son producidos de forma sintética y también son llamados inductores químicos.

### **Inducción de Resistencia**

Ciertos cambios bioquímicos ocurren después de la aplicación de agentes inductores que pueden actuar como marcadores para la RSI, estos incluyen expresión de genes que codifican para proteínas PR, el aumento de ciertas enzimas relacionadas con la defensa como la polifenol oxidasa, lipoxigenasa, super óxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, fenilalanina amonio liasa, la acumulación de fitoalexinas y compuestos fenólicos, así como el refuerzo de la pared celular con deposición de lignina (Abo-Elyousr *et al.*, 2007; Akram *et al.*, 2013b).

#### **Fenilalanina Amonio Liasa (PAL)**

La enzima PAL es un factor clave en la ruta biosintética de los fenilpropanoides debido a que cataliza la primera reacción y regula por lo tanto, la síntesis de AS y la generación de los metabolitos que participan en la defensa de microorganismos patógenos como compuestos fenólicos y fitoalexinas (Ardila *et al.*, 2007); actúa convirtiendo la L-fenilalanina en ácido trans-cinámico que es un precursor de varios fenilpropanoides como lignina, flavonoides y cumarinas por lo que también está involucrada con la generación de estructuras de defensa tales como la lignificación. Las fitoalexinas poseen

propiedades antimicrobianas y se encuentran en niveles basales muy bajos en las plantas sanas pero se incrementan después del ataque de un patógeno (Madriz, 2002).

La PAL participa en cinco rutas metabólicas: 1) el metabolismo de la tirosina, 2) el metabolismo de la fenilalanina, 3) el metabolismo del nitrógeno, 4) la biosíntesis de fenilpropanoides y 5) biosíntesis de alcaloides (Ventura, 2013). La actividad de PAL se induce dramáticamente en respuesta a diversos estímulos tales como el daño tisular, ataque de patógenos, luz, bajas temperaturas, etc., sin embargo, un incremento en la actividad de la PAL o en los genes que codifican para dicha enzima se ha relacionado habitualmente con los mecanismos de resistencia de la planta frente a distintos patógenos, así como con los procesos de resistencia inducida (Gayoso *et al.*, 2010; Kamble *et al.*, 2013). Por lo tanto, la actividad PAL se ha utilizado también como un indicador para cuantificar el grado de respuesta defensiva alcanzado por la planta tras la inducción (Pensado, 2014).

### **Compuestos Fenólicos**

Constituyen uno de los grupos más comunes de compuestos defensivos de las plantas, se biosintetizan a través de la vía de los fenilpropanoides, del metabolismo de la fenilalanina, seguido de varias reacciones para producir ácido cinámico, ácido cafeico, flavonas y otros compuestos fenólicos (Ahmed *et al.*, 2013), tienen una variedad de funciones de tipo estructural en la planta,

reducen la incidencia de la enfermedad a través de la estimulación de las respuestas de defensa de la misma (Trotel-Aziz *et al.*, 2008) y desempeñan un papel importante en la resistencia contra herbívoros, contra microorganismos y plantas competidoras (Rashid *et al.*, 2012). Los fenoles juegan papeles importantes en el desarrollo de la planta, en particular en la biosíntesis de la lignina y pigmentos, además de proporcionar integridad estructural para las mismas. Es importante destacar que las fitoalexinas y compuestos fenólicos secretados por las plantas heridas repelen o matan a muchos microorganismos ya que presentan actividad directa contra la infección de bacterias y hongos inhibiendo el desarrollo de las hifas de estos últimos o uniéndose a las enzimas liberadas por los patógenos durante la invasión de la célula (Del Río *et al.*, 2004); aunque algunos patógenos pueden contrarrestar o anular estas defensas o incluso destruirlos para su propio beneficio (Bhattacharya *et al.*, 2010). Se ha encontrado que suelen estar presentes en las plantas, sin embargo su concentración aumenta de forma considerable tras la entrada de un patógeno (Robledo *et al.*, 2012).

### **Peroxidasa (POD)**

Las peroxidasas, son oxidoreductasas producidas por un gran número de microorganismos y plantas, catalizan la oxidación de ciertos compuestos donadores de hidrógeno como fenoles (guayacol y pirogalol) y aminas aromáticas, pero todas estas reacciones requieren de la presencia de peróxido

de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), para su activación. El  $H_2O_2$ , primero oxida a la enzima para después oxidar el sustrato en turno (Tomasini, s.f.).

Algunas de las funciones fisiológicas de las peroxidasa en las plantas son: su participación en la biosíntesis del etileno, la defensa contra infecciones, la curación de heridas, la oxidación del regulador vegetal ácido indol acético y en la lignificación de la pared celular; este último proceso tiene lugar tras la oxidación de los fenilpropanoides lo que produce la liberación de lignina misma que se encuentra involucrada en el entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular; por lo tanto, el aumento y acumulación de peroxidasa, puede incrementar la resistencia mecánica de las paredes de las células huésped, inhibiendo o restringiendo la invasión de patógenos (Yedidia *et al.* 1999). El incremento de la lignificación unido al entrecruzamiento de las proteínas estructurales causan el reforzamiento de las paredes haciéndolas resistentes ante el ataque por las enzimas hidrolíticas de origen microbiano, con lo que se limita la diseminación del patógeno en el tejido vegetal, restringiéndolo a la célula atacada en la cual se induce la muerte celular hipersensitiva (De la Noval y Pérez, 2004). La peroxidasa, junto con la catalasa y la superóxido dismutasa se encarga también de proteger a las células de la planta del daño oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno generados durante la interacción planta-patógeno (Thakur y Singh, 2013).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Vegetal

Se sembraron tubérculos de papa var. alpha en bolsas plásticas conteniendo una mezcla de peat-most y tierra de bosque (1:1), las macetas fueron mantenidos bajo condiciones de invernadero y cuando las plantas alcanzaron 30 días de edad se realizó la aplicación de los tratamientos. El experimento se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coah.

### Tratamientos y Muestreo

Los tratamientos biológicos evaluados fueron proporcionados del proyecto 0030-32400-3611-7065 por el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola y consistieron en: T1=mezcla de esporas de *Bacillus* spp.  $10^8$  UFC/mL y *Pseudomonas fluorescens*  $10^8$  UFC/mL; T2=solución acuosa de ácido jasmónico de origen microbiano (1500 ppm) y T3=mezcla del T1 + T2 al 0.1%; el T4=Milor® (Clorotalonil + Metalaxil) y el T5=testigo absoluto. En el



Cuadro 1 aparece la descripción completa de los tratamientos y la concentración utilizada. La aplicación se realizó por aspersión al follaje utilizando un aspersor manual. Las muestras se recolectaron a las 0, 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas (h) después de la aplicación de los tratamientos, el tiempo 0 fue colectado antes de dicha aplicación. Las muestras fueron liofilizadas, maceradas hasta polvo fino y almacenadas hasta su uso.

**Cuadro 1.** Tratamientos empleados para evaluar el efecto de agentes bióticos y abióticos como inductores de resistencia a enfermedades en papa.

	<b>Tratamientos</b>	<b>Concentración %</b>
<b>T1</b>	<i>Bacillus</i> spp. $1 \times 10^8$ esp/mL y <i>Pseudomonas fluorescens</i> $1 \times 10^8$ UFC/mL	0.5
<b>T2</b>	Solución acuosa de ácido jasmónico de origen microbiano a 1500 ppm	0.2
<b>T3</b>	Mezcla de T1 + T2	0.5 + 0.1
<b>T4</b>	Testigo comercial (Milor®)	0.5
<b>T5</b>	Testigo absoluto (agua)	-

### Cuantificación de Ácido Salicílico

Para la extracción de AS se pesaron 50 mg de tejido macerado, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se les agregó 1 mL de solución de extracción (10% metanol: 1% ácido acético: 89% agua destilada), se agitaron en vórtex por aproximadamente 15 seg, se sometieron a vibración sónica por 10

min y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  empleando una jeringa y se desgasificó en un sonicador por 5 min. La cuantificación se realizó utilizando un cromatógrafo LC Agilent 1120 con detector UV, la separación cromatográfica se realizó en una columna Agilent C18 5  $\mu\text{m}$  4.6x150 mm a 30°C. El método usado (Forcat *et al.*, 2008) fue el siguiente: 50% de fase **A** (94.9% agua: 5% acetonitrilo: 0.1% ácido fórmico) y 50% de fase **B** (5% agua: 94.9% acetonitrilo: 0.1% ácido fórmico), flujo de 0.6 mL/min con un tiempo de análisis de 12 min a una longitud de onda de 250 nm. Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra. La hormona fue determinada en tres muestras independientes de cada tratamiento y tiempo de muestreo. La concentración fue calculada mediante una curva de calibración con ácido salicílico como estándar y posteriormente convertida para ser expresada en  $\mu\text{g/g}$  de peso seco (PS).

### **Cuantificación de Ácido Jasmónico**

La extracción de AJ se realizó utilizando 100 mg de tejido macerado colocados en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 450  $\mu\text{L}$  de la solución de extracción (95% metanol: 5% acetato de etilo), se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo. Se repitió el procedimiento anterior agregando 450  $\mu\text{L}$  de la solución de extracción, después de centrifugar se recuperó el sobrenadante y se mezcló con el sobrenadante anterior. El extracto fue filtrado

a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se colocó en un vial de vidrio, posteriormente se evaporó el solvente en una estufa a 50°C y los residuos fueron resuspendidos en 1 mL de fase móvil (60 % metanol: 40% agua: 1% ácido acético) (Kramell *et al.*, 1999). La determinación y cuantificación de AJ se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución HP 1050 con detector UV HP7985A. La fase móvil utilizada fue 60% metanol: 40% agua con ácido acético al 1%. El flujo fue de 0.85 mL/min utilizando una columna Hypersil ODS de 25cm x 4.6 mm x 5 $\mu\text{m}$ . Se determinó la concentración de AJ a 295 nm con un tiempo de análisis de 15 min. Las muestras se analizaron por duplicado. La concentración fue calculada mediante una curva de calibración con (+)-ácido jasmónico como estándar y posteriormente convertida para ser expresada en  $\mu\text{g/g}$  de PS.

### **Cuantificación de Fenoles Totales**

Para determinar la cantidad de polifenoles totales se llevó a cabo la cuantificación de taninos hidrolizables y condensados, para la extracción de ambos compuestos fenólicos se pesaron 50 mg de tejido macerado y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de metanol 96% a 60°C, se agitaron en vórtex y se incubaron a 60°C durante 30 min. Los tubos fueron centrifugados a 3,000 g por 10 min para después recuperar el sobrenadante y colocarlo en un tubo nuevo hasta su uso.

### **Taninos Hidrolizables**

Se efectuó la técnica espectrofotométrica de Makkar (1993) la cual consistió en colocar 400  $\mu$ L de la muestra diluida (1:50) en tubos de ensaye y agregar 400  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu, se agitaron y se dejaron reposar por 5 min. Posteriormente se adicionaron 400  $\mu$ L de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0.01 M, 2 mL de agua destilada y se leyeron a una longitud de onda de 750 nm. La cantidad de fenoles hidrolizables se calculó mediante la ecuación de la recta de una curva de calibración con ácido gálico y se expresó como mg/g de PS.

### **Taninos Condensados**

Para la cuantificación de taninos condensados se desarrolló el método propuesto por Swain y Hillis (1959). En tubos de ensayo de 13x150 con tapa rosca se colocaron 500  $\mu$ L de la muestra diluida 1:50, se añadieron 3 mL de HCl-Butanol 10% y 100  $\mu$ L de reactivo férrico. Se llevaron a ebullición en baño maría durante 1 h y se leyeron en el espectrofotómetro a 460 nm. Se realizó una curva patrón con catequina y se calculó la cantidad de taninos condensados expresados en mg/g de PS.

La concentración de polifenoles totales expresados en mg/g de PS se obtuvo al sumar la cantidad de taninos hidrolizables y taninos condensados obtenidos.

## **Cuantificación de Proteínas**

La concentración de proteínas se determinó según el método de Bradford, empleando como patrón albúmina de suero bovino (Bradford, 1976).

## **Actividad Fenilalanina Amonio Liasa**

Para la extracción de la enzima se pesaron 50 mg del tejido macerado y liofilizado y se mezclaron con 1 mL de buffer de fosfatos 100 mM con pH 8 adicionado con  $\beta$ -mercaptoetanol (1.4 mM), se centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se utilizó como extracto enzimático (Trotel-Aziz *et al.*, 2008).

La determinación de la actividad PAL se llevó a cabo con 900  $\mu$ L de L-Fenilalanina (1 mg/mL) y 100  $\mu$ L del extracto enzimático, se incubaron a 40°C durante 30 min y se detuvo la reacción con 250  $\mu$ L de HCl 5 N, después se colocaron en un baño de hielo, se agregaron 5 mL de agua destilada y se determinó la absorbancia a 290 nm (Rodríguez *et al.*, 2006). El ácido cinámico formado durante la reacción enzimática fue cuantificado usando un coeficiente de extinción molar de 17.4/mM/cm. La actividad PAL se expresó como nanomoles por min por gramo de peso seco (Trotel-Aziz *et al.*, 2008).

## Actividad Peroxidasa

La extracción de la enzima se realizó utilizando 50 mg del material vegetal macerado y liofilizado mezclados con 500  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos 0.05 M pH 6, se homogenizaron y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se utilizó como extracto enzimático.

La cuantificación de la actividad peroxidasa se realizó espectrofotométricamente usando rojo fenol como sustrato. A 930  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio 50 mM pH 4.2 se le adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de rojo fenol al 0.2% y 20  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático. La reacción se inició agregando 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM y se detuvo 3 min después con 40  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 N. La densidad óptica fue determinada a 610 nm y calculada con un coeficiente de extinción molar de  $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el producto oxidado. La actividad peroxidasa fue expresada como milimoles de rojo fenol oxidado por gramo de peso seco por min (Yedidia *et al.*, 1999).

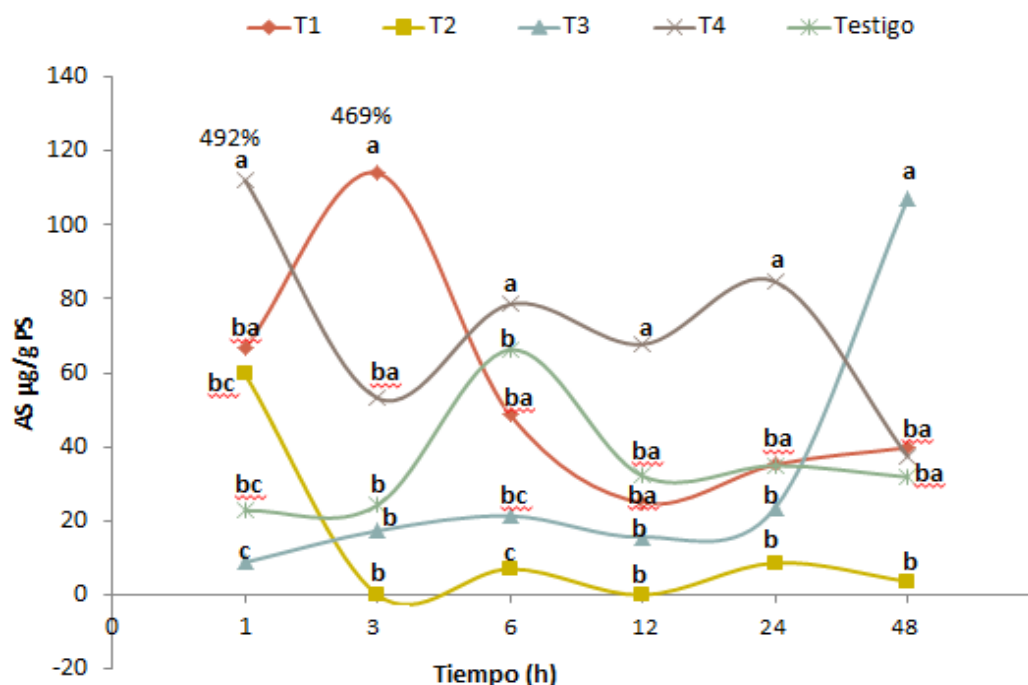
El experimento se llevó a cabo en un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento en cada tiempo. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey al 0.5 de significancia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cuantificación de Ácido Salicílico

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos que fueron sometidos a ANVA separadamente en cada tiempo de muestreo. La concentración de AS en plantas de papa se ubicó entre 3.68 y 114.02  $\mu\text{g/g}$  de peso seco (PS) durante el período de ensayo. En la primera hora el T4 (Milor®) fue estadísticamente diferente al Testigo con 112.05  $\mu\text{g/g}$  PS, es decir, 492% más; sin embargo, este valor disminuyó a partir de las 3 h hasta llegar a niveles estadísticamente iguales a los del Testigo. El T1 a base de esporas de *Bacillus* spp. y *P. fluoresces* incrementó significativamente la concentración de AS a las 3 h alcanzando 114.02  $\mu\text{g/g}$  PS, 469% más que el Testigo (Figura 1). A las 6 h, el T1, T4 y el Testigo no mostraron diferencias entre ellos, pero si respecto a los demás tratamientos. En los tiempos posteriores de detección de AS (12, 24 y 48 h), no hubo diferencias significativas entre el Testigo y las plantas tratadas. Los tratamientos T1 y T4 fueron capaces de activar las defensas de la planta ya que incrementos superiores al 59% de la concentración de AS endógeno al menos

en hojas de tabaco, son suficientes para inducir la acumulación de proteínas PR (Yalpani *et al.*, 1991).



**Figura 1.** Producción de AS en hojas de papa en diferentes tiempos. T1=*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*, T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua). Letras diferentes indican diferencias significativas

En esta investigación se encontraron concentraciones elevadas de AS en las plantas Testigo (T5) con 35.37 µg/g PS en promedio. La papa presenta altos niveles basales de AS hasta 100 veces mayores que otras plantas como tabaco y *Arabidopsis* (Coquoz *et al.*, 1995). Navarre y Mayo (2004) mencionan que los niveles endógenos de AS varían considerablemente en función de la etapa fenológica y las condiciones ambientales; los mismos autores determinaron la concentración de AS en tallos, flores, raíces, tubérculos, piel de tubérculo y hojas de papa, reportando cantidades alrededor de 10 µg de AS/g de peso



fresco (PF) en hojas, también encontraron una relación positiva entre la edad de la planta y la intensidad de luz en la producción de AS: mientras más grande es la planta y mayor intensidad lumínica tenga, mayor acumulación de AS tendrá.

El Milor® (T4) es una mezcla de los fungicidas Metalaxil que actúa de manera sistémica y Clorotalonil que actúa por contacto, es utilizado ampliamente para el control de enfermedades causadas por oomycetes. Además del efecto protectante que presenta, en este estudio se demostró su potencial como activador de los mecanismos de defensa por la acumulación de AS. Se conoce que la activación de la RSA se da por elicitores abióticos como son los productos químicos que interactúan con las vías de señalización relacionadas con la resistencia en plantas estimulando sus defensas, además presentan un efecto negativo directo sobre el patógeno, como se ha observado con el fungicida Probenazole que induce la RSA en *Arabidopsis* por la señalización de AS y la acumulación del mismo (Yoshioka *et al.*, 2001); de igual forma que los herbicidas Paraquat y Acifluorfen que inducen la RSA contra *Colletotrichum lagenarium* en plantas de pepino (Strobel y Kuc, 1995).

Tal como se observó, la resistencia sistémica en las plantas puede ser inducida por diversos factores, entre ellos los activadores químicos que actúan como inductores abióticos, por ejemplo, el acibenzolar-S-metil no presenta efecto antifúngico, sin embargo, actúa como inductor de resistencia que ha mostrado en tabaco y *Arabidopsis* activar la RSA ya que conduce a la acumulación de los mismos genes de resistencia que el AS (Gozzo, 2003). En

otros estudios, se ha demostrado que el ASM aplicado en combinación con guazatina reduce significativamente las enfermedades causadas por *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp. y *Trichothecium* spp. durante el almacenamiento de frutos de melón (Huang *et al.*, 2000). También se ha correlacionado la protección que provee el silicato de sodio contra algunos hongos poscosecha con la inducción de resistencia por la activación de enzimas relacionadas con la defensa como las peroxidasa y quitinasas (Bi *et al.*, 2006). De forma similar, diversos estudios demuestran la efectividad de algunos agentes químicos y extractos vegetales que tienen la capacidad de aumentar la resistencia de las plantas contra patógenos. Mostafa y Gado (2007) evaluaron en condiciones de campo algunos agentes químicos como derivados de AS y AJ, extractos acuosos de inflorescencias malformadas de mango, leche de coco y productos comerciales a base de extractos vegetales como inductores de resistencia contra *P. infestans* en plantas de papa; encontraron que todos los tratamientos evaluados redujeron el tamaño y número de lesiones así como la severidad de la enfermedad hasta en un 50% induciendo la formación de hasta cinco tipos de fitoalexinas en tubérculos de papa.

En cuanto al T1 que contiene esporas de *Bacillus* spp. y *P. fluorescens*, se observó un incremento significativo en la producción de AS 3 h posteriores a su aplicación, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Segarra *et al.* (2007) al inocular esporas de *Trichoderma asperellum* en plantas de pepino activando la resistencia sistémica contra *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, donde la mayor producción de AS ocurrió al mismo tiempo que el

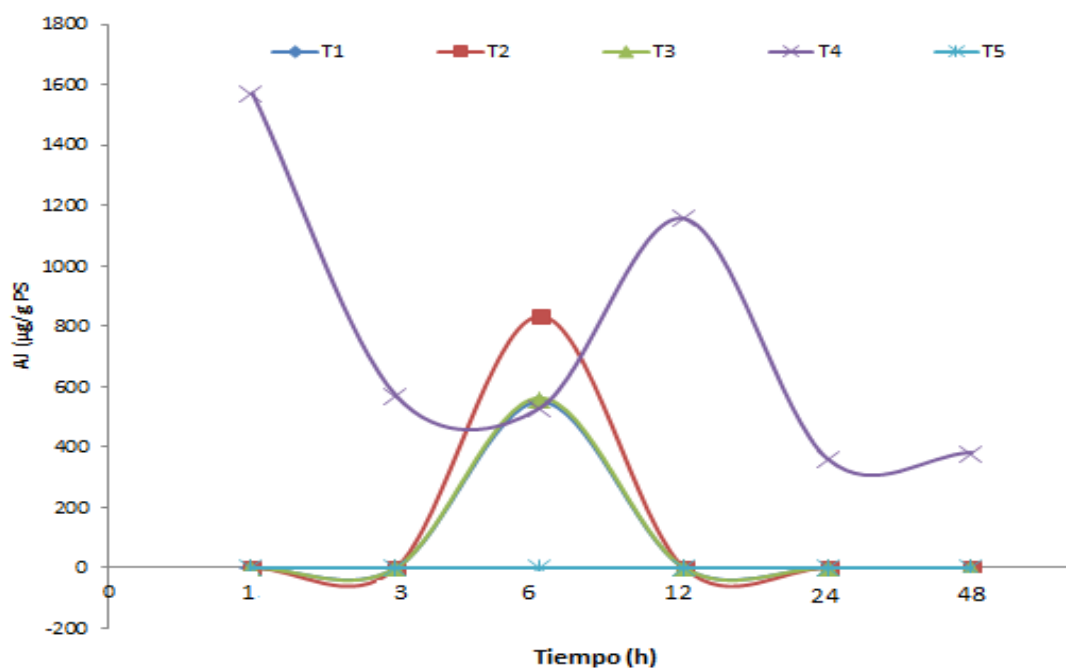
reportado en esta investigación. *P. fluorescens* es una bacteria que se ha reportado como activadora de la RSI, vía que es disparada por rizobacterias y efectiva contra diferentes tipos de patógenos (Pieterse *et al.*, 1996). En ese sentido Saikia *et al.* (2003) reportaron valores de hasta 2000 ng/g de PF de AS en la raíz de plantas de garbanzo crecidas en hidroponía en una solución de  $10^8$  cel/mL de cinco diferentes cepas de *P. fluorescens*, mientras que en el sitio distante de inoculación la cantidad fue de alrededor de 500 ng/g de PF. Lo anterior puede atribuirse a los diferentes mecanismos que han sido sugeridos para el control de patógenos mediante la inducción de resistencia en plantas por *P. fluorescens* como los que involucran la producción de HCN, amonio, antibióticos, compuestos volátiles y sideróforos. Los sideróforos, particularmente el AS están implicados en la habilidad de ciertas cepas para inducir resistencia en las plantas (Renga *et al.*, 2015); sin embargo, cuando se aplica *P. fluorescens* en plantas es difícil detectar si el AS es producido por la planta misma o por la bacteria, ya que el AS libre generado de forma local o sistémica es transferido a otros tejidos a través del floema (Saikia *et al.*, 2003). Otros autores como Chen *et al.*, (1999), mencionan que la producción de AS de *P. fluorescens* no puede ser correlacionada con la actividad de RSI ya que ésta resistencia (activada por rizobacterias) no requiere de AS debido a que es dependiente de AJ y ET (Van Loon, 2000).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento como las incluidas en el **T1** pueden inducir resistencia sistémica contra un amplio espectro de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos, e incluso contra insectos

de plantas (Chen *et al.*, 1999). *P. fluorescens* ha sido ampliamente usada como promotora de crecimiento y para el manejo de enfermedades en plantas (Kwack *et al.*, 2002). Se ha observado que su aplicación inhibe el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos como *R. solani* y activa con solamente una aplicación la RSI en la planta contra dicho patógeno aumentando los niveles de la actividad quitinasa y peroxidasa, niveles que permanecen durante más tiempo si se aplica a semillas, raíces, suelo y follaje; de esta manera, disminuye la incidencia de la enfermedad y aumenta los rendimientos del cultivo bajo condiciones de invernadero o en campo, mostrando una eficacia comparable con la del Carbendazim que es utilizado normalmente para controlar la enfermedad (Nandakumar *et al.*, 2000).

### **Cuantificación de Ácido Jasmónico**

No se detectaron niveles de AJ en el Testigo, sólo en plantas tratadas. La máxima concentración (1572.18 µg/g PS) se obtuvo en la primera hora con el T4 (Milor®) y a las 3 h con el mismo tratamiento (569.28 µg/g PS). Todos los tratamientos, a excepción del Testigo, presentaron niveles similares de AJ a las 6 h, el T1 (*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*) alcanzó 550.02, el T2 (ácido jasmónico 1500 ppm) 833.32, el T3 (T1+T2) 562.48 y el T4 (Milor®) 529.62 µg/g PS. Posteriormente a las 12, 24 y 48 h el único tratamiento que mantuvo a la producción de AJ fue el T4 (Figura 2).



**Figura 2.** Producción de AJ en hojas de papa en diferentes tiempos. T1=*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*, T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua).

El AJ es el mensajero de la RSI, el nivel de la hormona en las plantas varía en función del tejido, tipo de célula, etapa de desarrollo y en respuesta a diferentes estímulos ambientales (Creelman y Mullet, 1997), este regulador desencadena la expresión de ciertos genes cuando es aplicado exógenamente, además se acumula en los tejidos vegetales luego de heridas traumáticas o tratamiento con inductores como el T2 (solución de AJ de origen microbiano), que indujo la acumulación de la hormona al igual que el T1 y T3 transcurridas 6 h desde de la aplicación. La eficacia de la resistencia inducida y el tiempo de activación de la misma depende en gran manera de la concentración del agente inductor, probablemente se debe a esto que la activación de la RSI con la

inherente acumulación de AJ en este estudio fue detectado sólo y hasta a las 6 horas con los tres tratamientos.

El AJ ha sido utilizado mediante aplicaciones exógenas en la planta para aumentar las respuestas defensivas de ésta, se ha demostrado su efectividad para proveer protección a la planta tanto contra hongos como bacterias, por ejemplo contra *Ralstonia solanacearum* en papa, donde se evaluaron por inmersión del tubérculo antes de la siembra AJ y AS entre otros, obteniendo los mejores resultados con la aplicación de AJ; el AJ mostró mayor control de la enfermedad y por ende menor porcentaje de infección latente o visible en tubérculos, además con el tratamiento aumentaron los parámetros de rendimiento y se obtuvo el mayor número de tubérculos por planta, mismos que presentaron mayor peso que los obtenidos con el resto de los tratamientos (Gado, 2013).

La producción de AJ con los tratamientos T1 (*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*) y T3 (T1 + T2) se atribuye a que ambos tratamientos contienen *Bacillus* género del cual se ha comprobado que algunas especies como *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* y *B. sphaericus* son capaces de elicitar y activar la RSI aumentando los niveles de compuestos bioquímicos relacionados con esta defensa tales como compuestos fenólicos, actividad peroxidasa, fenilalanina amonio liasa y polifenoloxidasa con lo que confieren protección a cultivos como el tomate contra fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*; la elicitación de RSI por estas cepas ha sido demostrada en condiciones de invernadero o en

ensayos de campo en tomate, pimiento morrón, melón, sandía, remolacha azucarera, tabaco, *Arabidopsis* sp., pepino, pino y dos cultivos tropicales de Chile (Akram *et al.*, 2013a; Akram *et al.*, 2013b).

Por otro lado, algunas especies fluorescentes de *Pseudomonas* han sido reportadas para inducir resistencia sistémica, Alizadeh *et al.* (2013) encontraron que aplicando una mezcla de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas* sp. en plantas de pepino indujeron el aumento significativo en los niveles de resistencia contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum* asociándolo con la expresión de un conjunto de genes relacionados con la defensa contra este hongo, así mismo, encontraron que la aplicación por separado más no en combinación de ambos agentes de biocontrol activó la RSI en *A. thaliana* contra *Botrytis cinerea*.

El fungicida Milor® (T4) indujo en la planta la producción de AJ en todos los tiempos, su capacidad para inducir la producción de AS (como se mencionó antes) y AJ en las plantas, se debe probablemente a que los inductores abióticos dentro de los que se encuentran los productos químicos, actúan en uno o varios puntos de las vías involucradas con la resistencia a enfermedades (Walters, 2005).

El efecto de la presencia de ambas señales por la producción de AS y AJ al mismo tiempo puede ser explicado por una probable comunicación cruzada que aún no es del todo clara y que genera una interacción sinérgica entre estas

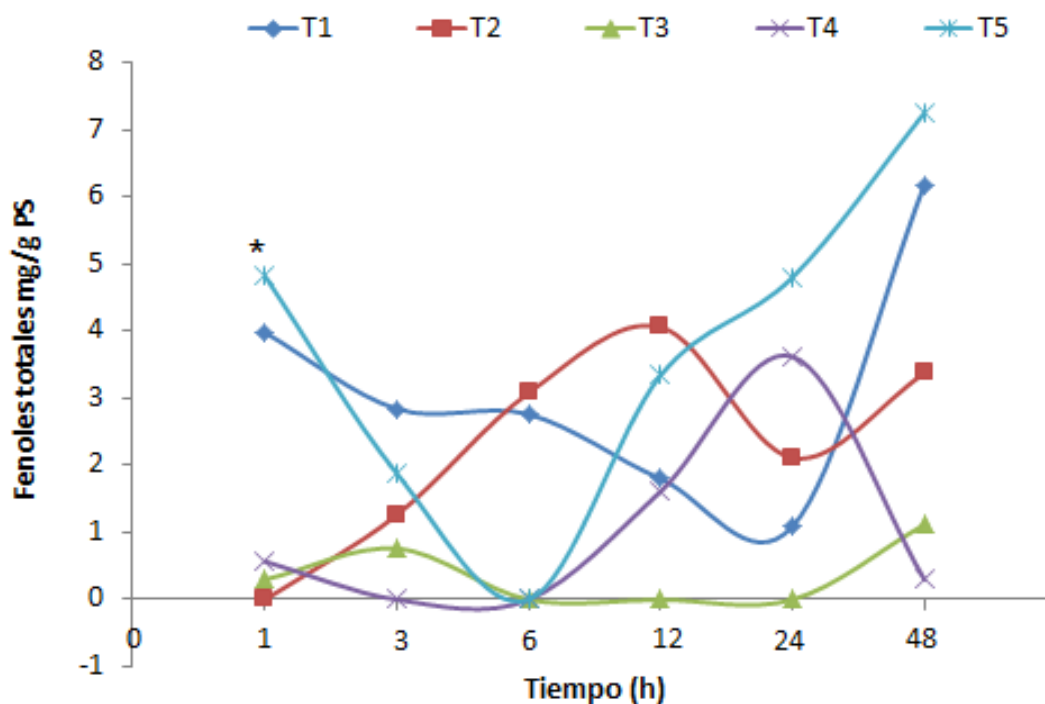
hormonas lo cual depende de la combinación y concentraciones utilizadas (Mur *et al.*, 2006).

La comunicación cruzada entre la señalización mediada por AS y AJ-ET es mayormente por represión mutua. Kunkel y Brooks (2002) mencionan que ambas rutas son mutuamente antagonistas debido a la evolución de las plantas para afinar la inducción de sus defensas en respuesta a diferentes patógenos, además del hecho de que ambos compuestos pueden inducir los mismos genes (Delaney *et al.*, 1994). Al respecto, Yang *et al.* (2011) encontraron en plántulas de chícharo que el AS deteriora la resistencia a las heridas por la supresión de la acción del AJ, mostrando un efecto negativo en la interacción entre éstos reguladores, sin embargo, también observaron que entre los conjugados de AS y el AJ existe una relación de sinergismo en las respuestas de defensa de la planta. De igual forma, se ha reportado en hojas de tomate que el AS bloquea la biosíntesis de AJ y que la producción de AS es inhibida por el AJ en plantas de tabaco transgénicas heridas; así, la producción de AS y AJ es antagonísticamente inhibida por AJ y AS, respectivamente (Niki *et al.*, 1998). Contario a lo antes mencionado, existen reportes que evidencian interacciones sinérgicas entre el AS y AJ (Bari y Jones, 2009) además de que algunos genes pueden ser inducidos similarmente por el AS y AJ (Díaz-Puentes, 2009).



## Cuantificación de Fenoles Totales

La aplicación de los tratamientos no estimuló la acumulación de compuestos fenólicos ya que no se observaron diferencias significativas entre las plantas tratadas y las del Testigo (Figura 3).



**Figura 3.** Producción de Fenoles totales en hojas de papa en diferentes tiempos. T1=*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*, T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua).  
\* Sin diferencia significativa entre tratamientos

El contenido de fenoles totales en plantas de papa puede variar de 0.3 hasta 78 mg/g PS (Rumbaoa *et al.*, 2009; Stushnoff *et al.*, 2010). Estos metabolitos secundarios son sintetizados a través de la ruta de los fenilpropanoides y la PAL es una enzima clave en su síntesis (Trotel-Aziz *et al.*,

2008). A bajas concentraciones los compuestos fenólicos constituyen señales moleculares, mientras que a altas concentraciones pueden actuar como compuestos alelopáticos o antimicrobianos (De la Noval y Pérez, 2004).

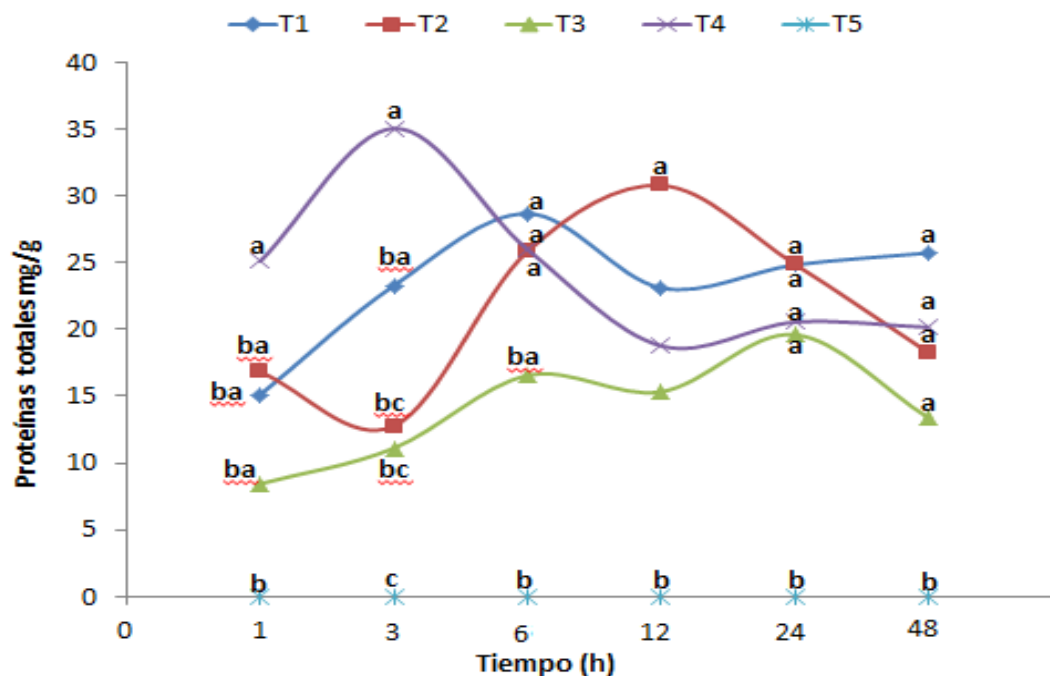
En esta investigación, se detectó actividad enzimática PAL en todos los tratamientos excepto en el Testigo, lo que debería reflejar un incremento significativo en la cantidad de fenoles totales de las plantas tratadas, sin embargo, se observó lo contrario. Este comportamiento puede deberse por un lado a que la actividad de la PAL no fue suficientemente alta para estimular una producción significativa de compuestos fenólicos. Por otro lado, la inducción de la síntesis de fenoles podría llevar a un aumento de los mismos en un período de tiempo más extenso que el evaluado en este estudio (48 h), tal como lo observado por Akram *et al.*, (2013b) que obtuvieron un incremento significativo en el contenido de fenoles totales en plantas de tomate tratadas con *B. thuringiensis* hasta el día 15 posterior al tratamiento. Sin embargo, también podría descartarse la necesidad de períodos extensos como factor condicionante para la acumulación de fenoles, tal como lo demostraron Robledo *et al.* (2012) cuando realizaron la aplicación de una variedad de fungicidas químicos a tubérculos de papa al momento de la siembra con una posterior aspersión al follaje un mes después; los resultados obtenidos por estos autores no mostraron diferencia significativa en la acumulación de fenoles totales entre los tratamientos y el Testigo durante los muestreos realizados a lo largo de 9 semanas, lo cual atribuyeron a que los fungicidas no estimularon las reacciones de defensa que involucran fenoles.

Los fenoles tienen la capacidad de formar complejos con proteínas y mucopolisacáridos, por lo que pueden inactivar las enzimas utilizadas por los patógenos para invadir la célula (Maestro-Durán *et al.*, 1993). Con sustento en lo antes mencionado, es probable una posible unión de los fenoles con las proteínas de los microorganismos presentes en los tratamientos lo cual inactivó a dichos compuestos fenólicos y ocasionó que resultara imposible detectar incrementos significativos en la concentración de éstos obteniendo cantidades similares a las del Testigo. Además, los fenoles pueden ser oxidados por enzimas como la polifenol oxidasa, peroxidasa y la PAL formando quinonas mismas que se unen covalentemente a las proteínas de la hoja exhibiendo toxicidad directa contra herbívoros (Rashid *et al.*, 2012), lo que sugiere una probable razón más que podría justificar el hecho de no detectar una acumulación de fenoles en la planta por la acción de inductores bióticos y abióticos.

### **Cuantificación de Proteínas**

En la Figura 4, se presentan los resultados obtenidos en la concentración de proteínas totales, en ésta gráfica, en el Testigo no se presentan niveles de proteínas debido a que los cálculos se realizaron de manera cinética, es decir, a la concentración obtenida en cada tiempo de muestreo de los tratamientos, se

le restó el promedio del tiempo cero (muestreo antes de la aplicación) de cada tratamiento.



**Figura 4.** Producción de proteínas totales en hojas de papa en diferentes tiempos. T1=*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*, T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua). Letras diferentes indican diferencias significativas

En la primera hora de muestreo, el tratamiento que mostró diferencia significativa respecto al Testigo fue el T4 Milor® con 25.125 mg/g PS, esta concentración incrementó y alcanzó el pico máximo de producción de todo el ensayo con este tratamiento a las 3 h de muestreo (35.06 mg/g PS). La estimulación en la producción de proteínas por acción de los agentes biológicos empieza también a las 3 h con el T1 (*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*) que de igual forma mostró diferencia estadística comparado con el Testigo (23.29 mg/g

PS). A las 6 h los tratamientos T1, T2 y T4 son diferentes al Testigo; mientras que a las 24 y 48 h los 4 tratamientos mantienen concentraciones de proteínas totales mayores a las del Testigo y estadísticamente iguales entre ellas.

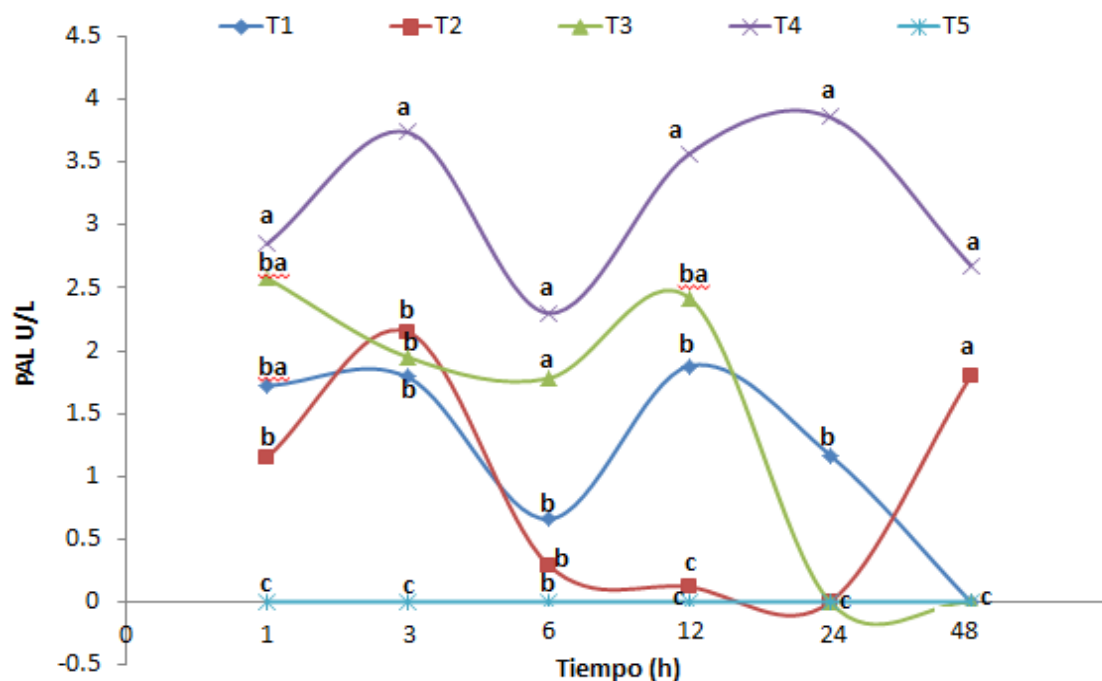
Las proteínas son importantes macromoléculas que participan en todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Tienen diferentes funciones biológicas: presentan actividad catalítica como las enzimas, actúan como proteínas de transporte, proteínas nutrientes y de reserva, proteínas contráctiles o que proporcionan motilidad, como proteínas estructurales, reguladoras o de defensa (Adnan, 2010).

El incremento de la lignificación (que involucra a las enzimas PAL y peroxidasa) unido al entrecruzamiento de las proteínas estructurales que ocurre ante el ataque por patógenos, causan el reforzamiento de las paredes haciéndolas resistentes ante el ataque por las enzimas hidrolíticas de origen microbiano (Brisson *et al.*, 1994). Mediante este mecanismo se limita la diseminación del patógeno en el tejido vegetal, restringiéndolo a la célula huésped, en la cual se induce la muerte celular hipersensitiva.

### **Actividad Fenilalanina Amonio Liasa**

Se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos y el Testigo absoluto. Todos los tratamientos indujeron la activación de la enzima PAL,

mientras que en el Testigo no se detectaron estos niveles enzimáticos. Transcurridas 3 h desde la aplicación, el mejor tratamiento fue el T4 Milor®, sin embargo los tratamientos biológicos T1 (*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*), T2 (ácido jasmónico de origen microbiano 1500 ppm) y T3 (T1 + T2) también mostraron incrementos significativos comparados con el Testigo (Figura 5). A las 6 h, T3 y T4 permanecieron como los mejores tratamientos, el T4 mantuvo una tendencia en los niveles de la PAL y fue el único que indujo la producción de esta enzima durante todo el período de ensayo (48 h).



**Figura 5.** Actividad enzimática PAL en hojas de papa en diferentes tiempos. T1=*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*, T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua). Letras diferentes indican diferencias significativas

La PAL es una enzima muy importante en las plantas, cataliza la desaminación de la fenilalanina a ácido trans-cinámico que es el precursor común de la biosíntesis de derivados fenólicos que son esenciales para el desarrollo adaptativo, vascular y reproductivo de las plantas (Jones, 1984). Muchos de estos compuestos fenólicos desempeñan papeles importantes en la repuesta de defensa de la planta, como es el caso de las fitoalexinas, los compuestos estructurales de la pared celular o moléculas señalizadoras como ácido salicílico (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996).

La síntesis de AS por efecto del T4 Milor®, claramente involucra la PAL y se lleva a cabo por la ruta dependiente de esta enzima ya que este tratamiento mantuvo la producción de AS durante más de 24 h, mientras que el mismo tratamiento estimuló en la planta la PAL durante 48 h.

Muchas sustancias de naturaleza químicas han sido estudiadas como posibles elicitores, por ejemplo el ácido oxálico y el cloruro de calcio que aumentan la defensa relacionada con las enzimas PAL,  $\beta$ -1,3-glucanasa, peroxidasa y polifenoloxidasas reduciendo la incidencia de la enfermedad causada por *Alternaria alternata* en peras (Tian *et al.*, 2006). De igual forma, la disminución de las enfermedades mediante la aplicación del inductor químico ASM es asociada con la activación de la peroxidasa, quitinasa y la fenilalanina amonio liasa (Bi *et al.*, 2006).

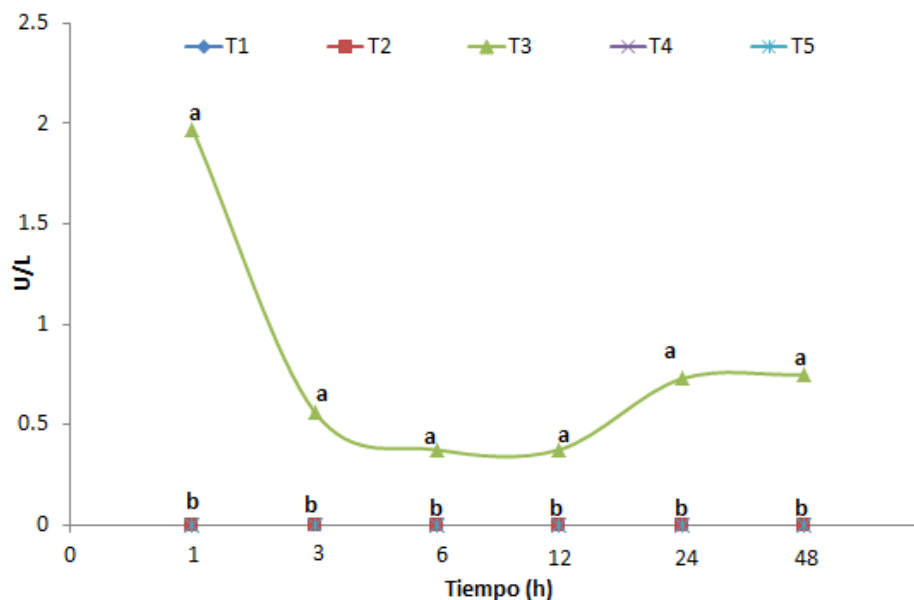
Algunas cepas de *Bacillus* activan la RSI en plantas con lo que contribuyen en el efecto protector contra fitopatógenos, y aunque existe poco conocimiento

acerca de la variedad de elicitores responsables de la RSI producida por cepas de *Bacillus*, se ha identificado al polipéptido surfactina como el principal compuesto que estimulan las respuestas inmunes de las plantas (Cawoy, 2014). De esta forma, la aplicación de *Bacillus thuringiensis* en plantas de tomate incrementa la actividad PAL 1.8 veces más comparadas con las plantas no tratadas (Akram *et al.*, 2013b). Trotel-Aziz *et al.*, (2008) encontraron que con la aplicación de *Bacillus subtilis* en plántulas de uva se lograron incrementos desde las 2 h posteriores a la inoculación en la actividad PAL, alcanzando la máxima producción a las 8 h con concentraciones hasta 5 veces más altas en plántulas tratadas que en las no tratadas, mientras que con la inoculación de *Pseudomonas fluorescens*, lograron a las 6 h concentraciones de PAL 4 veces más altas que el testigo.

### **Actividad Peroxidasa**

En este ensayo no se detectó actividad POD en las plantas del Testigo. De los tratamientos, el único capaz de inducir la producción de la enzima fue el T3 (T1= *Bacillus* spp. y *P. fluorescens* + T2= AJ de origen microbiano 1500 ppm). La actividad enzimática se detectó durante todos los muestreos realizados (1, 3, 6, 12, 24 y 48 h), los niveles alcanzados estuvieron entre 0.37 y 1.97 U/L (Figura 6).





**Figura 6.** Actividad enzimática Peroxidasa en hojas de papa en diferentes tiempos. T1=*Bacillus* spp. y *P. fluorescens*, T2=ácido jasmónico 1500 ppm, T3=mezcla T1 0.5% + T2 0.1%, T4= Milor® y T5=testigo absoluto (agua). Letras diferentes indican diferencias significativas

La peroxidasa, es una enzima que cataliza la oxidación de importantes compuestos fenólicos de la pared celular e induce la formación de polímeros de lignina vía actividad peroxidasa (Bolwell *et al.*, 1995). Las funciones fisiológicas de las peroxidasas son muy variadas y específicas del tejido en el que se producen, están involucradas en diferentes procesos fisiológicos de las plantas, algunos de ellos propios del desarrollo, otros inducidos por estrés biótico o abiótico. Entre los procesos que involucran la enzima están: regulación hormonal como el catabolismo del ácido 3-indolacético y la biosíntesis de etileno (Ruíz, 1998), oxidación de compuestos tóxicos, mecanismos de defensa, control de elongación celular, polimerización de extensina, entrecruzamiento de

los polisacáridos de la pared celular, biosíntesis de lignina y procesos de suberización (Cuervo *et al.*, 2009).

El T3 indujo resistencia en las plantas por el aumento de enzimas relacionadas con la defensa, en este caso peroxidasa. Múltiples cepas de *Bacillus* spp. han demostrado estimular las respuestas de defensa de las plantas, esta capacidad para elicitar la RSI está relacionada con la producción de ciertos polipéptidos como las surfactinas y fengicinas que están involucrados en el proceso de elicitación (Ongena, 2007). Se ha observado que con la aplicación de la rizobacteria promotora del crecimiento *Bacillus subtilis* en plantas de tomate se induce defensa sistémica en las plantas con el aumento en los niveles de enzimas relacionadas con la respuesta defensiva como peroxidasa. La inoculación de *Bacillus thuringiensis* en plantas de tomate incrementa significativamente el contenido de peroxidasa (1.4 veces más que las plantas no tratadas con la bacteria) después de 5 días de inoculación induciendo resistencia sistémica en las plantas y mostrando un control efectivo contra la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; lo anterior se atribuye a que esta enzima está involucrada en la oxidación de fenoles a quinonas altamente tóxicas, por lo que a esta enzima se le relaciona con la resistencia a enfermedades (Akram, *et al.*, 2013b). De igual forma, la inducción de peroxidasa enzima por acción *P. fluorescens* contenida en el tratamiento puede ser explicada por la presencia de lipopolisacáridos en la pared celular de esta bacteria y que actúan como elicitors en plantas (Vidhyasekaran, 2004).

## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en las que se desarrolló esta investigación podemos concluir que:

La aplicación de agentes bióticos y abióticos estimuló los mecanismos de resistencia en plantas de papa provocando un aumento en las defensas bioquímicas de las mismas.

La producción de ácido salicílico fue inducida con la aplicación de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* (T1), así como con el fungicida Milor® (T4).

La producción de ácido jasmónico y proteínas totales fue estimulada con la aplicación de todos los tratamientos.

La producción de la enzima fenilalanina amonio liasa fue activada con la aplicación de los tratamientos a base de ácido jasmónico de origen microbiano (T2), mezcla de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* + ácido jasmónico de origen microbiano (T3) y con el Milor® (T4).

La producción de la enzima peroxidasa fue inducida únicamente con la mezcla de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* + ácido jasmónico de origen microbiano (T3).

La aplicación de los tratamientos no activó la producción de fenoles totales en las plantas.

## LITERATURA CITADA

Abd-El-Kareem, F., Abd, M.A. and El-Mohhamedy, R.S.R. 2001. Induced Resistance in Potato Plants for Controlling Late Blight Disease under Field Conditions. *Egypt. J. Phytopathol.* Vol. 29, No. 2, pp. 29-41.

Abo-Elyousr, K.A.M., Hussein, M.A.M., Allam, A.D.A. and Hassan, M.H. 2007. Salicylic acid induced systemic resistance on onion plants against *Stemphylium vesicarium*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 00(0): 1-9.

Adnan, A. 2010. <http://www.biotecharticles.com/Others-Article/Biological-Functions-of-Proteins-453.html>

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Department of Plant Pathology University of Florida. 5<sup>th</sup> ed

Ahmed F. El-Bebany , Lorne R.A. and Fouad, D. 2013 Differential accumulation of phenolic compounds in potato in response to weakly and highly aggressive isolates of *Verticillium dahliae* , *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35:2, 232-240

Akram, W., Anjum, T., Ali, B. and Ahmad, A. 2013(a). Screening of native bacillus strains to induce systemic resistance in tomato plants against fusarium wilt in split root system and its field applications. *Int. J. Agric. Biol.*, 15: 1289–1294

Akram, W., Mahboob, A. and Ali Javed, A. 2013(b). *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 3(4), pp. 275-280

Alizadeh, H., Behboudi, K., Ahmadzadeh, M., Javan, N.M., Zamioudis, Ch., Pieterse, C.M.J. and Bakker, P.A.H.M. 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control*. Vol. 65, Issue 1 pp.14-23

Al-Mughrabi, K.I. 2008. Salicylic Acid Induces Resistance in Potatoes Against *Rhizoctonia solani*, the Cause of Black Scurf and Stem Canker. *Int. J. Biol. Chem.*, 2 (1): 14-25

Ardila, H., Baquero, B. y Martínez, S. 2007. Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clave (*Dianthus caryophyllus*) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *Dianthi* raza 2. *Rev. Colombiana de Química*, Vol. 36, No. 2

Baenas, N., García-Viguera, C. and Moreno, A.D. 2014. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules* 19, 13541-13563

Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S.P. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726–733

Bari, R. and Jones, J.D.G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69:473-488

Bhattacharya, A., Sood, P. and Citovsky, V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Mol Plant Pathol*. 11(5):705-19

Bi, Y., Ge, Y.H., Li, Y.C., Wang, J.J., Miao, X.Y. and Li, X.W. 2006. Postharvest acibenzolar-S-methyl treatment suppresses decay and induces resistance in Hami melons. *Acta Horticulturae* No. 712 393-400.

Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.I. and Zimmerlin, A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res*. 23(6):517-32

Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Brisson, L. Kjellbom, P. and Lamb, C. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell Wall structural proteins in plant disease resistance, *Plant Cel* 6, 1703-1712

Castro, I. y Contreras, A. 2011. Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa. Imprenta Austral, ValdiviaChile 72 páginas.

Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J. and Ongena, M. 2014. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Mol Plant Microbe Interact*, 27(2):87-100

Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N. and Paulitz, T.C. 1999. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum*. *Eur. J. Pl. Pathol.* 105, 477– 486.

Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z. and Fan, B. 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal Behav.* 4(6):493-496

CONPAPA, 2013. Monografía del cultivo de la papa.

Consumo y mercadeo de la papa en México, 2014. <https://consumoymercadedepapa.wordpress.com/2014/11/28/consumo-y-mercadeo-de-la-papa-en-mxico/>

Coquoz, J.L., Buchala, A.J., Meuwly, P., Metraux, J.P. 1995. Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology* 10:1219–24.

Creelman, R.A. and Mullet, J.A. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 48: 355-381.  
Clarke, J.D., Sigrid, M.V., Ledford, H., Ausubel, F.M. and Dong, X. 2000. Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in *cpr*-Induced Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 12,2175-2190.

Cuervo, D.C. Martínez, S.T., Ardila, H.D. e Higuera, B.L. 2009. Inducción diferencial de la enzima peroxidasa y su relación con lignificación en los mecanismos de defensa del clave (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E. and Ryals, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247–1250.

De la Noval, B. y Pérez, E. 2004. Inducción de respuestas de defensa en la interacción planta-microorganismos (micorrizas arbusculares y Rhizobium). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) ISBN: 959-7023-21-0

Del Río, J.A., Gómez, P., Báidez, A., Fuster, M.D., Ortuño, A. and Frías, V. 2004. Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 87-94.

Devaux, A., Ordinola, M., Hibon, A., Flores, R. 2010. El sector papa en la región andina: Diagnóstico y elementos para una visión estratégica (Bolivia, Ecuador y Perú). Centro Internacional de la Papa.

Díaz-Puentes, L.N. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET* vol. 1, núm. 2, pp. 32-55.  
Estévez-Ochoa, A. 2012. La papa, alimento esencial y saludable. *FEDEPAPA. Rev. PAPA* No. 26 pp. 12-15

Eschen-Lippold, L., Lubken, T., Smolka, U. and Rosahl, S. 2012. Characterization of potato plants with reduced StSYR1 expression. *Plant Signaling & Behavior*, 7:5, 559-562

FAO, s.f. <http://www.fao.org/docrep/w2598s/w2598s06.htm>

Forcat, S., Bennett, H.M., Mansfield, W.J. and Grant, M.R. (2008) A rapid and robust method for simultaneously measuring change in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress, *Plant Methods* 4-16



Frías-Treviño, G.A., Muñoz-Vásquez, J.A., Parga-Torres, V.M., Flores-Ovilas, A. 2001. Reacción de 18 genotipos de Papa (*Solanum tuberosum*) a los Tizones Tardío y Temprano y Evaluación de la Diversidad de Razas de *Phytophthora infestans* en Coahuila y Nuevo León. *Rev. Mex. Fitopatol. Col.* 19, Núm. 1 pp. 19-22

Gado, E.A.M. 2013 Induction of Resistance in Potato Plantys against Bacterial wilt Disease under Egyptian Condition. *J. Appl. Sci. Res.* 9(1):170-177.

Gayoso, M.C., Martínez de Ilarduya, O., Pomar, F. y Merino, F. 2007. Assessment of realtime PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahlia* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology* (118), 199–209.

Ghazanfar, M. Usman; Wakil, Waqas & Sahi, Shahbaz Talib. 2011. Inducción de Resistencia en garbanza (*Cicer arietinum* L.) contra *Ascochyta rabiei* por la aplicación dde productos químicos y extractos vegetales. *Chilean Journal of Agricultural Research* Vol. 71, No. 1, pp. 52-62

Glazebrook, J. 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-227.

Gómez, D.E. y Reis, E.M. 2011. Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Química Viva* Vol. 10/Número 1

González-Morales, S., Pérez-Delgado, H., Benavides-Mendoza, A., Rodríguez Campos, E. y Flores Olivas, A. 2011. Expresión diferencial de genes y metabolitos relacionados a la inducción de defensa relacionada a la aplicación del extracto de *Heliopsis longipes* sobre el patosistema tomate-*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Tesis de doctorado. UAAAN Saltillo, Coah.

Gozzo, F. 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J. Agric. Food Chem.* 51(16):4487-4503

Gutjahr, C. and Paszkowski, U. 2009. Weights in the Balance: Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling in Root-Biotroph Interactions. *MPMI* Vol. 22, No. 7, pp. 763-772

Guzmán, T.E., Díaz, M.D. and Benavides, M.A. 2014. Concentration of Salicylic Acid in Tomato Leaves after Foliar Aspersions of This Compound.. American Journal of Plant Sciences. 5, 2048-2056.

Hennig, J., Malamy, J., Gryniewicz, G., Indulski, J. and Klessig, D.F. 1993. Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. Plant J. 4:593-600.

Huang, Y., Deverall, B.J., Wang, W. and Tang, W.H. 2000. Foliar application of acibenzolar-S-methyl and protection of postharvest rock melons and hami melons from diseases. European Journal of Plant Pathology 106:651-656.

Kramell, R., Miersch, O., Schneider, G. and Wasternack, C. (1999) Liquid Chromatography of Jasmonic Acid Amine Conjugates. Chromatographia Vol. 49, No. ½

Jones, D.H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. Phytochemistry (23), 1349-1359.

Kamble, A., Koopmann, B. y von Tiedemann, A. 2013. Induced resistance to *Verticillium longisporum* in *Brassica napus* by  $\beta$ -aminobutyric acid. Plant Pathology (62), 552–561.

Kuc, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. Eur. J. Plant Pathol. 107, 7–12.

Kunkel, B.N. y Brooks, D.M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Curr. Opin Plant Biol. 5(4) 325-331.

Kwack, M.S., Park, S., Jeun, Y. and Kim, K.D. 2002. Selection and efficacy of soil bacteria inducing systemic resistance against *Colletotrichum orbiculare* on cucumber. Mycobiology 30, 31–36

Lozoya-Saldaña, H. 2010. Generalidades sobre las enfermedades de la papa. XIII Congreso Nacional de la papa. Tapalpa, Jalisco, Mex.

Madriz-Ordeñana, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas No. 63 p.22-32

Maestro-Durán, León, R. y Ruíz-Guiérrez, V. 1993. Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. *Rev. Grasas y Aceites* Vol. 44 Fasc. 6

Makkar H.P.S., Blümmel, M., Borowy N.K. and Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J Sci Food Agric* 61:161-165

Mauch-Mani, B; Métraux, JP. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82:535-540

Mauch-Mani, B. y Slusarenko, A.J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* (8), 203-212.

Méndez, L.W., Arauz, L.F. y Riós, R. 2010. Evaluación de fungicidas convencionales e inductores de resistencia para el combate del mildiú veloso (*Pseudoperonospora cubensis*) en melón (*Cucumis melo*). *Agronomía Costarricense* 34(2): 153-164

Metraux, J.P., Singer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004–1006

Mogollón, O.A. y Castaño, Z.J. 2011. Efecto de inductores de resistencia en plántulas de plátano dominico-hartón (*Musa balbisiana* AAB) contra *Mycosphaerella* spp. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Nat.* vol. 35 no. 137

Montesdeoca, F., Panchi, N., Navarrete, I., Pallo, E., Yumisaca, F., Taípe, A., Espinoza, S. y Andrade, P. J. 2013. Guí fotográfica de las principales plagas del cultivo de papa en Ecuador. Centro Internacional de la Papa

Mostafa, M.H. and Gado, E.A.M. 2007. Inducing Resistance in Potato Plants against Late Blight Disease in Relation to Elicitation of Phytoalexins. *Egypt. J. Phytopathol.*, Vol. 35, No. 2, pp. 11-22

Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. and Wasternack, C. 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol.* 140:249-262.

Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T. and Samiyappan, R. 2000. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 33 Issue 4-5

Navarre, D.A. and Mayo, D. 2004. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64, 179-188

Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N. and Ohashi, Y. 1998. Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. *Plant Cell Physiol.* 39(5): 500-507

Obledo, E.N., Hernández-Rosales A.S., López-Orué, M.L. 2004. Extractos vegetales, una opción en el control de la Sigatoka negra. XVI Reunion Internacional ACORBAT. Oaxaca. México.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L. and Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants.

Orta, A.L. 2002. Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. *Fitosanidad*, vol. 6, núm. 3, pp. 55-62

Pensado, M.I. 2014. Evaluación de Biolet en la resistencia de tomate a *Phytophthora infestans*. Universidade da Coruña

Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8, 1225–1237.

Rashid, W.A., Gabriel, P.M., Ahmad, T., Ahad, B.A. Hussain, B., Ignacimuthu, S. and Chand, S.H. 2012. Mechanisms of Plant Defense against Insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior* Vol. 7 Issue 10

Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:439-463

Rasmussen, J.B., Hammerschmidt, R. and Zook, M.N. 1991. Systemic Induction of Salicylic Acid Accumulation in Cucumber after Inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 97, 1342-1347

Renga, R.J., Kulothungan, S., Kumaran, E., Senthil, P.S., Arun, P. and Shanmugaraju, V. 2015 Optimization of salicylic acid production by *Pseudomonas fluorescens* for the control of *Alternaria alternata* leaf spot in tomato plant. *SIRJ-APBBP* Vol.2 Issue 1

Reymond P., Weber, H., Damond, M. and Farmer, E.E.. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:707-19.

Riveros-Angarita, A.S. 2010. Inducción de resistencia en plantas. Interacción: Planta-Patógeno. ISBN 978-92-9248-185-8

Robledo, E.M.N., Lozoya, S.H. y Colinas, L.M.T. 2012. Inducción de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.) contra *Phytophthora infestans* Mont. De Bary por fungicidas. *Interciencia* Vol. 37 No. 9

Rodríguez, P.A.T., Ramírez, A.M.A., Cárdenas, T.R.M., Falcón, R.A. y Bautista, B.S. 2006. Efecto de la Quitosana en la Inducción de la Actividad Específica de Enzimas Relacionadas con la Defensa y protección de Plántulas de Arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc. *Rev. Mexicana de Fitopatología*, vol. 24, núm. 1, pp. 1-7

Ruíz, D.F.J. 1998. Tesis doctoral. Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa ligninolítica. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas.

Rumbaoa, R.G.O., Cornago, D.F. and Geronimo, I.M. 2009. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *J Food Compos Anal.* 22, 546-550

Saikia, R., Singh, T., Kumar, R., Srivastava, J., Srivastava, A.K., Singh, K. and Arora, D.K. 2003. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbiol. Res.* 158, 203-213

Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M.A. Oliveira, E. and Trillas, I. 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7, 3943-3952.

SIAP, 2013. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

Sifuentes-Ibarra, E. y Macías, C.J. 2014. Requerimientos nutricionales de las principales variedades de papa en Sinaloa. INIFAP Campo Experimental Valle del Fuerte.

Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, M.C., Korzelius, J.P., Van-Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X. and Pieterse, C.M.J. 2003. NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate- Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell*, Vol. 15, 760-770

Strobel, N.E. and Kuc, J.A. 1995. Chemical and Biological Inducers of Systemic Resistance to Pathogens Protect Cucumber and Tobacco Plants from Damage Caused by Paraquat and Cupric Chloride. *Phytopathology* 85:1306-1310

Stushnoff, C., Ducreux, L.J.M., Hancock, R.D., Hedley, P.E., Holm, D.G., McDougall, G.J., McNicol, J.W., Morris, J., Morris, W.L., Sungurtas, J.A., Verrall, S.R., Zuber, T. and Taylor, M.A. 2010. Flavonoid profiling and transcriptome analysis reveals new gene-metabolite correlations in tubers of *Solanum tuberosum* L. *J Exp Bot.* 61, 4, 1225-1238

Swain, T. and Hillis, E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10:63-68.

Thakur, M. and Singh, S.B. 2013. Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. ISRN Biochemistry, ID 762412.

Tian, S.P., Wan, Y.K., Qin, G.Z. and Xu, Y. 2006. Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 729-734.

Tomasini, C.A. s.f. Los hongos filamentosos, su importancia de estudio y de aplicación industrial. Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas, UAM-Iztapalapa

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S. and Aziz, A. 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany* 64:21-32.

Van Loon, L.C. 2000. Systemic Induced Resistance. In: Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S., Van Loon, L.C. (Eds) Kluwer Acad Publ. Dordrecht pp. 521–574.

Ventura-Aguilar, R.I. 2013. Tesis doctoral. Efecto del envasado en atmósferas modificadas en la capacidad antioxidante de dos cultivares de nopal verdura. Universidad Autónoma metropolitana, México, D.F.

Vidhyasekaran, P. 2004. Concise encyclopedia of plant pathology. Food Products Press & Haworth. Reference Press of Haworth Press, pp246-252.

Walters, D., Walsh, D., Newton, A. and Lyon, G. 2005. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance Elicitors. *Phytopathology*, **95**: 1368-1373.

Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F.M. 2002. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 29;414 (6863):562-5

Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T.M.A., Kleier, D.A. and Raskin, I., 1991. Salicylic-acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3, 809–818.

Yang, H.R., Tang, K., Lui, H.T. and Huang, W.D. 2011 Effecto of salicylic acid and jasmonic acid-related defense response of peaseedlings to wounding. *Scientia Horticulturae* Vol. 128, Issue 3

Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, I. 1999. Induction of Defense responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (3):1061

Yoshioka, K., Nakashita, H., Klessig, D.F. and Yamaguchi, I. 2001. Probenazole induces systemic acquired resistance in Arabidopsis with a novel type of action. *Plant J.* 25(2):149-157.