

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” EN
EL CULTIVO DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* L.)

Tesis

Que presenta JUAN MAYO HERNÁNDEZ

como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

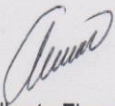
Saltillo, Coahuila

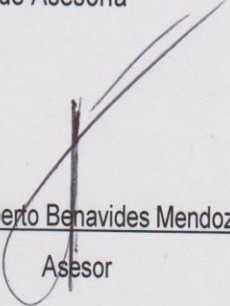
Diciembre 2015

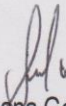
INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" EN EL
CULTIVO DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* L.)


Tesis


Elaborada por JUAN MAYO HERNÁNDEZ como requisito parcial para obtener el
grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría


Dr. Alberto Flores Olivas
Asesor Principal


Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor


Dra. Susana González Morales
Asesor


Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor


Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado
UAAAN

Agradecimientos

A DIOS por darme la oportunidad de vivir y fuerzas por haberme permitido cumplir una meta más en la vida.

Al **CONACYT** por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

A MI ALMA MATER por brindarme una vez más las facilidades para la culminación de un posgrado.

Al **comité de asesores**: Dr. Alberto Flores Olivas, Dra. Susana González Morales, Dra. Yisa María Ochoa Fuentes y Dr. Adalberto Benavides Mendoza, por su paciencia y apoyo que me brindaron para que este trabajo se haya realizado y a todos los maestros y personas que con sus contribuciones intelectuales y en especie hicieron posible la realización de este trabajo.

A la M.C. Ema Laura y M.C Williams por el apoyo profesional y moral, por esos momentos de risas.

A MIS AMIGAS: Mary, Belli, Dulce, Iris y Natty. Que estuvieron presentes en todo momento dándome ánimos.

A mis amigos y compañeros del posgrado, Agustín, Esmeralda, Mariana, Diana, Cristy, Aidée, Iñaky, Roberto, Julia, Yuria, Reyna, Denis, Karla, Poncho, Héctor, Irving, Julio, Jorge, Oscar Ángel y demás que manera alguna y amable contribuyeron y compartieron su experiencia y conocimiento para que este trabajo lograr culminarse.

Dedicatoria

A MIS PADRES por darme esta maravillosa vida de la cual poseo, y las fuerzas para salir adelante.

A mi padre Bartolo Mayo Tornés por ser un gran hombre y amigo que Dios puso en mi camino, por aconsejarme siempre para salir adelante en la vida, porque siempre le ha luchado a la vida para darle lo mejor a sus hijos y que nunca se duerman con hambre.

A mi madre Marcelina Hernández Manzanarez por ser una gran mujer que ha tenido la paciencia de darles amor, cariño y comprensión a sus hijos, porque siempre está pendiente de que sus hijos no tengan hambre.

A MIS HERMANOS: Harley, Osiris, Yohana, Vercely, Halely, Britel, Eliel, Heynner y Hervyn que siempre han estado brindándome cariño, comprensión, alegría y entusiasmo.

A MI ABUELA Francisca Manzanarez Conde por esos consejos, cariño y comprensión que algún día me dio.

AL LIC. FRANCISCO JAVIER MAYO ANGEL por el apoyo moral brindado durante la estancia en el posgrado. Gracias Mayo

AL PROFESOR OMAR PRESTEGUÍ VALENTE por las palabras de aliento que siempre me daba.

Índice General

	Página
Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Lista de cuadros.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
El cultivo de la papa.....	3
Principales plagas y enfermedades de la papa.....	3
“ <i>Candidatus Phytoplasma americanum</i> ”.....	4
Origen y características de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”.....	4
Ubicación taxonómica de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”.....	6
Importancia económica.....	6
Transmisión.....	6
Epidemiología.....	7
Métodos de diagnóstico.....	7
Diagnóstico Macroscópico.....	7
Diagnóstico Microscópico.....	8
Diagnóstico Bioquímico.....	9
Diagnóstico Molecular.....	9
Manejo.....	10
Cultural.....	10
Biológico.....	10
Químico.....	10
Desarrollo de variedades resistentes.....	11
Inducción de resistencia en plantas.....	11
Resistencia sistémica adquirida (SAR).....	12
Resistencia sistémica inducida (ISR).....	13

Compuestos relacionados a la resistencia.....	14
Fenilalanina amonio liasa (PAL).....	15
Peroxidasa.....	15
Fenoles totales.....	16
Inductores de resistencia.....	17
Alcamidas Naturales.....	19
Producto prototipo.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Ubicación del experimento.....	22
Obtención de material biológico.....	22
Obtención de psílicos.....	22
Obtención de minitubérculos.....	22
Obtención del extracto de <i>Heliopsis longipes</i>	23
Detección de “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ” y “ <i>Candidatus Phytoplasma americanum</i> ”.....	23
Desarrollo del experimento bajo condiciones de invernadero.....	24
Siembra.....	24
Tratamientos.....	24
Inoculación.....	25
Aplicación de tratamientos.....	25
Muestreo.....	25
Actividad de enzimas relacionadas a la resistencia.....	26
Determinación de la actividad Fenilalanina Amonio Liasa.....	26
Actividad Peroxidasa.....	26
Cuantificación de Proteínas.....	27
Determinación de compuestos fenólicos.....	27
Parámetros químicos.....	28
pH.....	28
Sólidos solubles totales (°BRIX).....	28
Vitamina C.....	28
Parámetros de calidad.....	28
Firmeza.....	29
Diámetro polar y ecuatorial.....	29
Peso y numero de tubérculos por planta.....	29

Respuesta fenotípica a “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ”	29
Incidencia y severidad.....	29
Diseño de estudio y análisis estadístico.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	58
LITERATURA CITADA.....	59
ANEXOS.....	72

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Iniciadores reportados para la amplificación de la región 16SrRNA de CaLso. Mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. Tomado de Flores (2013).....	9
Cuadro 2. Moléculas y/o sustancias inductoras de resistencia y patógenos que controla. Tomado de (Gómez & Reis, 2011).....	18
Cuadro 3. Tratamientos empleados en la inducción de resistencia a “ <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> en plantas de papa”.....	24

Lista de Figuras

Figura 1. Resultados positivos a la presencia de CaLso en <i>B. cockerelli</i> , banda amplificada de 1070pb, utilizando un marcador de peso molecular de 100-3000pb. P1 insectos portadores de bacteria tomados de la colonia establecida.....	31
Figura 2. Resultados negativos a la presencia de CaPa en <i>B. cockerelli</i> . Banda amplificada de 1250 pb utilizando los primers P1/P7 y R16F2n/R16R2.....	32
Figura 3. Cinética de PAL en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma curativa.....	34
Figura 4. Cinética de PAL en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma preventiva.....	35
Figura 5. Cinética de PAL en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma curativa.....	35
Figura 6. Cinética de PAL en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma preventiva.....	36
Figura 7. Cinética de Peroxidasa en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma curativa.....	37
Figura 8. Cinética de Peroxidasa en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma preventiva.....	38
Figura 9. Cinética de Peroxidasa en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma curativa.....	38
Figura 10. Cinética de Peroxidasa en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma preventiva.....	39
Figura 11. Cinética de Proteínas en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma curativa.....	40
Figura 12. Cinética de Proteínas en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma preventiva.....	41
Figura 13. Cinética de Proteínas en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma curativa.....	41

Figura 14. Cinética de Proteínas en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma preventiva.....	42
Figura 15. Cinética de Fenoles totales en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma curativa.....	43
Figura 16. Cinética de Fenoles totales en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma preventiva.....	44
Figura 17. Cinética de Fenoles totales en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma curativa.....	44
Figura 18. Cinética de Fenoles totales en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma preventiva.....	45
Figura 19. pH obtenido en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.....	46
Figura 20. Grados Brix obtenidos en los diferentes tratamientos en tubérculos de papa.....	47
Figura 21. Cantidad de Vitamina C obtenida en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.....	48
Figura 22. Firmeza obtenida en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.....	49
Figura 23. Diámetro ecuatorial en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.....	50
Figura 24. Diámetro polar en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.....	51
Figura 25. Peso obtenido en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.....	52
Figura 26. Número de tubérculos obtenidos por plantas, tratadas con diferentes tratamientos.....	53
Figura 27. Porcentaje de incidencia de punta morada en plantas de papa tratadas con los diferentes productos.....	54
Figura 28. Porcentaje de severidad de punta morada en plantas de papa tratadas con los diferentes productos inductores de resistencia.....	55
Figura 29. Manchado de tubérculos infectados con CaLso y tratados con productos inductores de resistencia.....	56
Figura 30. Prueba de freído con papas infectadas con CaLso y tratadas con inductores de resistencia.....	57

Resumen

INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” EN
EL CULTIVO DE LA PAPA (*Solanum tuberosum* L.)

POR

JUAN MAYO HERNÁNDEZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ALBERTO FLORES OLIVAS – ASESOR

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2015

La falta de control de la enfermedad punta morada de la papa asociada a “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y “*Candidatus Phytoplasma americanum*” ha llevado a un uso desmedido en aplicaciones de plaguicidas; causando contaminación del medio ambiente y aumentando los costos de producción. Las plantas infectadas disminuyen la producción, así mismo la calidad comercial del tubérculo se ve afectada. Una alternativa para el control de esta enfermedad es la estimulación de defensas de la planta contra el patógeno mediante la aplicación de inductores de resistencia. El objetivo de este trabajo fue determinar la inducción de resistencia en plantas de papas infectadas con “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” mediante la aplicación de un producto químico en desarrollo y alcanidas naturales de manera curativa y preventiva a una concentración de 1L/ha y a 350 ppm respectivamente. Se midieron los niveles enzimáticos en respuesta de defensa de la planta contra la bacteria, se realizaron pruebas de calidad en los tubérculos y se evaluó la incidencia y severidad. En esta investigación se utilizaron adultos de *Bactericera cockerelli* positivos a CaLso, analizados mediante una prueba de PCR. Se colocaron 10 insectos en cada planta dentro de una jaula de organza, por un lapso de 24 h, después de este tiempo se retiraron manualmente. Los resultados en las determinaciones enzimáticas mostraron un incremento máximo de Fenilalanina amonio liasa (PAL) de 154.12 U/mg de proteína encontrado en plantas tratadas con el producto prototipo 48 h después de la segunda aplicación de forma curativa. En Peroxidasa (POD) se encontró una actividad específica máxima de 1.3 U/mg de proteína 24 h después de la primera aplicación de manera preventiva de las alcanidas. En proteínas totales se encontró un incremento de 2.4 mg/ml en plantas tratadas con el producto prototipo a las 48 h después de la segunda aplicación de forma preventiva. El contenido de fenoles máximo fue de 0.047 mg/ml 48 h después de la segunda aplicación de forma preventiva del producto prototipo. En incidencia y severidad las alcanidas mostraron un control de 40 y 12% respectivamente. En pruebas de calidad y en control de enfermedad con el producto prototipo se obtuvieron mejores resultados que con las alcanidas.

Palabras clave: enzimas, resistencia, alcanidas, producto prototipo, papa

Abstract

INDUCTION OF RESISTANCE TO “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” IN
POTATO CROP (*Solanum tuberosum* L.)

BY

JUAN MAYO HERNÁNDEZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ALBERTO FLORES OLIVAS –Adviser–

Saltillo, Coahuila

December 2015

The lack of control potato purple top disease associated with "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" and "*Candidatus Phytoplasma americanum*" has led to an excessive use of pesticides applications; causing environmental pollution and increasing production costs. Infected plants decrease production, also commercial tuber quality is affected. An alternative for the control of this disease is the stimulation of plant defenses against the pathogen by applying resistance inducers. The aim of this study was to determine the induction of resistance in potatoes plants infected with "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" by applying a chemical in development and natural alkaloids curative way and preventive way at concentration of 1L / ha and 350 ppm respectively . Enzyme levels were measured in response to plant defense against bacteria, quality tests were conducted in tubers and the incidence and severity were assessed. In this research *Bactericera cockerelli* adults positive to Calso analyzed using a PCR test were used. 10 insects were placed on each floor in a cage organza, for a period of 24 h, after which time they removed manually. The results in enzymatic determinations showed a maximum increase of 154.12 Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) U/mg of protein found in plants treated with the prototype product 48 h after the second application curatively. In (Peroxidase) POD maximum specific activity of 1.3 U/mg protein 24 h after the first application of preventively alkaloids was found. An increase in total protein 2.4 mg/ml in plants treated with the prototype product at 48 h after the second application preventively was found. The maximum content of phenols was 0.047 mg/ml 48 h after the second application preventively prototype product. In the incidence and severity alkaloids control they showed 40 and 12% respectively. In quality testing and disease control with the prototype product were the best results that obtained with alkaloids.

Keywords: enzymes, resistance, alkaloids, prototype product, potato

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) ocupa el quinto lugar en importancia alimenticia, con un consumo anual de 15 kg por persona, superado por el maíz, frijol, arroz y trigo. En nuestro país la producción anual es de 1,678,833.03 ton/año con una superficie sembrada de 61,454.34 hectáreas. Los principales estados productores son: Sonora, Sinaloa, Veracruz, Puebla y el Estado de México, que conforman el 69.3 % de la producción. Este cultivo demanda una gran cantidad de jornales de trabajo durante la siembra, cosecha, comercialización y demás actividades relacionadas con su producción. El cultivo de la papa se ve afectado por diferentes limitantes, costos de producción elevados que oscilan entre 180-200 mil pesos por hectárea. Problemas fitosanitarios como *Phytophthora infestans*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y “*Candidatus* Liberibacter solanacearum” (CaLso). Este último reportado en México en los años 90’s. El principal vector es *Bactericera cockerelli*. En los últimos años esta plaga ha causado reducción de hasta 90% en la producción de papa, además de afectar otras solanáceas. Debido al manchado interno de los tubérculos, las pérdidas pueden ser totales. El manejo fitosanitario principalmente consiste en el control químico del vector con 30 a 70 aplicaciones de insecticida, y en menor proporción el uso de agentes de control biológico (depredadores, parasitoides y entomopatógenos). El uso excesivo de ingredientes químicos es preocupante por el riesgo que representa para los productores, trabajadores, consumidores y el ecosistema.

Por lo anterior se requiere generar alternativas para el manejo de CaLso. Una de las opciones es la inducción de resistencia de la planta al patógeno, sin embargo; existe poca información al respecto. Por lo tanto con este trabajo se pretende generar información que sea útil para el control del patógeno en la planta, reduciendo al mínimo el número de aplicaciones por ciclo del cultivo.

Objetivos

Inducir resistencia en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) a “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y/o “*Candidatus Phytoplasma americanum*”

Objetivos específicos

Inducir resistencia en plantas de papa contra “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y “*Candidatus Phytoplasma americanum*” con el uso de alcalmidas naturales.

Detectar compuestos bioquímicos asociados a la resistencia con el uso de alcalmidas naturales.

REVISIÓN DE LITERATURA

El cultivo de la papa

China se ha convertido en el primer productor de papa al producir 88,350,220 tons, el segundo país productor es India con 42,339,400 tons, mientras que el tercero es Rusia con 32,681,500 tons, el 4º Ucrania y 5º lugar Estados. La papa es una de las principales hortalizas que se producen en México; ocupando el 5º lugar en cuanto a su consumo a nivel nacional. Por su valor nutritivo y energético lo hace un alimento básico y necesario en la dieta de los mexicanos. Su cultivo y las diversas labores que involucra, representa una gran importancia económica y social para 77,800 familias que dependen directamente y alrededor de 8,700 productores que están involucrados en la producción (CONPAPA, 2013). El cultivo de este tubérculo se realiza actualmente en 22 estados de la República Mexicana durante todo el año, siendo los cinco principales estados productores: Sonora, Sinaloa, Veracruz, Puebla y el estado de México con 391 627.89, 295 115.00, 174 238.25, 171 044.58 y 141 279.39 toneladas respectivamente (SIAP, 2014).

Principales plagas y enfermedades de la papa

La producción de papa está influenciada por numerosos factores ambientales. Su desarrollo puede estar afectado por la falta de agua, nutrientes y por la presencia de plagas y enfermedades lo cual provoca la disminución en el rendimiento y la calidad de los tubérculos.

Los principales problemas fitosanitarios a los que se enfrenta la producción de papa son principalmente *Phytophthora infestans*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (CaLso). Esta bacteria es transmitida por *Bactericera cockerelli* Sulc o pulgón saltador, considerándose una plaga de suma importancia al ser vector de la misma (CONPAPA, 2013). Liefting y colaboradores (2009) reportaron que “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” causó pérdidas de

millones de dólares en invernaderos comerciales de tomate en Nueva Zelanda. Así mismo se ha encontrado afectando cultivos de zanahoria (Munyaneza *et al.*, 2010).

“*Candidatus Phytoplasma americanum*”

La bacteria “*Candidatus Phytoplasma americanum*” (CaPa) está asociada a la enfermedad conocida como “punta morada de la papa”, presente en varias regiones de Norte América y México. Por lo menos se conocen tres diferentes cepas que pertenecen a tres diferentes grupos de fitoplasmas (16SrI, 16SrII y 16SrVI) (Lee *et al.*, 2006). Almeyda *et al.*, (2008) mediante pruebas de PCR encontraron que *Bactericera cockerelli* es el principal vector de CaPa. Además de encontrar la presencia de la bacteria en malezas que colectaron en Coahuila y Nuevo León.

Origen y características de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

La presencia en México de la “Punta morada de la papa” (PMP) fue registrada desde 1947 en una fotografía tomada por Niederhauser en la variedad Up-to date en un lote comercial de papa en Silao, Guanajuato [archivo fotográfico del programa nacional de papa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en el Sitio Experimental Metepec]. Sin embargo, fue hasta el inicio de la década de los 90’s cuando el problema se observó de manera continua en la región de Saltillo Coahuila y en los dos años siguientes también se observó en forma extensiva en lotes comerciales de papa en los estados de Guanajuato, México, Puebla y Tlaxcala. Con base en los reportes de la literatura, en aquel tiempo se creyó que el agente causal de la enfermedad era un fitoplasma transmitido por chicharritas; sin embargo, también se observaron en las mismas regiones altas poblaciones del psílido de la papa (*Bactericera cockerelli*, Sulc) (Rubio *et al.*, 2011). En los Estados Unidos de América se encontró en el año 2000 en campos comerciales de papa en Pearsall y en el valle de Texas (Secor y Rivera-Varas 2004). En los Estados Unidos de América y México esta enfermedad ha causado pérdida de millones

de dólares a la industria y a los productores, causando el abandono de campos enteros de papa (Flores *et al.*, 2004). Secor y Rivera (2004) mencionan que las enfermedades “Punta morada de la papa” y el “Permanente del tomate” están relacionadas con la bacteria CaLso. Una nueva especie que no puede cultivarse de forma *in vitro*.

De los géneros reportados; cuatro especies de *Candidatus Liberibacter* afectan cítricos: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (Brlansky *et al.*, 2009), “*Candidatus Liberibacter africanus*” y “*Candidatus Liberibacter americanus*” (Jepson, 2008) que causan la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB o “Dragón amarillo”). Roy y Brlansky (2009) la consideran como la enfermedad más importante a nivel mundial en estos cultivos, transmitidas por transmitidas por *Diaphorina citri* y *Trioza erytraeae*. Liefiting *et al.*, (2009a) reportan una cuarta especie a la que nombraron “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (sin. *psyllauros*), teniendo como hospederos plantas de la familia Solanaceae y Apiaceae y transmitida por *B. cockerelli*. Esta especie no se presenta en plantas de la familia Rutaceae.

Otra especie de *Candidatus Liberibacter* fue encontrada en Texas y California en poblaciones de psílidos de *B. cockerelli*, la cual se nombró “*Candidatus Liberibacter psyllauros*” (CaLps). Los psílidos se colectaron en cultivos de papa y jitomate con síntomas de amarillamiento y se confirmó que *B. cockerelli* es el vector de CaLps (Hansen *et al.*, 2008). Algunos autores mencionan que CaLps está relacionada con CaLso y que probablemente se trata de la misma especie (Munyaneza *et al.*, 2010; EPPO 2011).

“*Candidatus Liberibacter solanacearum*” es una bacteria Gram-negativa, restringida a los tubos cribosos del floema, no cultivable *in vitro* y pertenece al grupo α de la subdivisión *Proteobacteria* (Jagoueix *et al.*, 1994). Al igual que otras especies de “*Candidatus Liberibacter*” bajo microscopía electrónica en plantas infectadas CaLso se observa en forma de varilla (similar a un bacilo), midiendo aproximadamente 0.2 μm de ancho y 4 μm de largo. Su transmisión puede ser por injerto o insectos vectores (Liefiting *et al.*, 2009a; Secor *et al.*, 2009). En México está asociada a la enfermedad “Punta morada de la papa”

(ZC), “Permanente del tomate” y algunos daños en Chile (Munyanza *et al.*, 2007a, 2009a, 2009b).

Ubicación taxonómica de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Phyllobacteriaceae

Género: *Candidatus Liberibacter*

Especie: “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (sin. *psyllauros*) (CAB International, 2015).

Importancia económica

Los campos infectados con CaLso reducen la calidad del producto y valor comercial debido al manchado del tubérculo, causando pérdidas millonarias a la industria de la papa (Secor y Rivera-Varas 2004), abandono de los campos de siembra por la merma en la producción y calidad del cultivo, que pueden alcanzar hasta el 100% (Flores *et al.*, 2004).

Transmisión

“*Candidatus Liberibacter solanacearum*” es transmitida por *Bactericera cockerelli* Sulc o el o el psílido de la papa y/o del tomate, un insecto vector que se alimenta del floema. La presencia de *B. cockerelli* en México fue reportada en 1941 (Caldwell, 1941), siendo hasta 1960 cuando se consideró como una plaga en los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) y Chile (*Capsicum spp.*) (Garzón *et al.*, 1992), sin saber a ciencia cierta su relación con la Punta morada de la papa.

La alimentación del psílido produce amarillamiento de las hojas, entrenudos acortados engrosados, retraso del crecimiento de las plantas y tamaño del fruto reducido (Nachappa *et al.*, 2012). Este daño directo se relaciona con una toxina

salival según Carter (1993). Sin embargo a la fecha no se ha logrado aislar dicha toxina (Rubio *et al.*, 2011). *B. cockerelli* causa daños indirectos al transmitir procariontes, fitoplasmas y recientemente CaLso (Garzón *et al.*, 2005; Secor y Rivera, 2009; Liefting *et al.*, 2009b). Los síntomas del amarillamiento causado por la alimentación del psílido se ven agravados con CaLso al consumir nutrientes de la planta y provocar el debilitamiento de la misma. El periodo de incubación de CaLso es de hasta 24 y un tiempo de transmisión promedio de 15 minutos. La edad fisiológica del vector no es limitante para transmitir CaLso. En ninfas de *B. cockerelli* se necesitan 15 min para su adquisición y 30 min en adultos (Garzón, 2009). Casteel (2012) reporta una eficiencia de transmisión del 100 % en todos los estadios ninfales de *B. cockerelli* y un 78 % en adultos.

Epidemiología

Reportes más recientes mencionan que *B. cockerelli* es el principal vector de CaLso, la cual puede ser transmitida por injerto pero no de manera mecánica. Su dispersión se da de una planta enferma a una sana (Bové, 2006; Tanaka *et al.*, 2007). En zonas donde no se encuentra el vector, no se ha reportado la presencia de CaLso, lo que indica que son áreas delimitadas por las condiciones de desarrollo del insecto (LANREF, 2013). Las temperaturas por debajo de los 17 °C retardan el desarrollo de la bacteria y los síntomas que produce esta enfermedad y por encima de los 32 °C CaLso se ve afectada, debido a su sensibilidad a temperaturas altas (Munyaneza *et al.*, 2011b).

Métodos de diagnóstico

Diagnóstico Macroscópico. Los síntomas característicos en una planta infectada con CaLso varían según la variedad y etapa del crecimiento de la misma, achaparramiento, clorosis y un color morado en las hojas, las láminas foliares se enrollan hacia dentro, entrenudos cortos e hinchados, arrosetamiento, proliferación de yemas axilares, tubérculos aéreos,

oscurecimiento del sistema vascular, tizón en las hojas y muerte temprana de la planta; dependiendo del estado fisiológico en que se presenta la infección, interrupción del crecimiento de los tubérculos, dejándolos deformes y con una mala calidad (Munyanzeza *et al.*, 2007a,b; Liefting *et al.*, 2009b; Secor *et al.*, 2009; Crosslin *et al.*, 2010; Munyanzeza, 2010, 2012).

Los tubérculos con presencia de CaLso muestran lenticelas agrandadas, colapso de estolones, el anillo vascular presenta una coloración marrón, necrosis interna y rayado café claro en el tejido medular (Munyanzeza *et al.*, 2007a). Al momento del freído presentan bandas de color café a claras, a veces presentes en el tubérculo fresco. Estos síntomas pueden desarrollarse en los tubérculos durante su almacenamiento (Munyanzeza *et al.*, 2007a; Secor *et al.*, 2009). Esto está relacionado con la obstrucción de los vasos conductores del floema provocado por la presencia de CaLso. La savia no se transloca normalmente en la planta, sino que se acumula en los plastidios de las células del parénquima en empalizada de las hojas, mientras que a los tubérculos llega en bajas cantidades (Schneider, 1968). Los tubérculos infectados con CaLso generalmente no brotan, y si lo hacen, producen brotes ahilados y plantas débiles, con reducidas posibilidades de supervivencia (Munyanzeza *et al.*, 2007a; Secor *et al.*, 2009).

Diagnóstico Microscópico. En observaciones de microscopía electrónica “*Candidatus Liberibacter*” presenta una morfología en forma de varilla similar a un bacilo. Con mediciones aproximadas de 2-3 μm de largo, 0.2-0.3 μm de ancho, extremos redondeados y con una superficie exterior suave. Por lo cual la pared de peptidoglicanos es apenas visible al no poseer una membrana externa (Tanaka *et al.*, 2007). Es negativa a la tinción Gram y no hay evidencia de pilis o flagelos para su locomoción. Sin embargo en su genoma se encuentran regiones que codifican para proteínas de ensamble de pilis y flagelos. (Lin *et al.*, 2010). Su citoplasma es menos denso con respecto a otras bacterias fitopatógenas y con frecuencia muestran plasmólisis (Jagoueix *et al.*, 1994).

Diagnóstico Bioquímico. “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” es una bacteria de crecimiento obligado, por lo tanto no se puede cultivar en forma *in vitro*. Las pruebas bioquímicas no pueden llevar a cabo (Murray y Schleifer, 1994; Murray y Stackebrandt, 1995).

Diagnóstico Molecular. La detección de CaLso en plantas e insectos es esencial para estudiar la etiología, epidemiología y manejo de la enfermedad (Goolsby *et al.*, 2007). “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” se puede detectar por PCR convencional o PCR en tiempo real con iniciadores que amplifiquen la región del gen 16SrARN (Tabla 1) (Flores, 2013). Con el paso de los años se han diseñado primers específicos (Tabla 1) que solo detectan CaLso y no otro patógeno procariótico (Wen *et al.*, 2009).

Cuadro 1.- Iniciadores reportados para la amplificación de la región 16SrRNA de CaLso. Mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. Tomado de Flores (2013).

Iniciador	Secuencia	Región	Fragmento
OA2	5'-GCGCTTATTTTTAATAGGAGCGGCA-3'	16SrRNA	1160 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3,		
CLi.po.F	5'-TACGCCCTGAGAAGGGGAAAGATT-3	16S rDNA	1070 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3		
ZCf	5'-CGAGCGCTTATTTTT ATTAGGAGC-3'	16S rDNA	1171 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3		
Lp Frag4-1611F	5-GGTTGATGGGGTCATTGAG-3	ISR-parcial	918 pb.
LP Frag 4- 480R	5- CACGGTACTGGTTCATATCGGTC-3	16S rRNA- 23S rRNA	
OA2	5'-GCGCTTATTTTTAATAGGAGCGGCA-3'	16SrRNA	1160 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3,		
Lib16S01F(anidado)	5'-TTCTACGGGATAACGCACGG-3'		580-pb
Lib16S01R	5'-CGTCAGTATCAGGCCAGTGAG-3'		
LsoF	5'-GTC GAG CGC TTA TTTTATA ATA GGA-3'	16SrRNA	1163 pb
OI2c	5, - GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3		
Lso TX 16/23 F	5'-AATTTTAGCAAGTTCTAAGGG-3'	ITS 16S/23S rDNA	383-pb
Lso TX 16/23 R	5'-GGTACCTCCCATATCGC-3'		
PCR EN TIEMPO REAL			
LsoF	5'-GTC GAG CGC TTA TTTTATA ATA GGA-3'		
HLBr	5-GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3		
COX	GTA TGC CAC GTC GCA TTC CAG A		
COXr	GCC AAA ACT GCT AAG GGC ATT C		
Sonda HLBP	56-FAM/AGA CGG GTG AGT AAC GCG/3BHQ-1		
Sonda COX	5-TET/ATC CAG ATG CTT ACG CTG G/3BHQ-2		

Manejo

Para el manejo de CaLso o Punta morada de la papa, se debe considerar como un complejo. Tomando en cuenta el insecto vector y el patógeno que transmite, hospedero y tubérculos usados como semilla. En el control de vectores, se pueden realizar muestreos y monitoreo de los insectos que arriban al cultivo. Para conocer los insectos presentes y la cantidad que ha llegado (Flores, 2013).

Cultural. La siembra de variedades de ciclo corto, uso de trampas con feromonas atrayentes de adultos hembra y macho ayudan a prevenir la aparición de CaLso y su diseminación. La rotación de cultivos de familias diferentes a las Solanaceas ayuda a disminuir la presencia de la bacteria. (Guedot *et al.*, 2010). Demirel y Cranshaw (2006) mencionan que acolchados de plástico de diferentes colores han demostrado disminuir la densidad de poblaciones de *B. cockerelli*.

Biológico. El control biológico como alternativa de manejo de *B. cockerelli* es muy limitado. En los cultivos con presencia del psílido se puede liberar enemigos naturales. Siendo más eficientes larvas de crisopa, coccinélidos, geocóridos, anthocoridos, míridos, nabidos y larvas de sírfidos. Insectos parasitoides como *Tamarixia triozae* (Hymenoptera: Eulophidae) y *Metaphycuspsyllidis* (Hymenoptera: Encyrtidae) (Compere, 1943; Pletsch 1947). En hongos entomopatógenos se ha reportado a *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea*. Esta alternativa puede usarse en sus diferentes instares del insectos vector.

Químico. En el control químico los ingredientes activos más comunes utilizados para el control de *B. cockerelli* son: Thiamethoxam, Thiocloprid, Imidacloprid, Cyfluthrin, Methamidophos, Endosulfan, Spirotetramat, Spinosad. (CONPAPA, 2013; Bayer de México, 2015). Estos insecticidas son de gran utilidad en programas de manejo contra *B. cockerelli*. El uso de entomopatógenos, jabones agrícolas, reguladores de crecimiento de insectos,

insecticidas botánicos y aceites minerales de plantas; es otra táctica de manejo que se incluye en los insecticidas biorracionales (CONPAPA, 2013). Azufre en polvo y sales potásicas de ácidos grasos (jabones insecticidas al 2%) pueden ser útiles contra ninfas, pero el control es poco confiable (Bujanos *et al.*, 2005; Cranshaw, 2007).

Desarrollo de variedades resistentes. Un manejo futuro para esta enfermedad es probablemente el uso de variedades resistentes de papa (Butler *et al.*, 2011). A la fecha no se ha logrado el desarrollo de estas variedades ya sea por mejoramiento genético tradicional o ingeniería genética. (Munyanza *et al.*, 2011). En ausencia de estas variedades tolerantes o resistentes, poca eficacia en el uso de entomopatógenos, enemigos naturales, parasitoides y al uso excesivo de ingredientes químicos para el control del insecto vector de CaLso. La industria agrícola en un esfuerzo por alcanzar un manejo efectivo de la enfermedad, busca potenciar el uso de agentes inductores de resistencia de origen químico o biológico, como las alcaloides naturales que han mostrado inducción de defensa en las plantas contra "*Candidatus Liberibacter solanacearum*", generando remisión de síntomas en tomate y reducción de manchado en tubérculos de papa (Flores, 2013).

Inducción de resistencia en plantas

Las plantas para defenderse disponen de una variedad de mecanismos de defensa que van desde las barreras físicas hasta las reacciones bioquímicas que alertan las células entre sí, produciendo sustancias tóxicas que eliminan o inhiben la colonización por parte del patógeno. Teóricamente, las plantas poseen los genes necesarios para responder a la agresión; esta respuesta puede ser en forma constitutiva, al estar presentes 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 desencadenar umbrales tóxicos de sustancias que bloquean la instalación de la plaga (Stella 2001).

La resistencia a patógenos o plagas puede ser activa o pasiva. Como respuesta pasiva en la pared celular o en los espacios intercelulares están la lignina, la callosa, capas de corcho o suberina, depósitos de gomas, la cutina, glicosidos fenólicos, fenoles, quinonas, esteroides, glicoalcaloides, terpenoides y proteínas (tioninas). La respuesta activa son las que presentan un aumento en concentración después de la infección como son: fitoalexinas, especies activas de oxígeno, activación de la muerte celular programada, radicales libres, los iones calcio, siliconas y silicatos, polifenoloxidasas, fenilalanina amonio liasa, polímeros de pared, lignina, lipoxigenasas, fosfolipas, tioninas, proteínas antimicrobianas, ribonucleasas, proteasas, péptidos y proteínas relacionadas con la patogenicidad, quitinasas y β 1,3-glucanasas, entre otras (Stella, 2001).

La inducción de resistencia puede ser local o sistémica. La resistencia local comienza con una producción de una señal desde la parte infectada y luego se traslada a otra parte de la planta, induciendo o amplificando las reacciones de defensa, para evitar la diseminación y establecimiento del patógeno (Hammerschmidt y Nicholson, 1999). La resistencia sistémica inicia como resistencia local, la cual es iniciada por una bacteria no patogénica. Posteriormente emite un señalamiento a toda la planta consiguiendo una resistencia sistémica. (Conrath *et al.*, 2002). Los dos tipos de resistencia se caracterizan por el tiempo de desarrollo después del tratamiento de inducción, debido a su naturaleza (Taiz y Zeiger, 2007).

Resistencia sistémica adquirida (SAR)

La Resistencia Sistémica Adquirida en plantas es una respuesta de resistencia secundaria inducida después de una respuesta de hipersensibilidad a los patógenos no virulentos (Agrios, 2005). La Resistencia Sistémica Adquirida puede ser activada en varias especies de plantas por medio de patógenos, que causan necrosis y activa la Respuesta de Hipersensibilidad como síntoma de la enfermedad. Se caracteriza por la inducción de proteínas PR y la activación de la ruta de señalización de Ácido Salicílico (AS) (Walters *et al.*, 2007). La señalización emitida activa la defensa local y algunas interacciones gen-por-

gen. Además de que emite la señal ante la presencia de virus, bacterias y hongos fitopatógenos (Custers, 2007; Vlot *et al.*, 2009). La señalización puede ser generada en un lapso de 4-6 horas, pudiéndose detectar en el floema 8 horas después de haberse generado la señalización (Agrios, 2005). La activación de SAR en ausencia o presencia del patógeno confiere una larga duración, a veces durante la vida útil de la planta, siendo eficaz contra un amplio espectro de patógenos, ya que la señal viaja a través del sistema vascular. (Dempsey & Klessig, 2012). De manera molecular SAR se caracteriza por una gran producción de proteínas PR que actúan como señalizadores a larga distancia (Vlot *et al.*, 2009).

Resistencia sistémica inducida (ISR)

La inducción de resistencia sistémica (ISR) en plantas huésped a un amplio espectro de patógenos es un "estado de la capacidad defensiva mejorada" fisiológica provocada por estímulos específicos ambientales, por lo que las defensas innatas de la planta se potencian contra subsecuentes desafíos bióticos o abióticos. Este mayor estado de resistencia es eficaz contra una amplia gama de patógenos y parásitos (Hass *et al.*, 2002; Van, 2000).

ISR es potenciada por rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), de las cuales las mejores cepas caracterizadas pertenecen al género *Pseudomonas* que no causan ningún daño en el sistema radicular de la planta (Van y Glick, 2004). ISR es otra forma de resistencia en la planta. La producción de defensas de la planta aumenta antes de la infección o aplicación de algunos elicitores. La Resistencia Sistémica Inducida sigue la ruta del jasmonato y el etileno al ser activada por una Rhizobacteria y no por un patógeno. ISR y SAR son similares debido a protegen las partes distales de la planta. (Pieterse *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2002). Esta misma respuesta se puede inducir al aplicar ácido β -aminobutírico (BABA) (Custers, 2007).

Compuestos relacionados a la resistencia

Las plantas se encuentran bajo un continuo contacto con otros organismos, las interacciones planta-patógeno pueden presentar varios tipos de asociaciones que dependen principalmente del contenido energético de cada organismo. Por lo tanto y dado que el ataque de patógenos es una condición desfavorable, la planta activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección (Madriz-Ordeñana, 2002). Generalmente, los mecanismos de las plantas están basados en la prevención, tolerancia o resistencia (Thakur, 2007); estos mecanismos se activan de diferente manera, de acuerdo al tipo de patógeno que esté atacando a la planta (necrótrofo o biótrofo) (Jalali *et al.*, 2002). Estos mecanismos pueden ser constitutivos, es decir, mecanismos de defensa que proveen de forma pasiva resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o preformada se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos (barreras físicas) por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros: los mecanismos de defensa químicos constitutivos como la acumulación de compuestos tóxicos en las células de los vegetales (Madrid-Ordeñana, 2002). A diferencia de los mecanismos constitutivos, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados de resistencia inducida, se activan solamente como una respuesta al ataque de patógenos (Collingue *et al.*, 1994).

El mecanismo de defensa activa se basa en la optimización de los recursos de la planta, es decir, invierte sus recursos metabólicos en su desarrollo, crecimiento y multiplicación; en lugar de gastar su contenido energético en sistemas preestablecidos. Este mecanismo se caracteriza por activar un sistema de defensa solo cuando es realmente necesario. La activación de una defensa eficaz por parte de la planta se basa en la rapidez con la que es capaz de reconocer la presencia del patógeno (Fornoni *et al.*, 2004). Esto se logra debido a que las plantas emplean una elevada cantidad de señales originadas por microorganismos y factores del medio ambiente, activando así los mecanismos de defensa. También puede lograrse mediante agentes externos,

como elicitores específicos y no específicos. Ambos tipos de elicitores son los primeros compuestos reconocidos por la planta que se dé la activación de la cascada de señalización y por lo tanto la respuesta de defensa (Ebel y Cosio, 1994). Los elicitores no específicos inducen una respuesta de defensa en un gran número de especies vegetales; mientras que los específicos inducen la reacción de defensa contra un patógeno muy específico, y es producido únicamente por el patógeno.

Fenilalanina amonio liasa (PAL). La fenilalanina-amonio-liasa (PAL, por sus siglas en inglés de Phenylalanine ammonia-lyase) es una enzima constitutiva que actúa en la vía de fenilpropanoide en plantas superiores. Está implicada en la síntesis de fitoalexinas, que son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular. La expresión de PAL puede ser inducida por medio de elicitores como AS y H₂O₂ y su activación genera un aumento en el contenido fenólico en las plantas, lo que sugiere que es una respuesta asociada con la resistencia a enfermedades (Martínez *et al.*, 2001; Van Loon *et al.*, 2006; Sing *et al.*, 2009; Mejía *et al.*, 2013). Esta enzima actúa entre el metabolismo primario y secundario, ya que cataliza el primer paso en la desaminación responsable de la conversión de la fenilalanina (Phe) a ácido transcinámico, el cual es un intermediario de la vía para la producción de flavonoides, cumarinas y ligninas (Zhao *et al.*, 2005; Song y Wang, 2009).

PAL, también participa de modo determinante en la generación de compuestos fenólicos y estructuras de defensa. Es probable que en su regulación esté implicada la interacción contra microorganismos patógenos y que sea clave en la activación de los mecanismos de defensa vegetales ya que es la enzima que regula los diferentes metabolitos obtenidos en la biosíntesis de fenilpropanoides (Ardila *et al.*, 2007).

Peroxidasa. Las peroxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en plantas, microorganismos y animales, donde catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua,

neutralizándolos. H_2O_2 es un producto final común del metabolismo oxidativo, y de ser un agente oxidante fuerte, podría resultar tóxico si se permite que se acumule. Por lo tanto, las peroxidasas sirven para eliminar de las células vegetales el exceso de H_2O_2 , en condiciones normales y bajo estrés (Laloue *et al.*, 1997). Las peroxidasas son encontradas principalmente como hemoproteínas y utilizan el peróxido de hidrógeno como sustrato oxidante. Aunque otras peroxidasas más inusuales han mostrado recientemente contener cualquiera de los iones metálicos, tales como selenio y vanadio, o un grupo prostético flavina. Se han reportado una gran variedad de donantes de electrones, incluyendo aminas aromáticas, fenoles y enedíoles como el ácido ascórbico para detectar la actividad peroxidasas en extractos de las plantas (Bania y Mahanta, 2012). El papel de las peroxidasas en las plantas consiste en lignificación, suberización, la reticulación de la proteína estructural de la pared celular, catabolismo de auxinas, defensa contra patógenos, tolerancia a sales y su implicación en la senescencia (Hiraga *et al.*, 2001).

Fenoles totales. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas, esenciales para su crecimiento, reproducción y en la protección frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa en condiciones de estrés como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Éstos forman un grupo heterogéneo de más de 10 000 compuestos con distintas características y numerosas funciones en plantas, entre las que se encuentran la defensa en las plantas, regulación del metabolismo y la síntesis de la lignina (Taiz y Zeiger, 2006). Este tipo de compuestos son sintetizados por dos rutas: la ruta de ácido malónico, que es importante fuente de fenoles en hongos y bacterias, no lo es tanto en plantas; y la ruta del ácido shiquímico que es la responsable de síntesis de la mayoría de los fenoles en plantas, los cuales derivan de la fenilalanina en una reacción catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL). El incremento en la síntesis de compuestos fenólicos, en algunas especies de plantas está relacionada con la acumulación de AS y el metil jasmonato (Taiz y Zeiger, 2006; García y Rivera, 2011).

Inductores de resistencia

Los elicitores o inductores de resistencia actúan sobre la planta impidiendo o retrasando la entrada del patógeno y limitando consecuentemente su actividad en el tejido u órgano infectado. No tienen efecto directo o actividad específica sobre los fitopatógenos (Gómez & Reis, 2011). Por lo que la aplicación de elicitores exógenos en la superficie de la planta activa múltiples rutas de señalización de defensa intracelular (Holopainen y Blande, 2013) que participan en múltiples sistemas de defensa e inducción de resistencia no específica a varios patógenos.

El origen de los inductores puede ser biótico o abiótico. En inductores de tipo biótico se encuentran, hongos, bacterias, virus, nematodos, insectos, extractos de origen vegetal, exudados de Rhizobacterias, glucanos, liposacáridos, esfingolípidos, quitina, ergosterol, proteínas, péptidos, fracciones de pared celular de hongos, bacterias o células vegetales, fluido de esporas en germinación de hongos y fluido intercelular extraído de plantas infectadas (Stela, 2001; Riveros, 2010). Los inductores abióticos, también denominados inductores químicos, actualmente constituyen una nueva clase de pesticidas, llamados “fungicidas de cuarta generación” por su efecto completamente diferente de los fungicidas conocidos hasta el momento. Aunque en su mayoría son compuestos naturales, de origen biológico, los inductores son sustancias sintetizadas en laboratorio, que se aplican externamente sobre las plantas, inyectadas o asperjadas, siendo una de las formas más comunes de utilización, la aspersión (Cuadro 2) (Pascholati *et al.*, 2008). Su uso fue reportado en numerosas investigaciones, tanto en laboratorio, invernadero y en campo (Riveros *et al.*, 2004). Entre ellos se encuentran: ácidos grasos, glicoproteínas, proteínas, péptidos, glicolípidos, lípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, entre otros (Angarita, 2001).

Cuadro 2. Moléculas y/o sustancias inductoras de resistencia y patógenos que controla. Tomado de (Gómez & Reis, 2011).

Sustancias inductoras	Patógenos controlados
Fosfatos de potasio, sodio o magnesio.	<i>Blumeria graminis</i> sp. <i>Hordei</i> , <i>Sphaerotecafuliginea</i> , <i>Colletotrichum lagenarium</i> , <i>Puccinia sorghi</i> , <i>Exerohilum turcicum</i> , <i>Leveillula taurica</i> , <i>Bremia lactucae</i> y <i>Peronospora parasitica</i>
Fosfitos de potasio o calcio.	<i>Pseudoperonospora</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Albugo</i> , <i>Peronospora</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> y <i>Colletotrichum</i>
Fosetil aluminio	<i>Botrytis</i> spp, <i>Plasmopara</i> spp, <i>Phytophthora</i> spp.
Ácido salicílico	<i>Pantoea</i> , virus, <i>Alternaria</i> , <i>Septoria</i>
Acibenzolar s-metílico	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum</i> y <i>Puccinia helianthi</i>
Ácido jasmónico	<i>Pyricularia grisea</i> , otros.
Etileno	Varios
Ácido β -aminobutírico (ABAB)	Hongos, nematodos, virus y bacterias
Quitosana	<i>Alternaria padwickii</i> , <i>Bipolaris oryzae</i> , <i>Pyricularia grisea</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Sarocladium oryzae</i>
Probenazole	<i>Pyricularia grisea</i> y <i>Xanthomonas oryzae</i>
Extracto de REYSA (<i>Reynoutria sachalinensis</i>)	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> y <i>Leveillula taurica</i>
Anión superóxido y peróxido (ERO)	<i>Meloidogyne incognita</i>
Fragmentos de proteína harpina	<i>Cercospora coffeicola</i> , <i>Monilinia fructicola</i> y <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Bioflavonoides, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, ácidos grasos y azúcares.	Varios
Silicatos de calcio, magnesio, potasio, aluminio o hierro.	<i>Cercospora coffeicola</i>
Provitamina K y derivados hidrosolubles	Hongos y Bacterias

En el mercado se encuentran pocas moléculas activadoras de resistencia en comparación de productos insecticidas, fungicidas o bactericidas. Algunos nombres comerciales de estos elicitores de inducción de resistencia son: Coronalon® (6-ethyl indanoyl isoleucina) Quitosano, Oryzemato cuyo ingrediente activo es el PBZ (3 alilcil-1,2 benzisotiazol-1,1-dioxido), Potafos® K (Fosfanato de potasio), Kendal® (glutati3n, oligosacarinas y saponinas), Mesenger® (Proteinas “harpins”), Biorend® (Poli-D-glucosamina, Quitosano), Fosfimax 40-20® (fosfito), Etefon® (3cido 2-cloroetilfosf3nico), Actigard®, BION® (acibenzolar- S - metil o BTH) y Rezist® (3cido Salicilico) (Tomado de Salgado, 2012).

Alcamidas naturales

Las alcamidas est3n constituidas por la uni3n de un 3cido graso. La longitud de cadena puede ser mediana o larga, dependiendo del n3mero de carbonos, que va de 8 a dieciocho y generalmente es alif3tica o lineal. Se une a una amina que proviene de alg3n amino3cido por descarboxilaci3n al momento de la condensaci3n. Las alcamidas son consideradas como compuestos bioactivos esto es, una peque1a cantidad de estos compuestos presenta una respuesta notable en las c3lulas receptoras. Radicando ah3 su importancia en la variedad de efectos, mismos que dependen de la estructura y el n3mero de enlaces o ligaduras dobles presente. En ra3ces de plantas de *Heliopsis longipes* o “Chilcuague” como se le conoce com3nmente en la sierra gorda de Guanajuato, es de donde se extraen las alcamidas que m3s se utilizan. Dentro de las alcamidas, se encuentra en mayor proporci3n la afinina. Se le atribuye un efecto de insecticida, fungicida, bactericida y anest3sico local. El resto de las alcamidas muestran una actividad fungist3tica y bacteriost3tica de acuerdo a estudios realizados por Gomez *et al.*, (SF).

Las alcamidas son metabolitos secundarios que se encuentran distribuidos en diferentes familias de plantas: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae, and Solanaceae. Varias especies de las familias Asteraceae,

Piperaceae y Rutaceae contienen altos niveles de alcaloides (Christensen y Lam, 1991; Kashiwada *et al.*, 1997; Parmar *et al.*, 1997). Encontrando una mayor cantidad de alcaloides en raíces de *Heliopsis longipes*, siendo su principal constituyente activo, la afinina. La presencia de afinina en raíces es alta, al encontrarse en concentraciones de 1% del peso fresco (Molina *et al.*, 1996). Se ha encontrado que la afinina y otros alcaloides alteran la arquitectura del sistema de las raíces y regula la división celular y procesos de diferenciación en *A. thaliana* (Ramirez *et al.*, 2004).

Se ha probado el potencial de los alcaloides como inductores de resistencia contra insectos, hongos y bacterias, obteniendo importantes logros respecto a la activación de respuestas de defensa (Rivero *et al.*, 2002). La producción de enzimas PAL, POD y otros compuestos relacionados con la defensa como fenoles y proteínas totales ayudan a la planta a reforzar la pared celular en presencia o ausencia del patógeno (Gonzalez, 2011).

Se ha demostrado que concentraciones micromolares de N-isobutil decanamida en cultivos *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*, aplicadas de forma exógena, induce la estimulación de brotes, el crecimiento e incremento en la biomasa de raíces, así como la formación de raíces laterales y elongación de pelos radiculares (Montaño *et al.*, 2006).

Producto prototipo*

Isotianil fue descubierto por Bayer AG en 2003 (actualmente Bayer CropScience) en Alemania como un resultado exhaustivo de una investigación en compuestos a base de isotiazol. Isotianil es considerado un fungicida que induce la resistencia sistémica adquirida (SAR) en plantas. Tiene un excelente efecto preventivo a dosis bajas contra el tizón de arroz (*Magnaporthe grisea*) el cual es un de las enfermedades más severas. Isotianil no mostró una actividad antimicrobial contra diferentes hongos y bacterias, incluyendo *M. grisea* y *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* en medio *in vitro* (Sumitomo Chemical Co., Ltd. 2011). Sin embargo los resultados de pruebas en macetas y en campo indicaron un excelente efecto preventivo sobre la enfermedad en la planta

(Sakuma, 2008, 2009). Al no mostrar una actividad antimicrobial contra hongos y bacterias, se consideró que es un inductor de resistencia y que activa el mecanismo de defensa en la planta (Sumitomo Chemical Co., Ltd. 2011). De acuerdo al FRAC Code List (2015) el modo de acción de Isotianil es la inducción de defensa en la planta, ubicándolo en el grupo químico tiadiazol-carboxamida.

*Nota: Producto químico en desarrollo

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo del experimento consistió en aplicación de alcalmidas naturales y un producto prototipo como inductores de resistencia, en plantas de papa inoculadas con la bacteria “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” (CaLso) y/o “*Candidatus Phytoplasma americanum*” (CaPa), utilizando como vector adultos de *Bactericera cockerelli*. Se caracterizó fenotípicamente la respuesta de las plantas ante la presencia de la bacteria. En los tratamientos de alcalmidas naturales y en el producto prototipo se detectaron compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta de defensa de las plantas.

Ubicación del experimento

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Parasitología Molecular y en el invernadero de Parasitología agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Obtención de material biológico

Obtención de psílidos. Se colectaron adultos de *B. cockerelli* en cultivos de papa de la región infectados con “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” en el ejido El Poleo en Arteaga Coahuila (25°09′58.88” N y 100°47′12.90” O). En plantas de papa y tomate se estableció una colonia de *B. cockerelli* bajo condiciones controladas en una cámara bioclimática de crecimiento en el Departamento de Parasitología, a temperatura de 23 ± 1 °C; con fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad (Levy et al., 2011).

Obtención de minitubérculos. Los minitubérculos se obtuvieron de Agrícola la Agujita, ubicada en Toluca, edo. de México.

Obtención del extracto de *Heliopsis longipes*. El extracto de *H. longipes* se elaboró con raíces secas y molidas de esta planta colectadas en el invernadero de Parasitología agrícola. Para obtenerlo, se usó una proporción de 1:10, esto es 1 g de raíz macerada por cada 9 ml de solvente, el cual fue etanol al 98%. El extracto se obtuvo al exponer el tejido macerado al solvente a temperatura ambiente durante 30 días. El extracto crudo se filtró al vacío con un papel filtro Whatman No. 1 y se concentró en Rotavapor (IKA) a 78°C durante 4h a 150rpm. El concentrado de extracto fue enviado al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) unidad Irapuato, para determinar la concentración de la alcalamida afinina, mediante la técnica de HPLC (González, 2011).

Detección de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y “*Candidatus Phytoplasma americanum*”

Para confirmar la presencia de CaLso y CaPa en psílidos de *B. cockerelli* y su ausencia en los minitubérculos usados para la siembra, se realizó extracción de ADN, con el siguiente procedimiento: 10 adultos fueron macerados en un mortero con nitrógeno líquido al cual se le agregaron 600 µl de buffer de lisis (Tris-HCL 100 mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8.5, NaCl 50 mM, SDS 2%) y se recuperó el macerado en un tubo ependorff de 1.5 mL. Al tubo se le adicionaron 500 µl de cloroformo alcohol isoamilico 24:1, se mezcló durante medio minuto en vortex y se centrifugo durante 15 min a 12 000 rpm. La fase superior del centrifugado se recuperó en un tubo limpio y se le adicionó una cantidad equivalente de isopropanol frío; se dejó reposar en hielo durante 15 minutos y se centrifugo por 10 min a 12 000 rpm. Se desechó la fase acuosa, la pastilla en el fondo del tubo se enjuago dos veces con alcohol al 70%. El ADN fue resuspendido en 50 µl de agua estéril. Para verificar la extracción, el ADN se corrió en un gel de agarosa al 2%.

La amplificación por PCR para CaLso se llevó a cabo con los iniciadores OA2/Oi2c (5'-GCGCTTATTTTAAATAGGAGCGGCA-3') (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3') y CL514F/CL514R (5'-

CTCTAAGATTTTCGGTTGGTT-3') (5'-TATATCTATCGTTGCACCAG-3') que amplifican una región de 1160 y 669 pb. Para CaPa se utilizaron los primers P1 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3') P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'), R16F2n (5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3') y R16R2 (5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3') que amplifican una región de 1250 pb. Las condiciones de la reacción fueron Buffer 1x, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP's 200 µM, Cli.po.F 20 pmole, O12c 20 pmole, Taq 1U y 50 ng de ADN, con un volumen final de 25 µl. El programa de amplificación fue un ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 62°C por 30s y 72°C por 1min, con un ciclo adicional de 72°C por 10 min.

Desarrollo del experimento bajo condiciones de invernadero

Siembra. Los minitubérculos de la variedad Ágata, libres de CaLso se sembraron en macetas con capacidad de 3 kg, con una mezcla de sustrato para germinación (Peat Moss), vermiculita y perlita, en relación 4:3:1. Las macetas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero durante todo el experimento.

Tratamientos. El estudio consistió en siete tratamientos con 15 repeticiones por tratamiento (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Tratamientos empleados en la inducción de resistencia a "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" en platas de papa.

Productos	Tratamientos	Acrónimos	Consistió
Producto prototipo	1	T1	Infestación y aplicación a las 24 h
Alcamida	2	T2	Aplicación e infestación a las 24 h
	3	T3	Infestación y aplicación a las 24 h
	4	T4	Aplicación e infestación a las 24 h
Testigo	5	T5	Infestación y aplicación a las 24 h
	6	T6	Aplicación e infestación a las 24 h
Testigo absoluto	7	T7	Aplicación y sin infestación

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Inoculación. En la Inoculación de plantas se siguió la metodología de Levy *et al.*, 2011 con ligeras modificaciones. Las plantas de papa con 40 días después de la siembra, se inocularon con CaLso y/o CaPa infestándose con 10 psílicos adultos de *B. cockerelli* portadores de la bacteria, durante 24 horas. En los tratamientos del uno al seis, utilizando pequeñas bolsas de organza. Pasadas las 24 horas, fueron eliminados manualmente los adultos así como los huevecillos que depositaron en las hojas.

Aplicación de tratamientos. Se realizaron dos aplicaciones foliares de los productos, el producto prototipo se aplicó a una dosis de 1L/ha en los tratamientos uno y dos, el extracto concentrado de alcamidas a una concentración de 350 ppm de afinina en los tratamientos tres y cuatro, en los tratamientos restantes se les aplicó agua.

La primera aplicación se realizó 40 días después de la siembra. En los tratamientos uno, tres y cinco la aplicación se realizó 24 horas antes de la infestación con *B. cockerelli*. Los tratamientos dos, cuatro y seis la aplicación fue 24 horas después de la infestación con los psílicos, al mismo tiempo el tratamiento 7 se le aplicó agua. La segunda aplicación fue 15 días después de haberse realizado la primera, las plantas contaban con 55 días después de la siembra, cada producto se asperjó con su tratamiento correspondiente.

Muestreo. Se realizaron muestreos a las 12, 24 y 48 horas después de cada aplicación, tomando 20 gramos de tejido vegetal de la parte superior de la planta, los cuales fueron puestos inmediatamente en nitrógeno líquido y congelados a -78°C. Todas las muestras, se trasladaron al Laboratorio de Parasitología Molecular adscrito al mismo Departamento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, donde se procesaron para su análisis respectivo (González, 2011).

Actividad de enzimas relacionadas a la resistencia

Determinación de la actividad Fenilalanina Amonio Liasa. Para la extracción de la enzima se utilizó la metodología usada por Yedidia *et al.*, (1999) con ligeras modificaciones. Se pesaron 500 mg de la muestra macerada con nitrógeno líquido, se le adicionó 1 ml de buffer de fosfatos 0.1M con pH 7.3, se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se recuperó y fue guardado a -70°C hasta su uso.

Para la determinación de la actividad PAL, se tomaron 0.9 ml de L-fenilalanina (1 mg/mL), se le adicionó 0.1 mL de extracto enzimático y se incubó a 40 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 0.25 mL de ácido clorhídrico 5 N, las muestras se colocaron en baño de hielo y se le adicionó 5 mL de agua destilada. Los valores de absorbancia se determinaron a 290 nm. Se definió como una unidad de actividad enzimática equivalente a la producción de 1 mmol de ácido transcinámico producido por minuto por mg de proteínas (Paz *et al.*, 1998).

Actividad Peroxidasa. En la extracción de la enzima se utilizó la técnica de Yedidia *et al.*, (1999) con algunas modificaciones. El extracto enzimático se realizó utilizando 250 mg de material vegetal macerado con nitrógeno líquido, se le adicionó 1 mL de buffer de fosfatos 0.1 M con pH 7.3, se sonicó por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se recuperó para iniciar inmediatamente con la reacción enzimática. Para la cuantificación de la actividad peroxidasa se realizó utilizando 200 µl del extracto enzimático, adicionándole 50 µl de rojo de fenol al 0.2%, se le agregó 930 µl de citrato de sodio 50 mM a pH 4.2, la reacción se inició al agregarle 10 µl de peróxido de hidrógeno, tres minutos después la reacción se detuvo con 40 µl de hidróxido de sodio 2N. La lectura se realizó a 610 nm. La concentración de peroxidasa se calculó con el coeficiente de extinción molar de 22000 M⁻¹cm⁻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).

Cuantificación de Proteínas. En la extracción de proteínas se utilizó la técnica de Yedidia *et al.*, (1999) con algunas modificaciones. El extracto enzimático se realizó utilizando 250 mg de material vegetal macerado con nitrógeno líquido, se le adicionó 1 ml de buffer de fosfatos 0.1 M con pH 7.3, se sonicó por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se recuperó para iniciar inmediatamente con la reacción enzimática.

La concentración de proteínas se determinó siguiendo el método de Bradford (1976). Se empleó una curva patrón a base de albúmina de suero bovino (BSA). La absorbancia fue leída a 595 nm. El contenido de proteínas se expresó en mg de proteínas por gr de masa fresca de tejido.

Determinación de compuestos fenólicos. Para el análisis de las muestras se siguió la metodología descrita por Leighton (2001). Se procedió a obtener el extracto metanólico, pesando 250 mg de muestra macerada en nitrógeno líquido, se agregó 1 ml de metanol al 80%, se agitó en el vortex durante 1 minuto, se procedió a centrifugar a 10 000 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante, al pellet se le agregaron 500 μ l de metanol al 100%. Se agitó en el vortex durante 1 minuto y procedió a centrifugarse a 10 000 rpm durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y se transfirió al tubo que contiene el sobrenadante obtenido en la primera centrifugación, se ajustó el volumen a 2 ml con agua destilada, el tubo con extracto se protegió de la luz y se mantuvo a temperatura ambiente.

Para la determinación de fenoles, se tomaron 200 μ l de extracto, se agregaron 1500 μ l de agua destilada, se agregaron 100 μ l de reactivo Folin-Ciocalteu, se adicionaron 200 μ l de Na_2CO_3 , se agito por un minuto en vortex y se dejó reposar por 30 minutos en obscuridad, posteriormente se leyó a 765 nm. La concentración de fenoles se calculó mediante la ecuación de la recta de una curva de calibración con ácido gálico y se expresó como mg/ml de la reacción final.

Parámetros químicos

Salazar *et al.*, (2008) relaciona un alto pH con la disponibilidad de azúcares en el tubérculo. Los azúcares disponibles son los causantes del quemado cuando las papas son sometidas a freído. La Vitamina C participa en respuesta de estrés biótico y abiótico, el cual actúa como un antioxidante, protegiendo a la célula contra un estrés oxidativo causado por el patógeno o factores ambientales (Noctor y Foyer 1998).

pH. El pH se midió en muestras de la pulpa triturada utilizando un potenciómetro calibrado. Se lavó brevemente el electrodo con agua destilada, se sumergió en el tubérculo triturado en 10 ml de agua destilada. Se realizó la lectura al momento que no se observó variación del pH (Salazar *et al.*, 2008).

Sólidos solubles totales (°BRIX). Los sólidos solubles totales (SST) se determinaron en el sobrenadante de 1.5 g de muestra de papa triturada y centrifugada a 10 000 rpm por 5 minutos. Se colocaron dos gotas del sobrenadante del material centrifugado sobre el prisma del refractómetro y se tomó la lectura después de 1 min (Salazar *et al.*, 2008).

Vitamina C. El contenido de vitamina C en los tubérculos, se determinó con base en el método de titulación de Padayatt *et al.* (2001). Se tomaron 10 g de tubérculo fresco, se maceró con 10 ml de ácido clorhídrico 2 %, se filtró y se aforó a 100 ml con agua destilada en un matraz Erlenmeyer. Con 10 ml del diluido, se tituló con 2,6 diclorofenolindofenol (1×10^{-3} N) y se determinó el contenido de vitamina C con la fórmula:

$$\text{Vit. C (mg * 100 g de PF)} = \frac{(\text{ml de 2,6 diclorofenolindofenol}) (0.088) (\text{volumen total})(100)}{(\text{volumen de la alicuota}) (\text{peso de la muestra})}$$

Parámetros de calidad

En la aplicación de productos para el control de enfermedades, algunos parámetros de calidad e incluso el rendimiento se ven afectados. En cuanto a

las características de calidad determinantes para la comercialización es necesario cumplir con requerimientos ya establecidos (Salazar *et al.*, 2008; Abbasi *et al.*, 2011).

Firmeza (Kg/cm²). Para esta medición se utilizó un penetrómetro digital marca EXTECH®, utilizando la punta de 6 mm de diámetro que trabaja en un rango de 0-1 kg (Abbas *et al.*, 2011).

Diámetro polar y ecuatorial. Para estas mediciones físicas se tomaron todos los tubérculos de papa de cada tratamiento y se midió con un vernier digital electrónico 6" marca TITAN® con apreciación de dos décimas de milímetro (0,00mm), finalmente se obtuvo un promedio de cada tratamiento (Salazar *et al.*, 2008).

Peso y número de tubérculos por planta. Todos los tubérculos obtenidos del experimento fueron pesados y a su vez contabilizados, al final se obtuvo un promedio del peso y número de tubérculos por planta de cada tratamiento (Abbas *et al.*, 2011).

Respuesta fenotípica a “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Una forma de evaluar la resistencia de planta a enfermedad es por medio de los parámetros de incidencia y severidad. Estas mediciones son de manera visual. Se evalúa el tejido dañado por la enfermedad o el tejido sano de la planta.

Incidencia y severidad. Los datos de incidencia y severidad se tomaron 90 días después de la siembra. En incidencia se registró la presencia de síntomas desarrollados por CaLso. La severidad se determinó mediante el uso de una escala de criterio personal, asignando un porcentaje de tejido dañado a cada nivel de la escala como sigue: 0%=planta sana, 25%= presencia de tubérculos aéreos, 50%=presencia de tubérculos aéreos y proliferación de

brotos, 75%= exceso de brotes y planta quebradiza, 100%=planta muerta (Anexo 1).

Diseño de estudio y análisis estadístico

El estudio se realizó bajo un diseño de bloques completamente al azar, con siete tratamientos y 15 repeticiones por tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una sola vía y comparación entre medias de los tratamientos con una prueba de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” y “*Candidatus Phytoplasma americanum*”

Se detectó la presencia de CaLso en los insectos de *B. cockerelli* los cuales se utilizaron para la inoculación de las plantas (Figura 1). Los resultados dieron negativos a CaLso en minitubérculos. No se encontró la presencia de CaPa en *B. cockerelli*, follaje y tubérculos de papa (Figura 2).



Figura 1. Resultados positivos a la presencia de CaLso en *B. cockerelli*. Banda amplificada de 1160 y 669 pb utilizando los primers OA2/Oi2c y CL514F/CL514R.

Carril 1 y 7: Follaje de papa, carril 2 y 13: Marcador de peso molecular de 1 kb, carril 3 y 8: *B. cockerelli*, carril 4, 5, 10, y 11: Testigo positivo, carril 6 y 9: Minituberculo de papa y carril 12: Testigo negativo.

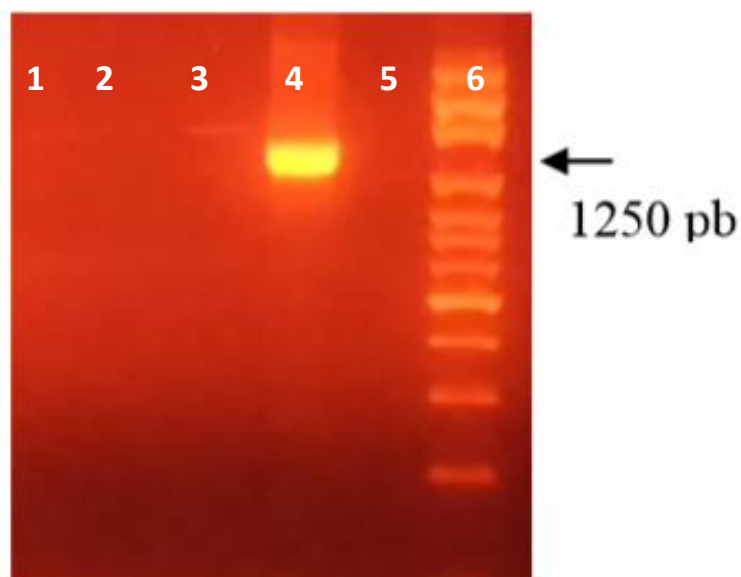


Figura 2. Resultados negativos a la presencia de CaPa en *B. cockerelli*. Banda amplificada de 1250 pb utilizando los primers P1/P7 y R16F2n/R16R2.

Carril 1: Follaje de papa, Carril 2: *B. cockerelli*, carril 3: Minitubérculo de papa, carril 4: Testigo positivo, carril 5: Testigo negativo y carril 6 Marcador de peso molecular de 2 kb

Cuantificación de Afinina

La cuantificación de alcaloides mediante HPLC se dirigió a la cuantificación de afinina presente en el extracto, la cual registró un tiempo de retención de 23 minutos, tiempo correspondiente a la alcaloide afinina (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000), obteniendo una concentración de 123,206 ppm. El extracto fue almacenado en oscuridad a 4°C.

Actividad de enzimas relacionadas a la resistencia

Actividad Fenilalanina Amonio Liasa (PAL). Las aplicaciones de los productos utilizados muestran diferencias significativas con respecto al testigo y al testigo absoluto, al inducir la actividad de PAL. La aplicación de forma curativa en la primera y segunda aplicación de los productos los niveles enzimáticos se expresaron en mayor cantidad que aplicados en forma preventiva (Figura 3-6). Esto pudo haberse debido a que la planta estaba enferma y necesitaba la producción de lignina para protegerse del patógeno.

El producto prototipo en las dos aplicaciones en la forma curativa muestra un incremento en cuanto a la producción de PAL, alcanzando una actividad de 154.12 U/mg de proteína a las 48 horas en la segunda aplicación. Aplicado de forma preventiva mantiene su actividad promedio en 80 U/ mg de proteína en la primera aplicación. Con respecto a la segunda aplicación, a las 24 horas muestra una actividad de 101.57 U/ mg de proteína, teniendo una actividad decreciente en los próximos muestreos, el incremento en este muestreo pudo haberse dado debido a que las plantas ya se encontraban infectadas con la bacteria.

La aplicación de alcamidas de forma curativa tienen una actividad mayor PAL de que cuando se aplican de forma preventiva; en esta última se mantiene la actividad en 80 U/ mg de proteína, 20 U/ mg de proteína menos que en la forma curativa. En la segunda aplicación las alcamidas muestran una mayor actividad cuando son aplicadas de forma curativa que preventiva.

El producto prototipo muestra una mejor actividad PAL aplicado de forma curativa y preventiva en comparación con las alcamidas, ambos muestran una mejor acción de protección en la planta contra la bacteria en lo que respecta al testigo y testigo absoluto.

Los resultados encontrados en esta investigación son mucho mayores que los que obtuvo Rashed *et al.*, (2013) al determinar la actividad PAL en tubérculos de papa ('FL 1867') infectados con CaLso a diferentes semanas antes de la cosecha, obteniendo una cantidad de 4.37 U/mg de PAL en la séptima semana antes de cosechar los tubérculos, por otro lado Mohan *et al.*, (2015) en tubérculos de la variedad Russet Burbank encontraron 12 U/mg de PAL y Wallis *et al.*, (2012) encontraron 3.18 U/mg en ambos experimentos los tubérculos estaban infectados con CaLso. González (2011) encontró una máxima actividad PAL (0.394 U/mg de proteína) a las 12 horas en hojas de tomate infectadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* y tratadas con alcamidas naturales, cantidad de PAL muy baja en comparación con los testigos y tratamientos de este trabajo. Navarre *et al.*, (2009) en tubérculos de las variedades FL1879 y Atlantic positivas a CaLso, encontraron 98 y 520 ml/g de PAL respectivamente en

muestra seca. La cantidad de PAL encontrada en los tubérculos de la variedad Atlantic es 3.3 veces mayor que la actividad expresada por el producto prototipo a las 48 horas en la segunda aplicación de forma curativa y cinco veces mayor que la actividad obtenida por las Alcamidas a las 12 horas en la primera aplicación en forma curativa en hojas de papa.

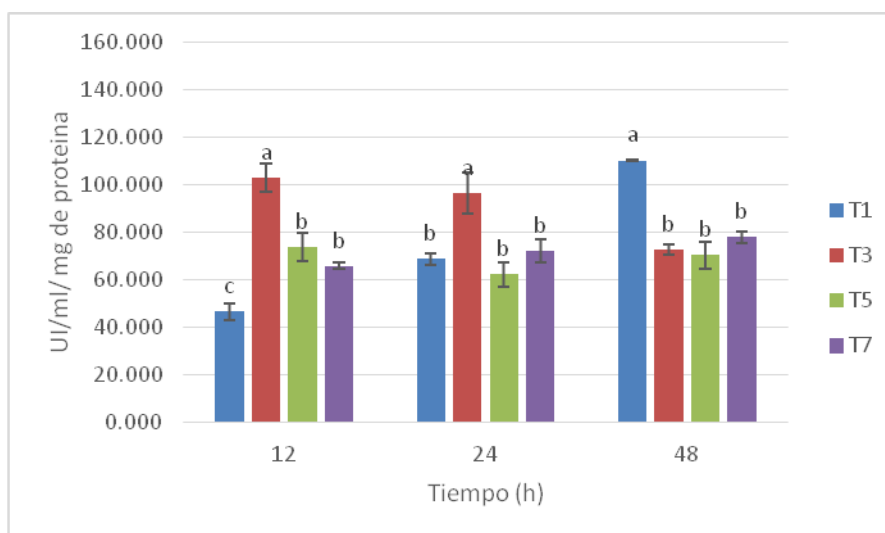


Figura 3. Cinética de PAL en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma curativa.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T5=testigo infestado y asperjado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

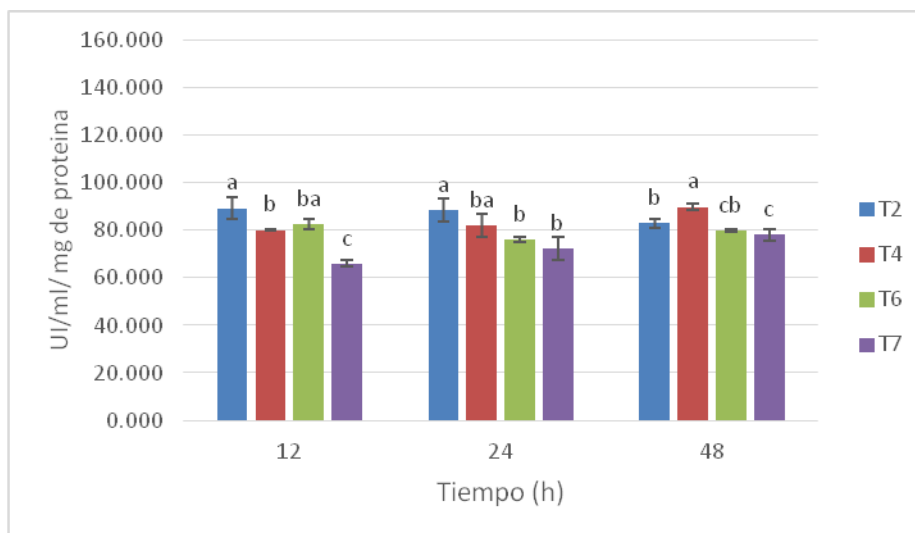


Figura 4. Cinética de PAL en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma preventiva.

T2=producto prototipo aplicado e infestado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

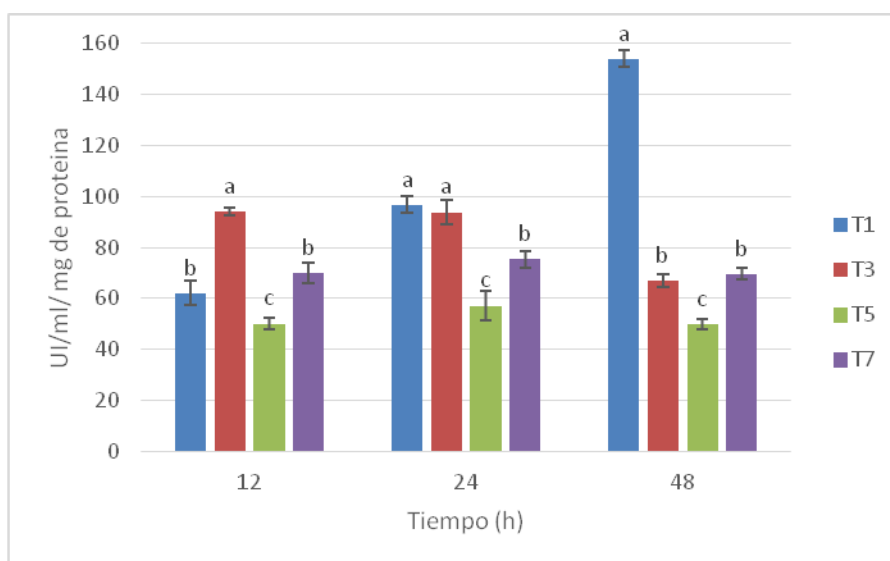


Figura 5. Cinética de PAL en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma curativa.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T5=testigo infestado y asperjado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

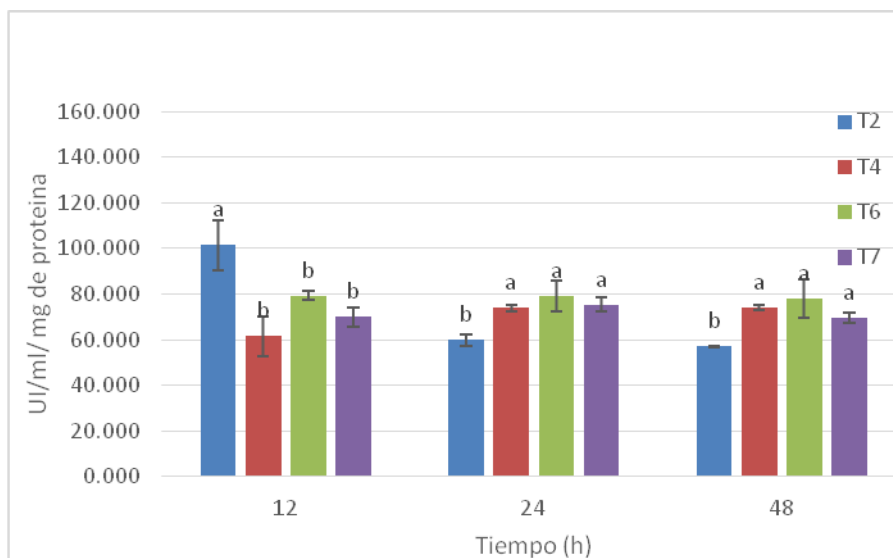


Figura 6. Cinética de PAL en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma preventiva.

T2=producto prototipo aplicado e infestado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Actividad Peroxidasa (POD). La peroxidasa en las plantas desempeña un papel catalítico en el proceso de lignificación del xilema, expresándose también en la epidermis de los órganos aéreos. En este ensayo la máxima actividad peroxidasa en hojas de papa fue a las 24 horas con 1.3 U/mg de proteína en plantas tratadas con alcamidas de forma preventiva, a diferencia del testigo que registró 0.9 U/mg de proteína en la primera aplicación (Figura 7 y 8), en forma curativa muestra una mayor actividad a las 24 h, teniendo un comportamiento similar a todos los tratamientos. Con lo que respecta a la segunda aplicación en las dos maneras de protección (Figura 9 y 10) su actividad se mantiene en niveles bajos en comparación con anterior aplicación, esto pudo haberse debido a que la planta ya estaba protegida y solo tenía que mantener los niveles de lignificación.

El producto prototipo muestra su máxima actividad de forma preventiva con 1.2 U/mg de proteína a las 24 h en la primera aplicación; de forma curativa muestra el mismo comportamiento que el resto de los tratamientos. En la segunda

aplicación de forma curativa mantiene su actividad en 0.6 U/mg de proteína, mientras que de manera preventiva ésta fue su mayor actividad.

La baja concentración de peroxidasa es debido a que es el precursor de PAL, esto es mientras PAL se encuentra activa, la peroxidasa se encuentra desactivada (Cuervo *et al.*, 2009; Ardila *et al.*, 2011). Los resultados en forma preventiva del producto prototipo son congruentes con los que reporta (Sakuma, 2008, 2009). En cuanto a cantidad de Peroxidasa González (2011) encontró $1.60309E-06$ U/mg de proteína en hojas de tomate al cuarto día de muestreo, difiriendo estos resultados en cuanto a tiempo y cantidad con los encontrados en este ensayo. Trabajos realizados por Wallis *et al.*, (2012) y Rashed *et al.*, (2013) encontraron 0.16 y 0.15 U/mg de peroxidasa en tubérculos infectados con CaLso, relacionando la actividad de esta enzima con la resistencia de la planta a la enfermedad. Sin embargo estas cantidades son muy pequeñas con las que se encontraron en esta investigación cuando se aplican productos como inductores de resistencia.

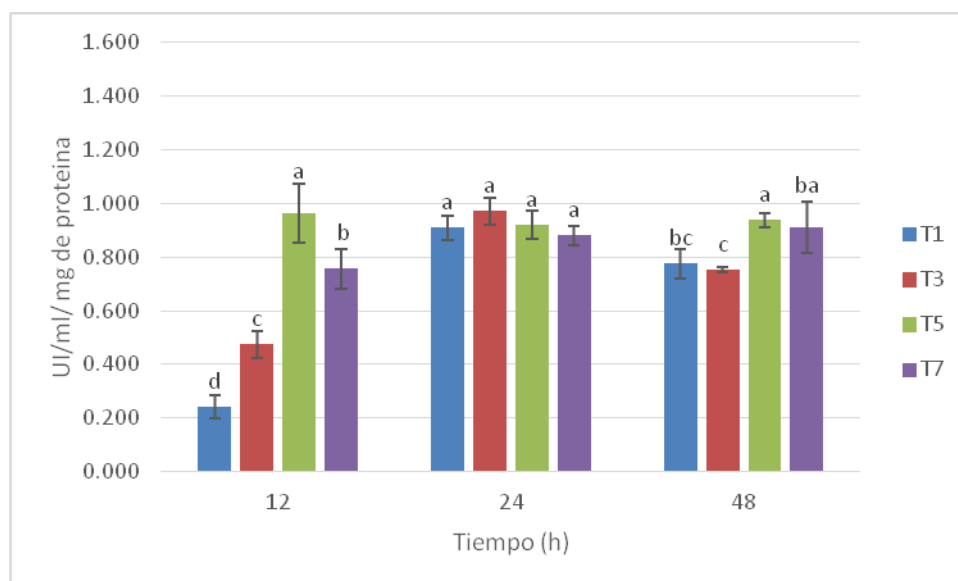


Figura 7. Cinética de Peroxidasa en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma curativa.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T5=testigo infestado y asperjado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

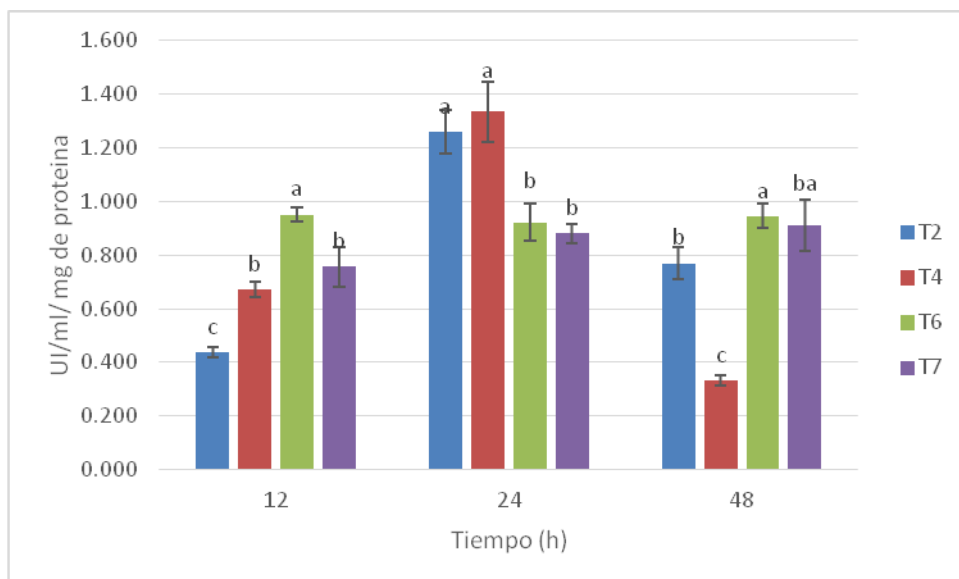


Figura 8. Cinética de Peroxidasa en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma preventiva.

T2=producto prototipo aplicado e infestado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

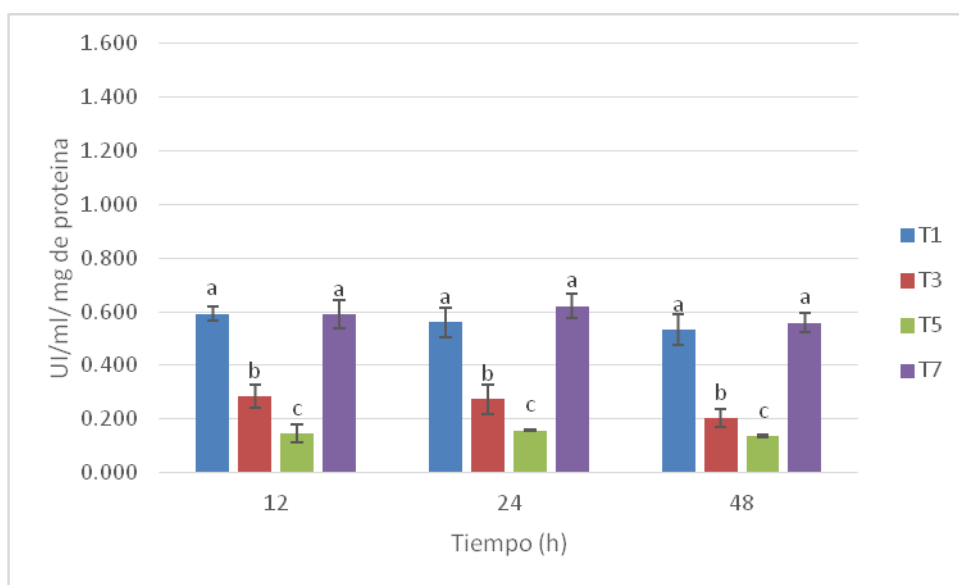


Figura 9. Cinética de Peroxidasa en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma curativa.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T5=testigo infestado y asperjado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

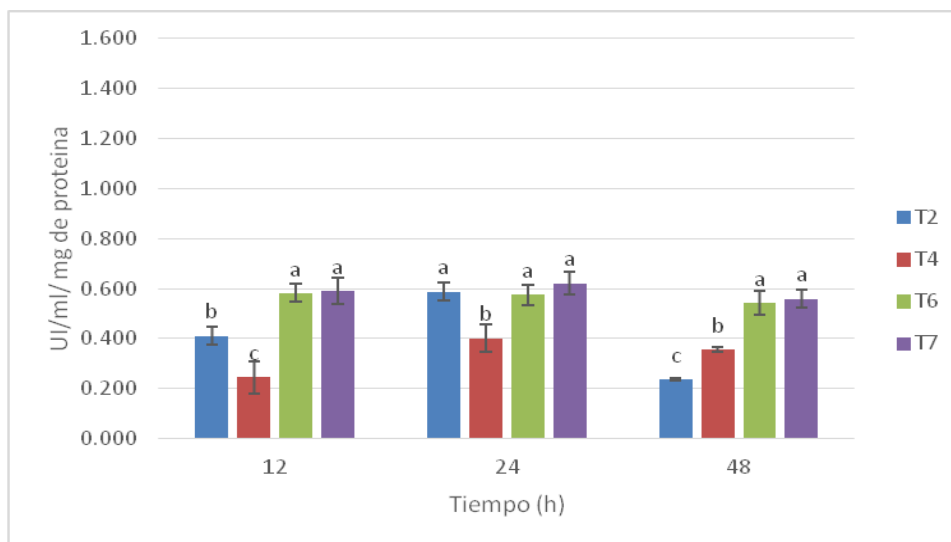


Figura 10. Cinética de Peroxidasa en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma preventiva.

T2=producto prototipo aplicado e infestado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Cuantificación de Proteínas. La cantidad de proteínas difieren según las especies vegetales, mismas que forman el material básico de las células y de las enzimas, así como numerosos compuestos y hormonas (navarro, 2003). En la primera aplicación el producto prototipo muestra una producción 1.9 mg/ml de proteínas en presencia de la bacteria, dicha cantidad pudo haberse dado ya que la planta necesitaba de las proteínas para la síntesis de enzimas relacionadas con la defensa (Figura 11). De forma preventiva la producción de proteínas se mantiene en 1 mg/ml (Figura 12). En la segunda aplicación de forma curativa a las 12 h la concentración se encontró 0.5 mg/ml menos que en la primera, este efecto se atribuye a que la planta ya había estabilizado los niveles de producción en cuanto a enzimas relacionadas con la resistencia. 2.4 mg/ml se encontró la concentración de proteínas a las 48 h en la segunda aplicación de forma curativa (Figura 13), este incremento puede deberse a que la bacteria fue inoculada después de la primera aplicación, por lo tanto la planta necesitaba de la producción de proteínas para poder activar su sistema de defensa. Se observa también que la máxima producción de proteínas para las

alcamidas es a las 48 h en la segunda aplicación de forma preventiva con una concentración de 2.1 mg/ml (Figura 14), 0.3mg/ml menos que el producto prototipo; de forma preventiva en esa aplicación se observó que produjo 1.7 mg/ml al mismo tiempo, 0.3 mg/ml más que las del producto prototipo a las 12 h y 0.4 mg/ml menos de las que presentó a las 48 h en la primera aplicación de forma curativa, mientras que de forma preventiva en esa aplicación mantuvo su nivel promedio en 1.2 mg/ml de proteína.

Los resultados de proteínas encontrados en este trabajo son 2-1 mg/ml menor en relación al testigo y 0.5-0.4 mg/ml menor en relación a los tratamientos, de acuerdo a los resultados encontrados por Alvarado *et al.*, (2012) en tejido de plantas de papa de las variedades FL1867, Norkotah o Norgold, relacionando la cantidad de proteínas como producto de defensa de la planta hacia CaLso. En tubérculos infectados de la variedad Russet Burbank Mohan *et al.*, (2015) encontraron 0.033 mg/ml de proteínas, dichos resultados son muy bajos en comparación con los que se encontraron en este trabajo.

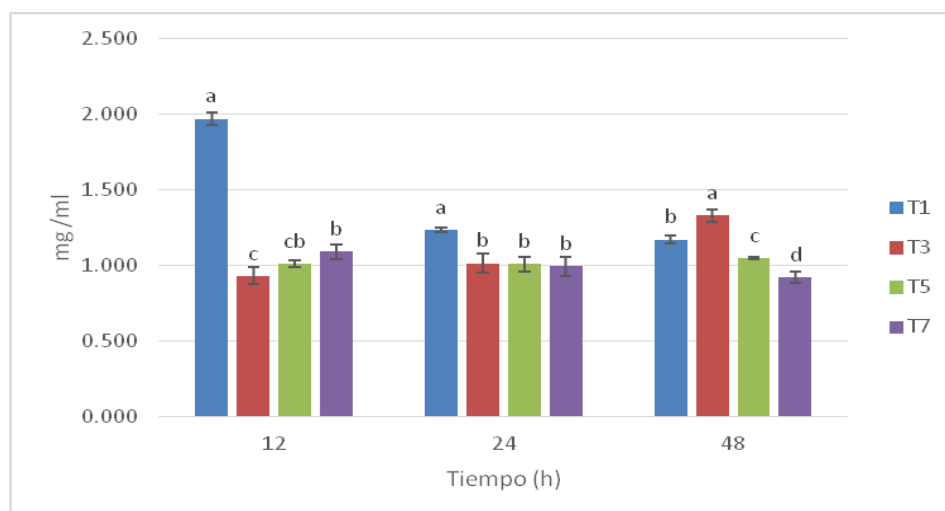


Figura 11. Cinética de Proteínas en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma curativa.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T5=testigo infestado y asperjado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

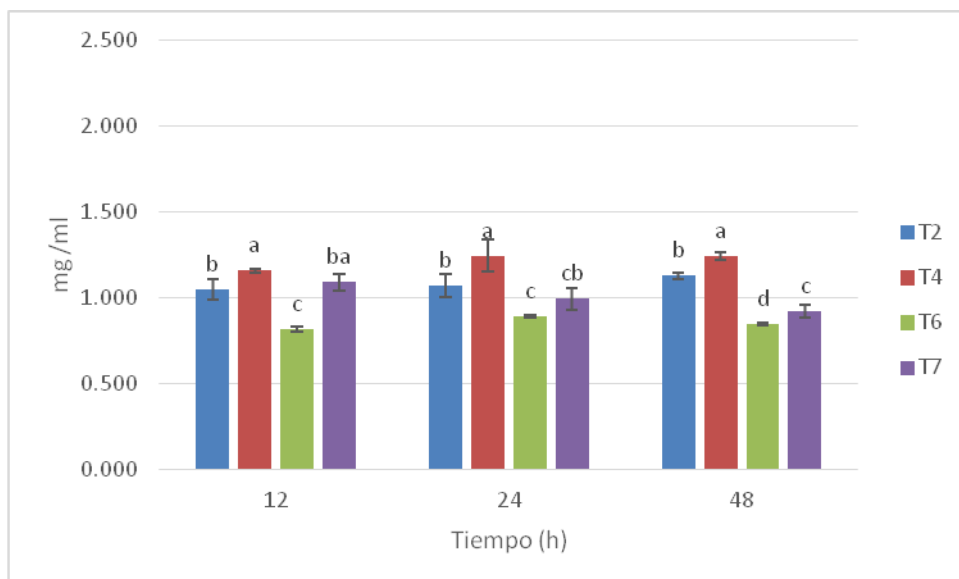


Figura 12. Cinética de Proteínas en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma preventiva.

T2=producto prototipo aplicado e infestado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

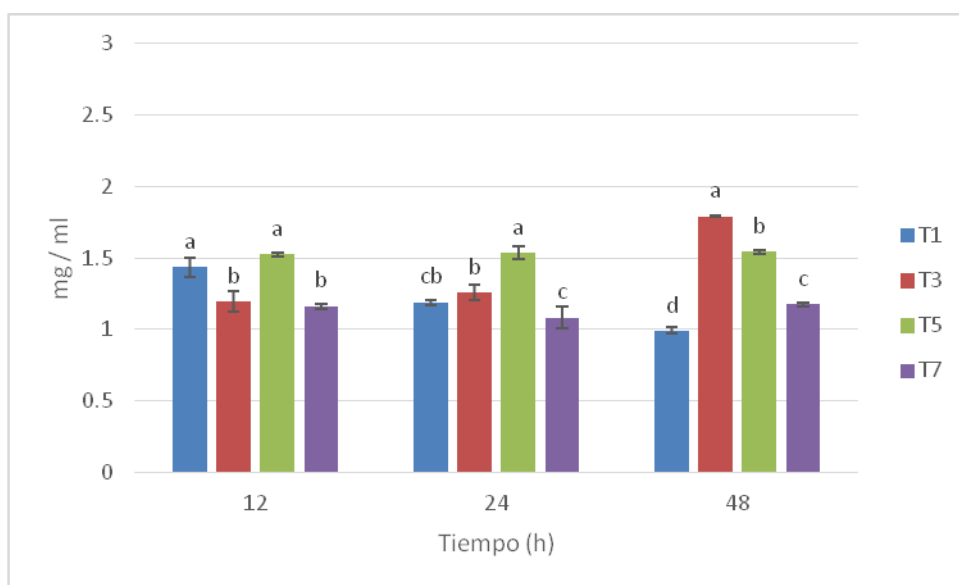


Figura 13. Cinética de Proteínas en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma curativa.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T5=testigo infestado y asperjado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

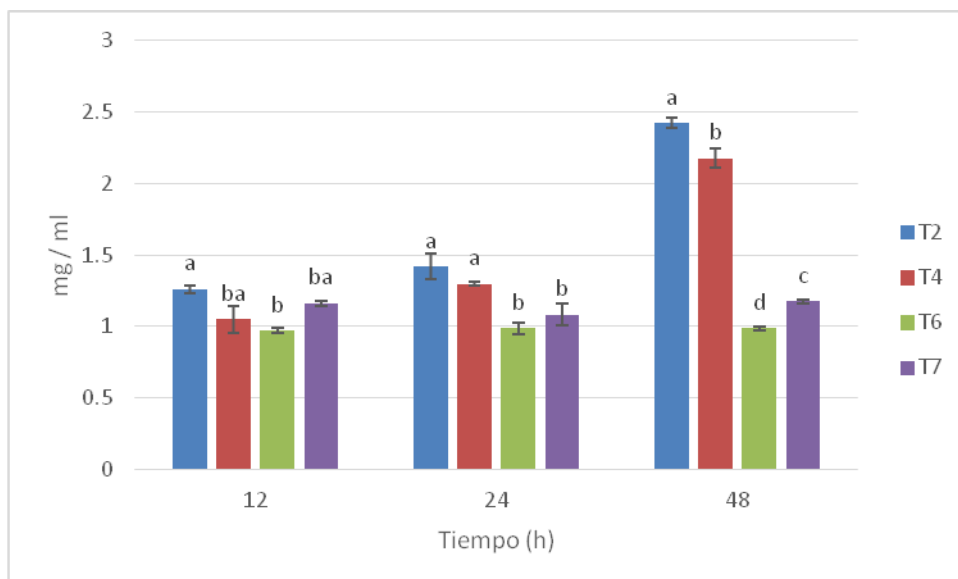


Figura 14. Cinética de Proteínas en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma preventiva.

T2=producto prototipo aplicado e infestado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Cuantificación de Fenoles Totales. Las alcamidas aplicadas de forma curativa en una primera aplicación mantienen su concentración en 0.03 mg/ml de ácido gálico por peso fresco (Figura 15), en cuanto al producto prototipo la concentración va en aumento. La pronta producción de compuestos fenólicos al aplicarse las alcamidas puede deberse a que es una molécula de rápido reconocimiento por la planta en comparación con el producto prototipo. Las alcamidas aplicadas forma preventiva ayudan a la planta a la producción de fenoles para poder defenderse, a las 48 h muestran una concentración de 0.04 mg/ml de ácido gálico, 0.01 mg/ml más que el producto prototipo y los testigos (Figura 16).

Con lo que respecta a la segunda aplicación de forma curativa (Figura 17), las alcamidas y el producto prototipo muestran una concentración constante de 0.03 mg/ml de ácido gálico durante los muestreos, asumiendo dicho evento a que la planta ha estabilizado sus niveles de enzimas de defensa contra la bacteria. De la forma preventiva ambos productos mantienen su concentración en 0.04 mg/ml de ácido gálico, 0.01 mg/ml más que los testigos (Figura 18), este

incremento en la concentración se atribuye a que la planta fue inoculada 24 h después de haber sido realizado la primera aplicación. Por lo cual la planta necesita de la producción de compuestos fenólicos como antibióticos para poder defenderse de la bacteria.

González (2011) en un trabajo que realizó con plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* y tratadas con alcalmidas naturales encontró al quinto día una concentración de 6.926 mg/ml de ácido gálico, estos resultados son 230.8 veces mayor que los reportados en este trabajo y 100 veces mayor que los que encontró Navarre *et al.*, (2009) en tubérculos de papa de las variedades FL1867 y Atlantic relacionando los fenoles con la defensa de la planta a CaLso mientras que Reddivari *et al.*, 2007 relacionan los fenoles con la capacidad antioxidante en tubérculos de papas de diferentes colores.

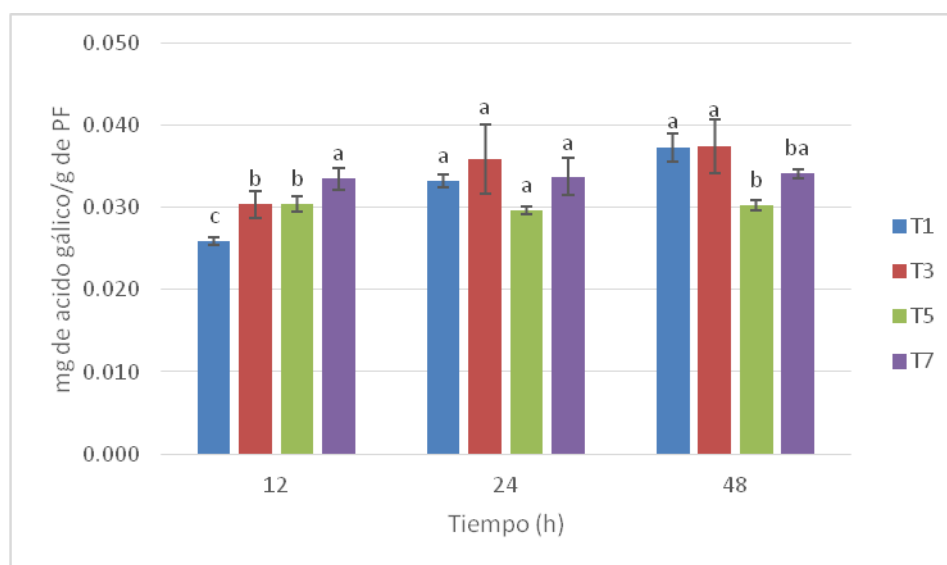


Figura 15. Cinética de Fenoles totales en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma curativa.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T5=testigo infestado y asperjado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

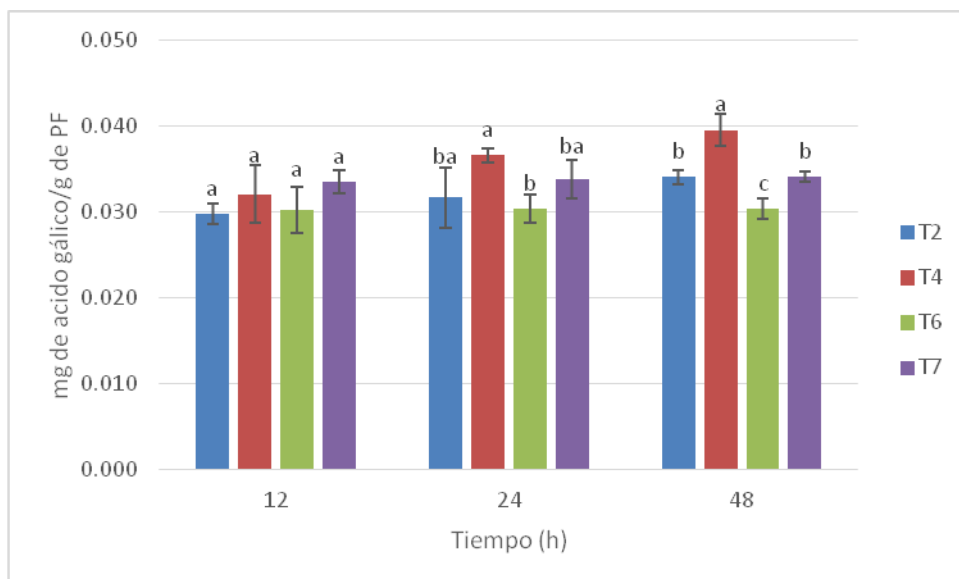


Figura 16. Cinética de Fenoles totales en hojas de papa a diferentes tiempos en la primera aplicación de tratamientos de forma preventiva.

T2=producto prototipo aplicado e infestado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

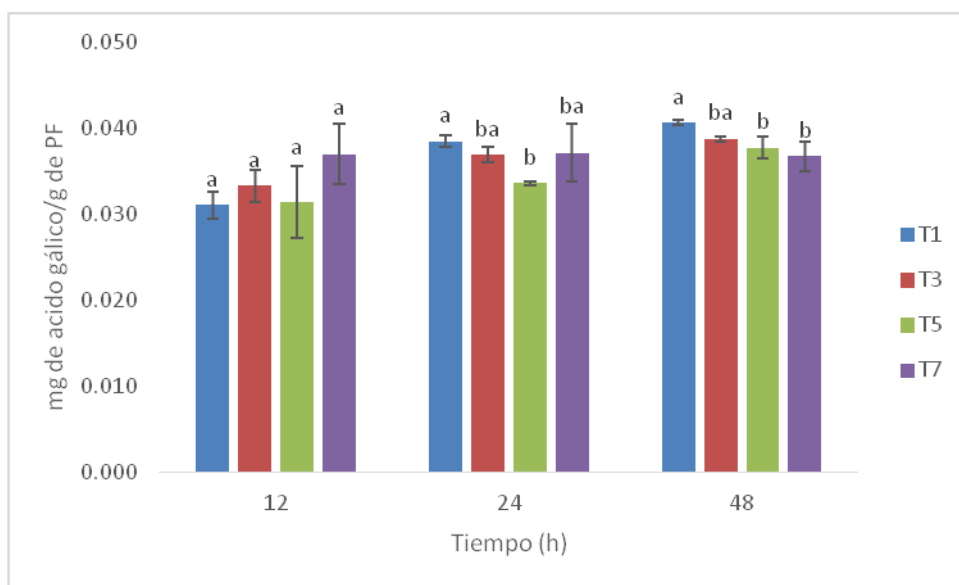


Figura 17. Cinética de Fenoles totales en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma curativa.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T5=testigo infestado y asperjado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

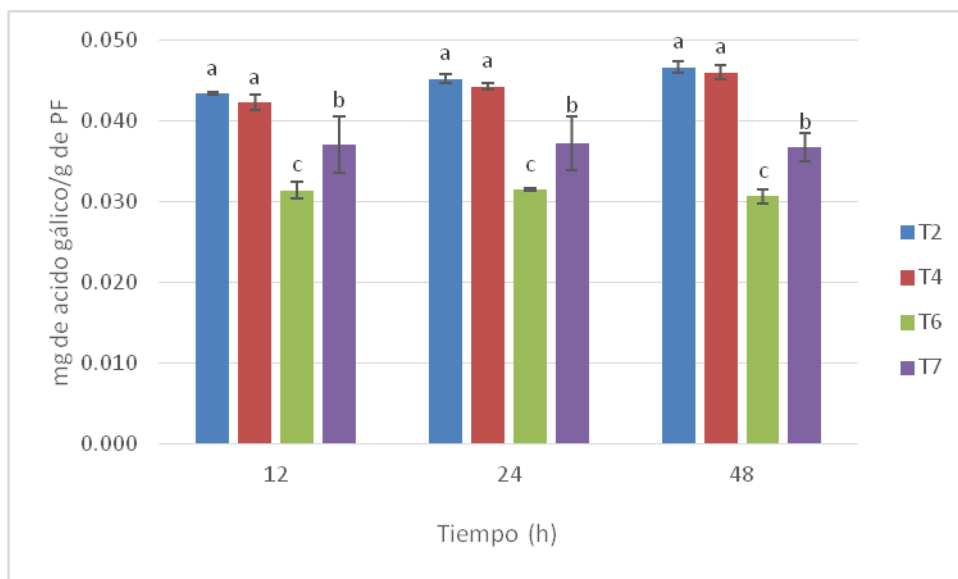


Figura 18. Cinética de Fenoles totales en hojas de papa a diferentes tiempos en la segunda aplicación de tratamientos de forma preventiva.

T2=producto prototipo aplicado e infestado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Parámetros químicos

ph. Estadísticamente la aplicación de alcamidas de forma preventiva induce un nivel de unidades de pH mayor que el resto de los tratamientos y el producto prototipo aplicado de manera preventiva muestra un nivel de pH menor incluso que los testigos (Figura 19). Un pH mayor está relacionado con la concentración de azúcares reductores solubles, lo cual conlleva al oscurecimiento de Maillard del tubérculo cuando este se fríe, por el contrario cuando hay un pH ácido el oscurecimiento no se lleva a cabo (Galicía, 2001). No obstante Zambrano *et al.*, 2010 recomienda el uso de tubérculos con pH de 6.6 para la industria. En un estudio realizado por Abbasi *et al.*, (2011) encontraron un pH de 6.2 en 6 variedades de papa, estando este resultado 0.9 unidades de pH más que el tratamiento de alcamidas aplicado de forma preventiva y 1.0 unidades de pH más que las que encontró Galicía (2001).

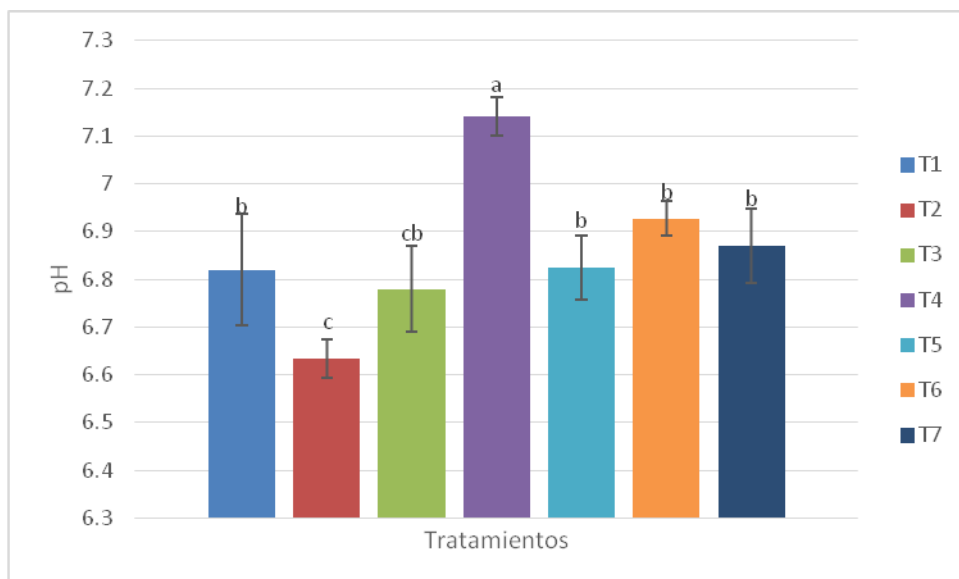


Figura 19. pH obtenido en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Sólidos solubles totales (°Brix). Con respecto al contenido de sólidos solubles totales (°Brix), este parámetro representa el contenido de minerales, ácidos orgánicos y azúcares, principalmente sacarosa, detectados por el refractómetro, en los tubérculos de papa. Estadísticamente el testigo absoluto es el peor tratamiento en lo que concierne a sólidos solubles totales o grados Brix (°Brix), siguiendo los tratamientos aplicados de forma preventiva (Figura 20). Los tratamientos que fueron inoculados 24 horas antes de la aplicación muestran el más alto contenido de azúcar en los tubérculos, se deduce que la planta al estar en contacto con la bacteria y estar en etapa de tuberización, da prioridad a los tubérculos para continuar con su descendencia al mandar más cantidad de carbonos, ya que la bacteria se alimenta de los carbonos disponibles en el floema (Lin y Gudmestad, 2013). Abbasi *et al.*, (2011) encontraron en 6 variedades de papa libres de CaLso un total de 5.6 °Brix, 0.2 °Brix más que los resultados encontrados en este trabajo, concluyendo que bajas cantidades de azúcar son aptas para la industria de

freído, sin embargo Zambrano *et al.*, (2010) sugiere que para la industria de freído los tubérculos deben de tener una concentración de 4.5 °Brix. Galicia (2001) encontró en papas almacenadas bajo condiciones de CO₂ libres de CaLso 6.2 °Brix, 0.8 °Brix más que en esta investigación.

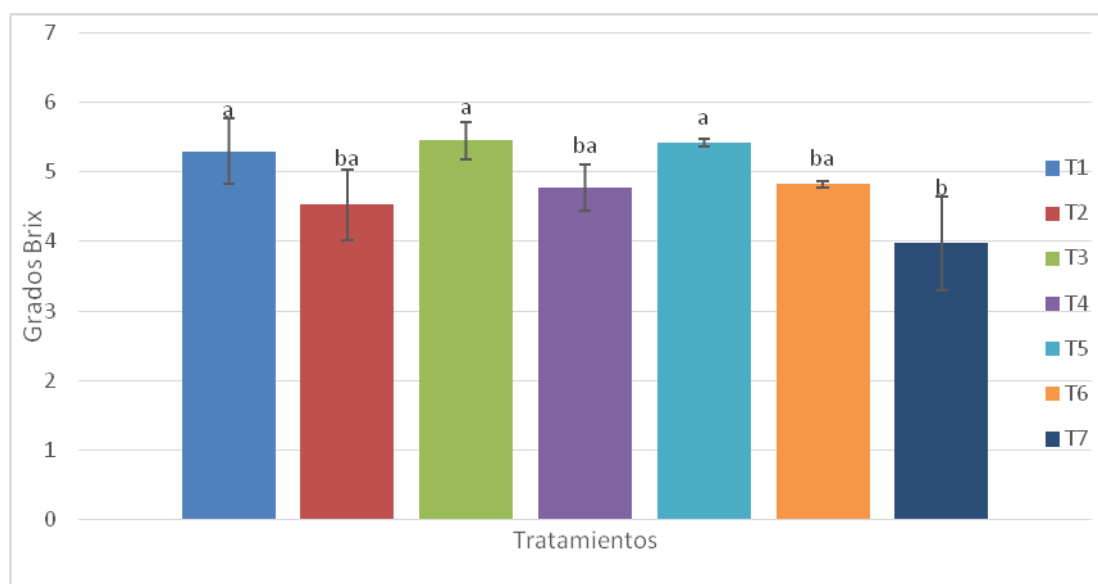


Figura 20. Grados Brix obtenidos en los diferentes tratamientos en tubérculos de papa.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Vitamina C. El ácido ascórbico al estar implicado en el señalamiento contra un estrés biótico o abiótico en la planta, actúa como un antioxidante y protege a la célula de la invasión del patógeno. En la figura 21 se observa que el tratamiento aplicado de forma preventiva del producto prototipo se muestra estadísticamente igual que los testigos incluyendo el absoluto, por otro lado aplicado de forma curativa se muestra igual que las plantas asperjadas con alcamidas de forma preventiva, coincidiendo con lo que menciona Sakuma (2008, 2009). Estas cantidades de ácido ascórbico encontradas en este trabajo son 7 veces menos que las que reporta Romero y Delgado, (2009) en tubérculos de papa infectados con fitoplasma. Sin embargo se asemejan con

los que obtuvieron Stushnoff *et al.*, (2008) al encontrar 20 mg/ 100 g pf en tubérculos de 3 variedades de papa, relacionando estas cantidades como capacidad antioxidante en las papas.

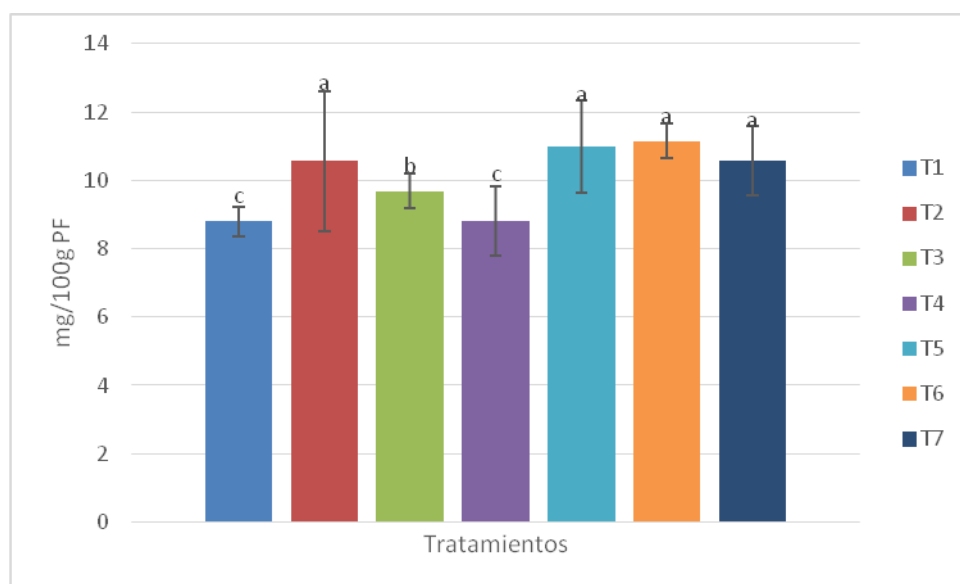


Figura 21. Cantidad de Vitamina C obtenida en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Parámetros de calidad

Firmeza. Se eligió este método de medición de firmeza en las papas para poder ver si la aplicación de los tratamientos retardaba el deterioro en los tubérculos. No se muestran diferencias significativas estadísticamente en cuanto a firmeza (Figura 22), sin embargo en cuanto a las medias se observa que el producto prototipo aplicado de forma preventiva protege un poco más al tubérculo que el resto de los tratamientos y aplicado de forma curativa se muestra más bajo que el testigo absoluto, esto puede deberse a que la planta tiene que repartir energía en defenderse y continuar con el llenado del tubérculo en formación. Estos resultados difieren en gran medida con los que obtuvo

Abbasi *et al.*, (2011) en donde su firmeza es de 880 kg/cm² realizando la prueba con una punta de 11 mm, a diferencia de este trabajo que ser realizó con embolo de 6 mm de diámetro.

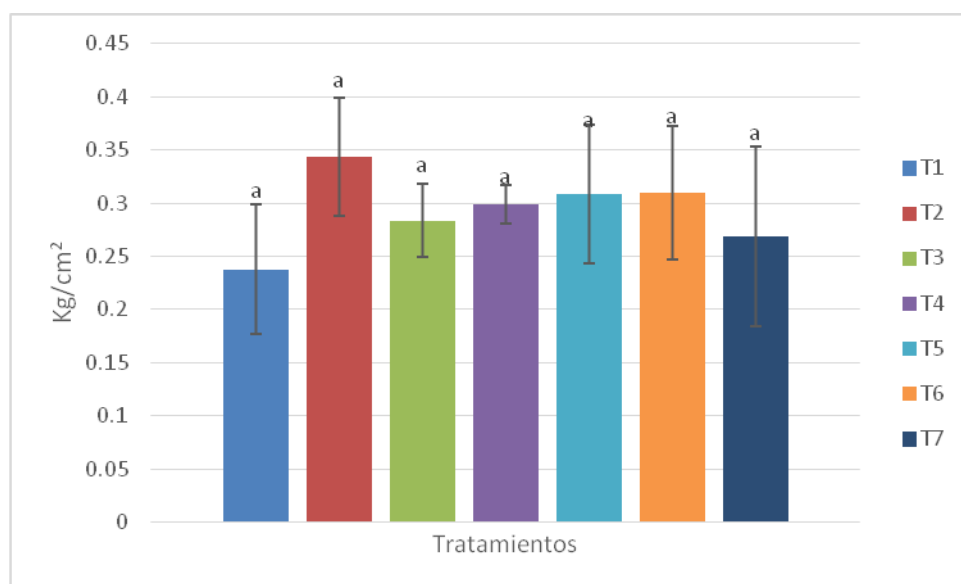


Figura 22. Firmeza obtenida en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Diámetro ecuatorial. El diámetro ecuatorial de los tubérculos fue significativamente diferente en cuanto al testigo absoluto (Figura 23), el cual era de esperarse ya que no se le inoculó la bacteria ni se le pusieron psílicos en las plantas; el producto prototipo y las alcamidas quedan dentro del mismo grupo estadístico, mientras que los testigos agua en un último grupo. La reducción en cuanto a tamaño de diámetro de los tubérculos se atribuye a la presencia de la enfermedad y al espacio de las macetas, ya que los resultados obtenidos difieren en gran media con los que obtuvieron Zambrano *et al.*, (2010); Ojeda *et al.*, (2010) y Abbasi *et al.*, (2011).

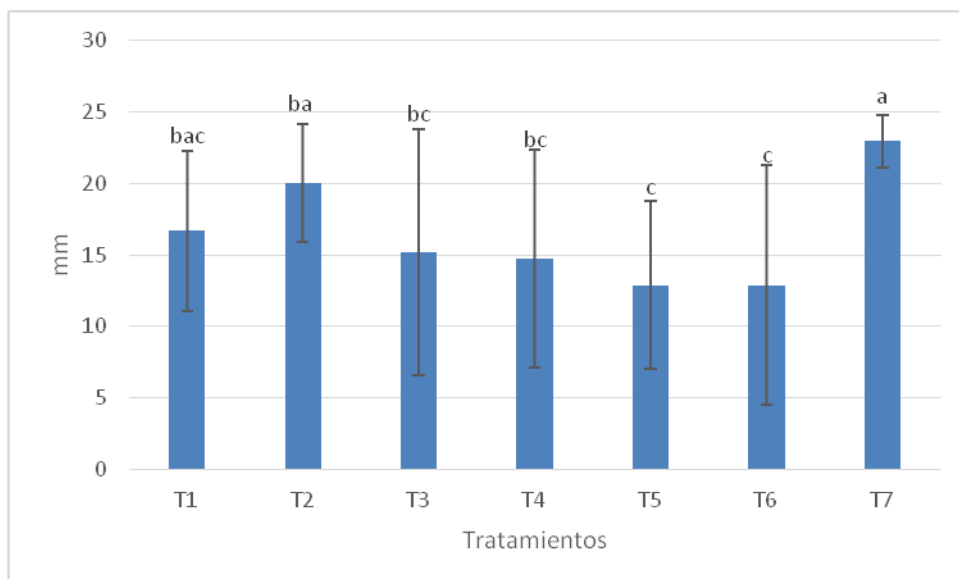


Figura 23. Diámetro ecuatorial en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Diámetro polar. En cuanto a diámetro polar se encuentra una diferencia estadística en el tratamiento absoluto con el resto de los tratamientos, quedando el tratamiento agua como el pero en cuanto a esta calidad (Figura 24). La presencia de CaLso pudo haber influido en el tamaño de los tubérculos, lo cual se puede observar en los tratamientos a los que se les aplicó solo agua en comparación a las plantas en donde se aplicaron las alcamidas y el producto prototipo. Ojeda *et al.*, (2010); Zambrano *et al.*, (2010) y Abbasi *et al.*, (2011) reportan tamaños en tubérculos de papa libres de CaLso de 75 mm de diámetro polar, esto es 45 mm más de los que se obtuvieron en este trabajo.

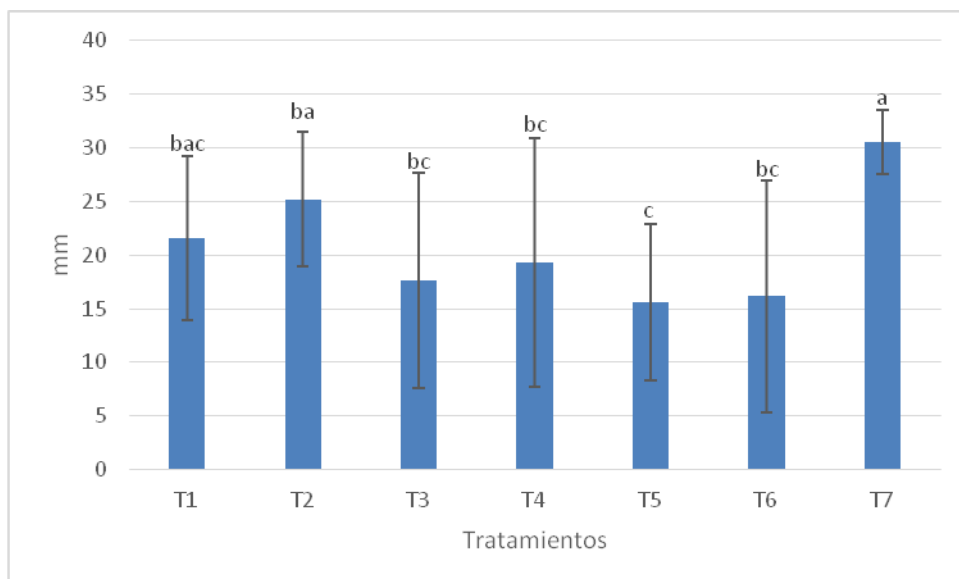


Figura 24. Diámetro polar en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Peso. El tratamiento absoluto al no estar expuesto a la bacteria y psíldos tuvo mejor peso en los tubérculos (Figura 25), seguido del producto prototipo aplicado de manera preventiva y curativa, concordando estos resultados con Sakuma, (2008, 2009). Mientras que las alcamidas al igual que los testigos agua se muestran igual en cuanto a peso de los tubérculos. Ojeda *et al.*, (2010) reportaron tubérculos con peso de 25-80 g, 3 y 8 veces más peso que los reportados en este trabajo con presencia de CaLso. Los resultados obtenidos en esta investigación soportan lo que dice Flores *et al.*, (2004) que las plantas afectadas con CaLso bajan considerablemente la producción.

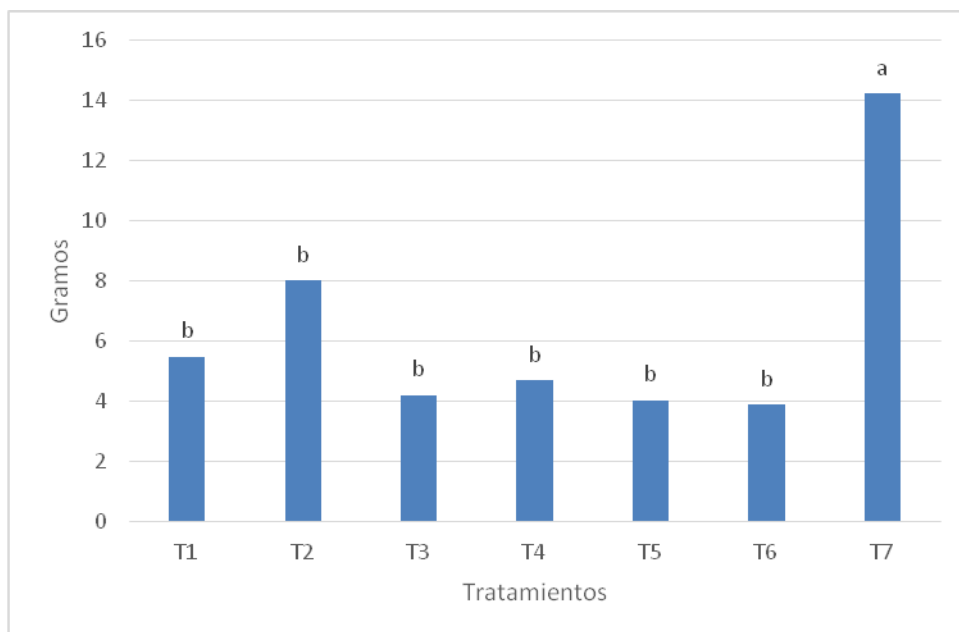


Figura 25. Peso obtenido en tubérculos de papa tratados con diferentes tratamientos.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Número de tubérculos por planta. El testigo absoluto y el tratamiento aplicado de forma curativa del producto prototipo no muestran diferencia estadística; el tratamiento de las alcamidas aplicadas de forma preventiva no ayuda a una producción de tubérculos en comparación de los testigos y el resto de los tratamientos (Figura 26). Esto se atribuye a que la planta invierte más energía en defenderse contra la bacteria en la parte aérea y olvida la parte de la tuberización y cuando se aplica de forma curativa, la planta tiene que continuar el llenado de los tubérculos ya formados. La falta de presencia de tubérculos en la planta contribuye al bajo rendimiento en la producción (Flores *et al.*, 2004).

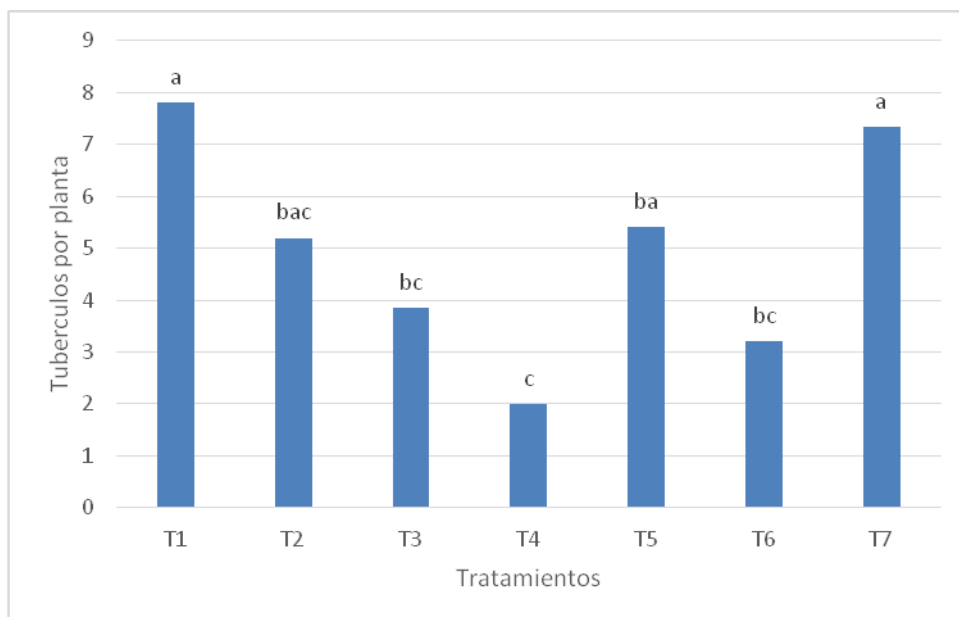


Figura 26. Número de tubérculos obtenidos por plantas, tratadas con diferentes tratamientos.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Respuesta fenotípica a “*Candidatus Liberibacter solanacearum*”

Incidencia. Los valores obtenidos en incidencia nos indican un control que se tuvo de la enfermedad sobre las plantas (Figura 27). Las plantas tratadas con alcamidas de forma preventiva muestran una sanidad más cercana en cuanto al testigo absoluto el cual mostró 0% de incidencia. El resto de los tratamientos muestran un 70 % de incidencia con respecto al testigo absoluto aunque las plantas hayan sido tratadas.

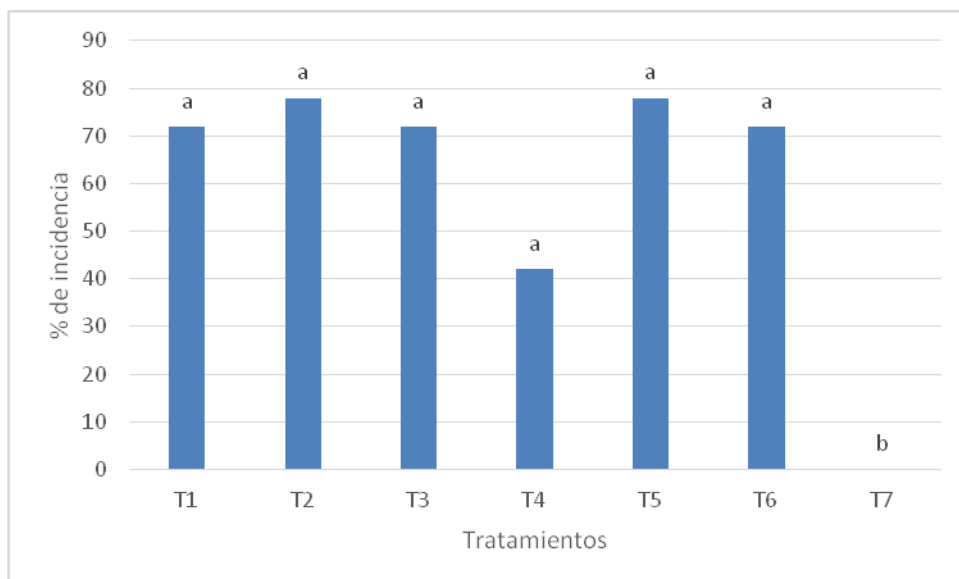


Figura 27. Porcentaje de incidencia de punta morada en plantas de papa tratadas con los diferentes productos.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Severidad. El testigo absoluto al no estar expuesto a CaLso y a presencia de psílicos, tuvo 0% de severidad, seguido del tratamiento de alcamidas asperjadas preventivamente y un testigo. Las plantas asperjadas con el producto prototipo de manera curativa muestran más severidad que los otros tratamientos (Figura 28). Estas mismas plantas mostraron los síntomas típicos de punta morada y más desarrollados incluso que los propios testigos. Esto se atribuye al tamaño de la molécula del producto prototipo, lo cual le costó más trabajo a la planta traslocarla, provocando un debilitamiento lo cual hizo que los síntomas aparecieran más rápido (Lin y Gudmestad, 2013).

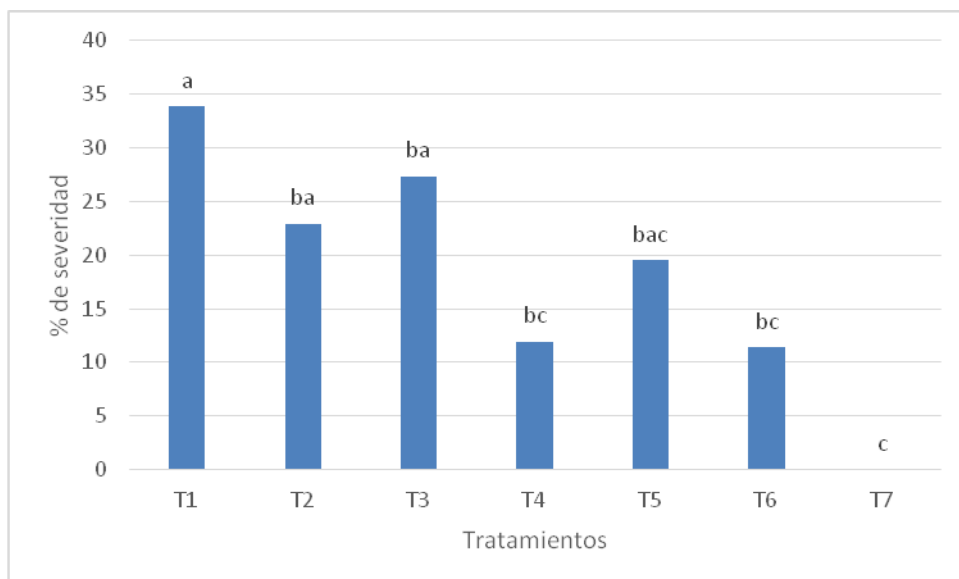


Figura 28. Porcentaje de severidad de punta morada en plantas de papa tratadas con los diferentes productos inductores de resistencia.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tuckey, $p > 0.05$, SAS 9.0).

Manchado. Otro de los daños que causa CaLso es el manchado interno del tubérculo, lo cual le resta calidad en el mercado. El testigo absoluto se observa más claro que los demás tubérculos ya que no está contaminado con CaLso. Los tubérculos testigos se ven un poco pardos en comparación con los de las alcamidas y el producto prototipo (Figura 29). El manchado interno del tubérculo forma parte de un diagnóstico visual en las plantas que han sido infectadas con CaLso (Munyaneza *et al.*, 2007a).

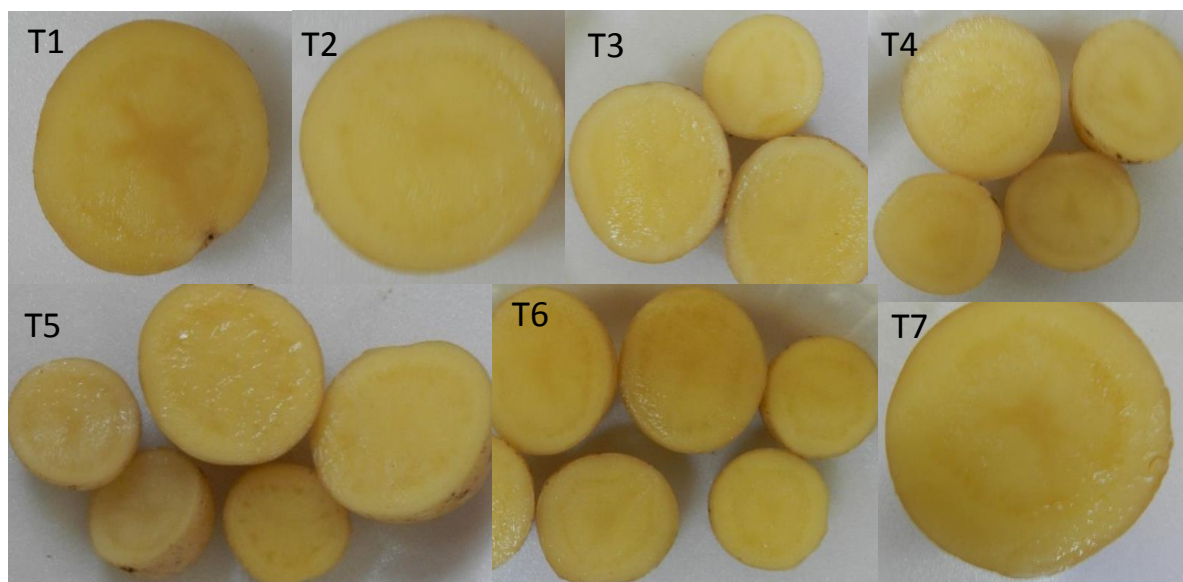


Figura 29. Manchado de tubérculos infectados con CaLso y tratados con productos inductores de resistencia.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

Quemado. La disponibilidad de azúcares reductores solubles facilitan el oscurecimiento de Maillard (Galicia, 2001) a la hora del freído de las papas infectadas con CaLso. En la Figura 30 se muestra que las plantas tratadas con alcamidas y un producto prototipo de forma curativa y/o preventiva logran controlar el manchado interno y el quemado de la papa. Los testigos muestran mayor superficie de quemado en comparación con el testigo absoluto y los tratamientos. Las plantas asperjadas con el producto prototipo y las alcamidas naturales tuvieron cantidades altas de °Brix y pH, sin embargo, al mostrar dichas unidades elevadas contradice lo que mencionan Mackay *et al.*, (1990) que tubérculos con alto contenido de azúcares y pH producen hojuelas oscuras como resultado de la reacción de Maillard.

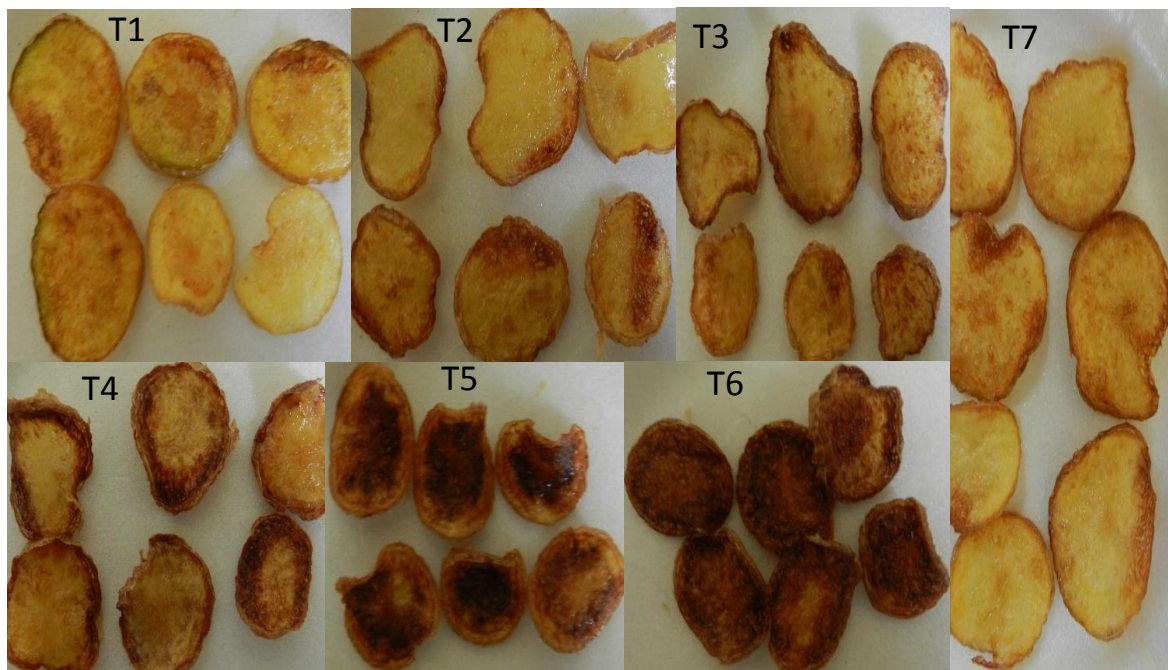


Figura 30. Prueba de freído con papas infectadas con CaLso y tratadas con inductores de resistencia.

T1=producto prototipo infestado y aplicado, T2=producto prototipo aplicado e infestado, T3=alcamidas infestado y asperjado, T4=alcamidas asperjadas e infestado, T5=testigo infestado y asperjado, T6=testigo asperjado e infestado, T7=testigo absoluto.

CONCLUSIONES

- El producto prototipo y las alcamidas naturales muestran un efecto inductor de resistencia en la planta de papa contra "*Candidatus Liberibacter solanacearum*", aplicados de forma curativa y preventiva.
- El producto prototipo tiene un mejor efecto cuando es aplicado de forma curativa.
- Las alcamidas naturales presentan un mejor efecto de control de "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" de manera preventiva.

LITERATURA CITADA

- ABBASI, S. K., MASUD M., GULFRAZ M., ALI S., and IMRAN M. Physico-chemical, functional and processing attributes of some potato varieties grown in Pakistan. *African Journal of Biotechnology*. 2011, Vol. 10(84), pp. 19570-19579.
- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. Department of Plant Pathology University of Florida. 2005, 5th ed.
- ALMEYDA-LEON I. H., SANCHEZ-SALAS J. A., GARZÓN-TIZNADO J. A. Vectors causal of potato purple top in Coahuila and Nuevo Leon, México. *Agricultura Técnica en México*. 2008, Vol. 34 Núm. 2. p. 141-150
- ALVARADO, V. Y., ODOKONYERO D., DUNCAN O., MIRKOV TE, SCHOLTHOF HB. Molecular and Physiological Properties Associated with Zebra Complex Disease in Potatoes and Its Relation with *Candidatus Liberibacter* Contents in Psyllid Vectors. *PLoS ONE*. 2012, 7(5): e37345. doi:10.1371/journal.pone.0037345.
- ANGARITA, A. S. R. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Revista Manejo Integrado de Plagas*. 2001, 6: 4-11.
- ARDILA, H., BAQUERO, B., and MARTÍNEZ, S. Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. Dianthi* raza 2. *Rev. Colomb. Quim.* 2007. 36:151-167.
- ARDILA, HAROLD. D., MARTÍNEZ, S. T., HIGUERA, BLANCA L. Regulación espacio-temporal de fenilalanina amonio liasa en clavel (*dianthus caryophyllus* l.) durante su interacción con el patógeno *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. *Rev. Colomb. Quím.* 2011, Vol. 40, núm. 1, pp. 7-24.
- BANIA, I. and Mahanta R. Evaluation of peroxidases from various plant sources. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2012, Volume 2, Issue 5.
- BAYER DE MÉXICO. La paratrioza o pulgón saltador del tomate y la papa. *Boletín técnico, Bayer Crop Science*. 2015, 24p.

- BRLANSKY, H. R., DEWDNEY M. M., ROGERS E. M., and CHUNG, R. K. Florida citrus pest management guide: Huanglongbing (Citrus greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida USA. 2009, 225p.
- BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*. 2006, 88: 7–37.
- BUJANOS, M. R., GARZÓN, J. A., MARÍN, A. Manejo integrado del pulgón saltador *Bactericera (=Paratrioza) cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) en los cultivos de solanáceas en México. Pp. 93-99, Memorias, Segunda convención mundial del chile. 2005, Zacatecas, México.
- BUTLER, C. D., BYRNE, F.R., KEREMANE, M. L., LEE, R. F., TRUMBLE, J. T. Effects of insecticides on behavior of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) and transmission of *Candidatus Liberibacter psyllaeus*. *Journal of Economic Entomology*. 2011a, 104: 586–594.
- BUTLER, C. D., GONZALEZ, B., KEREMANE, M. L., LEE, R. F., NOVY, R. G., MILLER, J. C., and TRUMBLE, J. T. Behavioral responses of adult potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), to potato germplasm and transmission of '*Candidatus Liberibacter psyllaeus*'. *Crop Prot.* 2011, 30:1233-1238.
- CABI, Crop Protection Compendium International. Consultado 06 de octubre de 2015: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/109434>
- CALDWELL, J. S. Preliminary survey of Mexican Psyllidae (Homoptera). *Ohio Journal of Science*. 1941, 41(6):418-424.
- CASTEEL, C. L., HANSEN, A. K., WALLING, L. L., PAINE, T. D. Manipulation of Plant Defense Responses by the Tomato Psyllid (*Bactericera cockerelli*) and Its Associated Endosymbiont *Candidatus Liberibacter Psyllaeus*. *PLoS ONE*. 2012, 7(4): e35191. doi:10.1371/journal.pone.0035191
- COLLINGUE, D. B., GREGERSE, P., and THORDAL-CHRISTENSEN, H. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In *Mechanisms of plant growth and improved productivity. Modern approaches*. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dkker. 1994, p. 301-433.
- COMPERE, H. A new species of *Metaphycus* parasite on psyllids. *Pan-Pac. Entomol.* 1943, 19: 71-73.
- CONRATH, U., PIETERSE, C. M. J., MAUCH-MANI B. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. 2002, 7, 210–216.

- CONFEDERACIÓN NACIONAL DE PRODUCTORES DE PAPA (CONPAPA). Monografía del sector papa. Consultado el 9 de octubre del 2015 y disponible en línea <http://conpapa.org.mx/files/pages/0000000018/ficha-tecnica-2013.pdf>
- CRANSHAW, W. S. Potato or tomato psyllids. Insects Series Home & Garden. 2007, No. 5: 540.
- CHRISTENSEN, L. A. M. Acetylenes and related compounds in Heliantheae. Phytochemistry. 1991, 30: 11–49.
- CROSSLIN, J. M., MUNYANEZA, J. E., BROWN, J. K., and LIEFTING, L. W. Potato zebra chip disease: A phytopathological tale. 2010, Online. Plant Health Progress. doi:10.1094/PHP-2010-0317-01-RV.
- CUERVO, D. C., MARTÍNEZ, S. T., ARDILA, HAROLD, D., HIGUERA, B. L. Inducción diferencial de la enzima peroxidasa y su relación con lignificación en los mecanismos de defensa del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* Rev. Colomb. 38(3):379-393.
- CURTIS, L. S., TANTRAVAHU, P. y MIRKOV, T. E. An evaluation of plant-derived antimicrobial and anti-insect genes on reducing zebra chip disease in transgenic potato, pp. 110–114. In Proceedings of the 10th Annual Zebra Chip Reporting Session. 2010, ed. F. Workneh, and C.M. Rush. Dallas, TX (November 7–10, 2010).
- CUSTERS, J. H. H. V. General introduction: Plant defense mechanisms and the use of the hypersensitive response to engineer broad-spectrum disease resistance. En: Engineering disease resistance in plants. 2007, 7-49.
- DEMPSEY, D. A., KLESSIG, D. F. SOS - too many signals for systemic acquired resistance? Trends Plant Sci. 2012, 17(9):538-45.
- EBEL, J. and COSIO, E. G. Elicitors of plant defense responses, Int. Ver. Cytol. 1994, 148:1-36.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2011. www.eppo.org (consulta, octubre 2015).
- FLORES, O. A., M. G. GALLEGOS, and M. O. GARCÍA. Memorias del simposio punta morada de la papa. Universidad Autónoma Agraria Antonia Narro. 2004, Saltillo, Coahuila, México.

- FLORES, O. A. Etiología, Detección Molecular y Manejo Integrado del Síndrome de la Punta Morada de la Papa en México. XL Congreso Nacional y XV Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología Revista Mexicana de Fitopatología. 2013,-Vol. 31 (Suplemento).
- FORNONI, J., NUÑEZ-FARTAN, J., VALVERDE, P. L. and RAUSHER, M. Evolution of Mixed strategies of plant defense allocation against natural enemies. *Evolution*. 2004, 58:1685-1695.
- FRAC, Code List. 2015. <http://www.frac.info/> (Consultado 16 de octubre del 2015)
- GARCÍA-NERIA, M.A., and RIVERA-BUSTAMANTE, R. Characterization of Geminivirus Resistance in an Accession of Capsicum chinese Jacq. *Mol. Plant, Microb Interac*. 2011, 24:172-182.
- GALICIA, C. R. M. Efecto de una atmosfera rica en CO₂ en la acumulación de etanol y actividad de la polifenoloxidasas mediante la formación de pigmentos en papa. 2001. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- GARZÓN, T. J. A. BECERRA, F. A. MARÍN, A. MEJÍA, A. C. Y. and BYERLY, M. K. F. Manejo integrado de la enfermedad permanente del tomate (*Lycopersicon lycopersicum* Karst ex Fawll Mill.), en El Bajío. In: Urías, C.; Rodríguez, R. y Alejandre, T. (eds). Afidos como vectores de virus en México. *Fitopatología, Colegio de Postgraduados, México*. 1992, 1:116-118
- GHARALARI, A. H., NANSEN, C., LAWSON, D. S., GILLEY, J., MUNYANEZA, J. E., VAUGHN, K. Knockdown mortality, repellency, and residual effects of insecticides for control of adult *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*. 2009, 102: 1032–1038.
- GOOLSBY, J. A., ADAMCZYK, J. J., BEXTINE, B. E., MUNYANEZA, J. E., and BESTER, G. Development of an IPM program for management of the potato psyllid to reduce incidence of zebra chip disorder in potatoes. *Subtrop. Plant Sci. J*. 2007, 59:85-94.
- GÓMEZ, D. E., REIS, E. M. Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Química viva*. 2011, No. 1. Año 10.
- GÓMEZ, M. F. J., RAMIREZ, C. E., MOLINA, T. J. Síntesis enzimática de alcaloides en medio no acuoso y evaluación de su actividad biológica. S/F, V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica VI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular.

- GONZÁLEZ, M. S. Respuesta de defensa relacionada con la aplicación del extracto de *Heliopsis longipes* en el patosistema Tomate-*Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Tesis de doctorado. 2011. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- GUEDOT, C., HORTON, D. R., and LANDOLT, P. J. Sex attraction in *Bactericera cockerelli* (Hemiptera:Triozidae). *Chem. Ecol.* 2010, 39:1302-1308.
- HAAS, D., KEEL, C. and REIMANN, C. Signal transduction in plant beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie van Leeuw.* 2002, 81:385–395.
- HAMMERSCHMIDT, R., NICHOLSON, R. L. A survey of plant defense responses to pathogens. In: Agrawal A, Tuzun S, eds. *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores*. 1999, St Paul, MN: APS Press, 55–71.
- HANSEN, A. K., TRUMBLE, J. T., STOUTHAMER, R. and PAINE, T. A new Huanglongbing species, “*Candidatus Liberibacter psyllauros*”, found to infected tomato and potato is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, 74:5862-5865.
- HIRAGA, S., SASAKI, K., ITO, H., OHASHI, Y., and MATSUI, H. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 2001, 42(5):462-468.
- HOLOPAINEN, J. K. and BLANDE, J. M. Where do herbivore-induced plant volatiles go? *Frontiers in Plant Science*. 2013, Volume 4: Article 185.
- JAGQUEIX, S., BOVÉ, J. M., GARNIER, M. The Phloem Limited Bacterium of greening disease of citrus is a Member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994, 44:379-386.
- JALALI, B. L. and BHARGABA, S. Gene expression during host plant and fungal pathogen interactions. *Proc Nat Acad Sci India*. 2002, 72:235-255.
- JEPSON, S. B. Citrus Greening Disease (Huanglobing). OSU Plant Clinic, Oregon State University. 2008, Corvallis, OR, USA. Corvallis OR 97331-2903.
- KASHIWADA, Y., ITO, C., KATAGIRI, H., MASE, I., KOMATZU, K., NAMBA, T., IKESHIRO, Y. Amides of the fruit of *Zanthoxylum* spp. *Phytochemistry*. 1997, 44: 1125–1127.

- LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICA FITOSANITARIA (LANREF). Ficha técnica, Zebra chip- *Candidatus Liberibacter solanacearum*. 2013, SENASICA.
- LACEY, L. A., DE LA ROSA, F., HORTON, D. R. Insecticidal activity of entomopathogenic fungi (Hypocreales) for potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae): Development of bioassay techniques, effect of fungal species and stage of the psyllid, *Biocontrol Science and Technology*. 2009, 19: 9, 957-970.
- LACEY, L. A., LIU, T. X., BUCHMAN, J. L., MUNYANEZA, J. E., GOOLSBY, J. A., HORTON, D. R. Entomopathogenic fungi (Hypocreales) for control of potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Triozidae) in an area endemic for zebra chip disease of potato. *Biological Control*. 2010 56 (2011) 271-278.
- LEE, I. M., BOTTNER, K. D., SECOR, G., and RIVERA-VARAS V. '*Candidatus Phytoplasma americanum*', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006, 56, 1593–1597.
- LEIGHTON, F. y URQUIAGA I. Polifenoles del vino y Salud Humana, Antioxidantes y Calidad de Vida, *Revista antioxidantes y calidad de vida*. 2001. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- LEVY, J., RAVINDRAN, A., GROSS, D., TAMBORINDEGUY, C. and PIERSON E. Translocation of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the Zebra Chip Pathogen, in Potato and Tomato. *The American Phytopathological Society*. 2011, Vol. 101, No. 11, 2011.
- LIEFTING, L. W., SUTHERLAND, P. W., WARD, L. I., PAICE, K. L., WEIR, B. S., CLOVER, G. R. G. A new "*Candidatus Liberibacter*" species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Dis*. 2009a, 93:208-214.
- LIEFTING, L. W., SUTHERLAND, P. W., WARD, L. I., PAICE, K. L., WEIR, B. S. and CLOVER, G. R. G. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease*. 2009b, 93, 208–214.
- LIN, H., LOU, B., GLYNN, J. M., DODDAPANENI, H., CIVEROLO, E. L., CHEN, C., DUAN, Y., ZHOU, L., VAHLING, C. M. The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with potato zebra chip disease. Submitted (09-DEC-2010) National Center for Biotechnology Information, NIH, and Bethesda, MD 20894, USA. 2010. Online Only.

- LIN, H. and GUDMESTAD, N. C. Aspects of Pathogen Genomics, Diversity, Epidemiology, Vector Dynamics, and Disease Management for a Newly Emerged Disease of Potato: Zebra Chip. *Phytopathology*. 2013, Vol. 103, No. 6: 525
- LIU, D and TRUMBLE, J. T. Tomato psyllid behavioral responses to tomato plant lines and interactions of plant lines with insecticides. *J. Econ. Entomol.* 2004, 97:1078-1085.
- MACKAY, G. J., BROWN, Y. C., TORRANCE. The processing potential of tubers of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. after storage at low temperature 1. Fry color. *Potato Res.* 1990, 33:211-218.
- MADRIZ-ORDEÑANA, K. Mecanismos de defensa en las interacciones planta patógeno. *Manejo integrado de planga. Costa Rica.* 2002, No. 63: 22-32.
- MARTINEZ, C., BLANC, F. L. E., C. E., BESNARD, Q., NICOLE, M. and BACCOU, J.C. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melón cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol.* 2001, 127:334-344.
- MEJÍA, L., DURAN, F.D., CHAPA, A.M., TORRES, I., CRUZ, A., GONZÁLEZ, M.M., OCAMPO, R.V., and GUEVARA, R.G. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annum* L. after hydrogen peroxid, salicylic acid and chitosan foliar applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14:10178-10196.
- MÉNDEZ, B. A. Efecto de la alcamida N-isobutil decanamida en la expresión global de genes de *Arabidopsis thaliana*. 2012, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- MÉNDEZ, B. A., CALDERÓN, V. C., IBARRA, L. E., RAYA, G. J., RAMÍREZ, C. E. Alkamides Activate Jasmonic Acid Biosynthesis and Signaling Pathways and Confer Resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 2011, 6(11): e27251.
- MOHAN, E. N., KNOWLES, L. O., KNOWLES, N., RICHARDS. Zebra chip disease decreases tuber (*Solanum tuberosum* L.) protein content by attenuating protease inhibitor levels and increasing protease activities. 2015. *Planta online*.
- MOLINA-TORRES, J., SALGADO-GARCIGLIA, R., RAMIREZ-CHÁVEZ, E., DEL RIOS, R. Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *acmella* (*spilanthus oppositifolia*). *Biochem Syst Ecol.* 1996, 24:43-47.

- MONTAÑO, L. I., GUERRERO, R. A., CHÁVEZ, R. E., MOLINA, T. E. y VALDÉS R. S. Análisis de la expresión diferencial de proteínas de las raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con afinina. 2006.
- MUNYANEZA, J. E., CROSSLIN, J. M., UPTON, J. E. Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: *Psyllidae*) with “zebra chip”, a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal of Economic Entomology*. 2007a, 100: 656–663.
- MUNYANEZA, J. E., GOOLSBY, J. A., CROSSLIN, J. M. and UPTON, J. E. Further evidence that zebra chip potato disease in the lower Rio Grande Valley of Texas is associated with *Bactericera cockerelli*. *Subtropical Plant Science*. 2007b, 59, 30 –37.
- MUNYANEZA, J. E., SENGODA, V. G., GARZÓN, T. J. A., CÁRDENAS, V. O. G. First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in tomato plants in Mexico. *Plant Disease*. 2009a, 93:10:1076.
- MUNYANEZA, J. E., SENGODA, V. G., GARZÓN, T. J. A., CÁRDENAS, V. O. G. First Report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in pepper plants in Mexico. *Plant Disease*. 2009b, 93:10:1076.
- MUNYANEZA, J. E., FISHER, T. W., SENGODA, V. G., GARCZYNSKI, S. F., NISSINEN, A., and LEMMETTY, A. First report of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in carrots in Europe. *Plant Dis*. 2010a, 94:639.
- MUNYANEZA, J. E. Psyllids as vectors of emerging bacterial diseases of annual crops. *Southwestern Entomologist*. 2010, 35, 417–477.
- MUNYANEZA, E. J., SENGODA, G. V., BUCHMAN, L. J., and FISHER, W.T. Effects of temperature on “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” and Zebra Chip Potato Disease Symptom Development. *Plant Disease*. 2011a, 10.1094/PDIS-03-11-0185.
- MUNYANEZA, J. E., BUCHMAN, J. L., SENGODA, V. G., FISHER, T. W., PEARSON, C. C. Susceptibility of Selected Potato Varieties to Zebra Chip Potato Disease. *Am. J. Pot Res*. 2011b, 88:435–440.
- MUNYANEZA, J. E. Zebra chip disease of potato: biology, epidemiology, and management. *American Journal of Potato Research*. 2012, 89, 329–350.
- MURRAY, R. G. E. and SCHLEIFER, K. H. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994, 44:174.

- MURRAY, R. G. E. and STACKEBRANDT, E. Taxonomic note: Implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described Procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1995 45:186-187.
- NACHAPA, P., SHAPIRO, A., TAMBORINDEGUY, C. Effect of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" on fitness of its vector, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) on tomato. *Phytopathology*. 2012, 102, 41-46.
- NAVARRE, D. A., SHAKYA, R., HOLDEN, J. and CROSSLIN, J. M. LC-MS Analysis of Phenolic Compounds in Tubers Showing Zebra Chip Symptoms. *Am. J. Pot Res.* 2009, 86:88–95
- NAVARRO, G. G. Química agrícola. Segunda edición. 2003, 438 pp.
- NOCTOR, G. and C.H. FOYER. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 1998, 49: 249–279.
- OJEDA, M., DE CAMARO, M. P., RODRIGUEZ, D., GALLARDO, M. y VALERA R. Evaluación hortícola, producción y calidad postcosecha de clones avanzados de papa en la localidad de Duaca, estado de Lara, Venezuela. *Biogro*. 2010, 22(1):17-28.
- PAVLISTA, A. D. Potato (tomato) psyllids. *Nebraska Potato Eyes*. 2002, 14: 1-4.
- PADAYATT, S. J., DARUWALA, R., WANG, Y., ECK, P. K., SONG, J., KOH, W. S., LEVINE, M. Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. In: *Handbook of Antioxidants*. CADENAS, E.; PACKER, L. (eds) 2nd edition. 2001. CRC Press. Washington DC, EE.UU. pp. 117-145.
- PARMAR, V., JAIN, S., BISHT, K., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O., PRASAD, A., WENGEL, J., OLSEN, C., BOOL, P. Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*. 1997, 46: 597–673.
- PASCHOLATI, S. F., LEITE, B., STANGARLIN, J. R., CIA, P. Interação Planta – Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. FEALQ, Piracicaba, 2008, 411-429.
- PAZ-LAGO, D., GUTIÉRREZ, A. y LUZARDO, L. Relevancia biológica de la enzima β 1,3 glucanasa en la activación de la resistencia sistémica del tabaco inducida por la pared celular fúngica. *Cultivos Tropicales*. 1998, Vol. 19, no. 3, p. 25-27.

- PENG, L., TRUMBLE, J. T., MUNYANEZA, J. E., LIU, T. X. Repellency of a kaolin particle film to potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae), on tomato under laboratory and field conditions. *Pest Management Science*. 2011, 67: 815–824.
- PIETERSE, C. M. J., TON, J. and VAN LOON, L. C. Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden? *Agri Biotech Net*. 2001, 3:1–18.
- PLETSCH, D. J. The potato psyllid *Paratrioza cockerelli* (Sulc), its biology and control. *Montana Agric. Exp. St. Bull.* 1947, 446: 1-95.
- RAMÍREZ-CHÁVEZ, E., LOPEZ-BUCIO, J., HERRERA-ESTRELLA, L., MOLINA-TORRES, J. Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 134:1058-1068.
- RASHED, A., WALLIS, C. M., PAETZOLD, L., WORKNEH, F., and RUSH, C. M. Zebra chip disease and potato biochemistry: Tuber physiological changes in response to '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' infection over time. *Phytopathology*. 2013, 103:419-426.
- REDDIVARI, L., HALE, L. A., and MILLER J. C. J. R. Determination of Phenolic Content, Composition and their Contribution to Antioxidant Activity in Specialty Potato Selections. *Amer J of Potato Res*. 2007, 84:275-282.
- RIVERO, A. S., POCASANGE, L. E., ROSALES, F. E. Inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Memoria del taller internacional.
- RIVEROS, A. S., ROSALES, F. E., POCASANGRE, L. E. Manejo alternativo de *Mycosphaerella fijiensis* a través de la inducción de resistencia y uso de bioproductos. XVI Reunión Internacional Acorbat. 2004; 47-52 (6 pantallas). Recuperable de: http://musalit.inibap.org/pdf/IN050666_es.pdf
- RIVEROS, A. A. S. Inducción de resistencia en plantas. Interacción planta: patógeno. San José, C. R. 2010, IICA. p. 261.
- ROMERO-ROMERO, M. T. and LOPEZ-DELGADO, H. A. Ameliorative Effects of Hydrogen Peroxide, Ascorbate and Dehydroascorbate in *Solanum Tuberosum* Infected by *Phytoplasma*. *Am. J. Pot Res* 86:218–22.
- ROY, A. and BRLANSKY, R. H. Population dynamics of a Florida *Citrus tristeza virus* isolate and aphid-transmitted subisolates: identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. *Phytopathology*. 2009, 99:1297-1306.

- RUBIO-COVARRUBIAS., O. Á., ALMEYDA-LEÓN, I. H., CADENA-HINOJOSA, M. A. and LOBATO-SÁNCHEZ, R. Relación entre *Bactericera cockerelli* y presencia de *Candidatus Liberibacter psyllauros* en lotes comerciales de papa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 2011, 2(1), 17-28.
- SALGADO, S. M. L. Inductores de resistencia a TuMV en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Tesis doctoral. 2012, Colegio de Postgraduados.
- SAKUMA, H, Y., ARAKI, K., TANAKA, T., KINBARA, K., IMANISHI, T., SHIGYO, Y., KUCHII, M., OGAWA, R., ISHIKAWA. and H. SAWADA. JPN. J. PHYTOPATHOL. 2008, 74, 267.
- SAKUMA, H. 26th Symposium by the Bioactivity of Pesticides Committee, 1 (2009).
- SALAZAR, M., ZAMBRANO, J., y VALECILLOS, H. Evaluación del rendimiento y características de calidad de trece clones avanzados de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agricultura Andina*. Volumen 14, enero-junio 2008. pp. 101-117.
- SAS. Institute.2002. Version 9.0. Español.
- SCHNEIDER, H. Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. *Phytopathology*. 1968, 58: 1155-1160.
- SECOR, G. A., RIVERA, V. V. Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Rev. Latinoamericana Papa*. 2004, Suppl. 1:1-8.
- SECOR, G. A., RIVERA, V. V., ABAD, I. M., LEE, G. R. G., CLOVER, L. W., LIEFTING, X., LI, DE BOER, S. H. Association of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' with zebra chip disease of potato established by graft and psyllid transmission, electron microscopy, and PCR. *Plant Disease*. 2009, 93: 574–583.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (Fecha de consulta 9 de octubre del 2015).
- SING, K., KUMAR, S., RANI, A., GULATI, A., AHUJA, P. S. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Funct Integr Genomics*. 2009, 9:125-134.
- SONG, J. and WANG, A. Molecular cloning, expression and characterization of phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Biol. Rep*. 2009, 36:939-952.

- STELLA, R. A. A. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 2001, No. 61 p. 4 - 11.
- STUSHNOFF, C., HOLM, D., THOMPSON, M. D., JIANG, W., THOMPSON, H. J., JOYCE, N. I., and WILSON, P. Antioxidant properties of cultivars and selections from the Colorado potato breeding program. *Am. J. Pot Res.* 2008, 85:267–27.
- SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD. 2011. Applied Development of a Novel Fungicide Isotianil (Stout®). Vol. 2011-I.
- TAKUR, R. P. Host Plant Resistance to Diseases: Potential and limitations. *Indian Journal of Plant Protection.* 2007, Vol. 35 No. 1:17-21.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. Fisiología vegetal. 3ra Edición. 2007. Vol. 1. ISBN: 978-848021-601-2.
- TANAKA, F. A. O., COLLETA, F. H. D., ALVES, K. C. S., SPINELLI, M. O., MACHADO, M. A., KITAJIMA, E. W. Detection of the "*Candidatus Liberibacter americanus*" in phloem vessels of experimentally infected *Catharanthus roseus* by scanning electron microscopy. *Fitopatol. Bras.* 2007, 36, 519–520.
- TEXEIRA, C. D., SAILLARD, C., EVEILLARD, S., DANET, L. J., DA COSTA, P., AYRES, J. A., BOVÉ, J. "*Candidatus Liberibacter americanus*", associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2005, 55:1857–1862.
- VAN LOON, L. C. Systemic induced resistance. In: Mechanisms of resistance to plant diseases (Slusarenko AJ, Fraser RSS & van Loon LC eds.) Kluwer: Dordrecht. 2000, pp 521–574.
- VAN LOON, L. C. and GLICK, B. R. Increased plant fitness by rhizobacteria. In: Molecular ecotoxicology of plants (Sandermann H eds.) Springer-Verlag, Berlin: Heidelberg. 2004, pp 177–205.
- VAN LOON, L., REP, M., PIETERSE, C. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants, *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006, Vol 44, pg: 135-162.
- VLOT, A. C., DEMPSEY, D. A., KLESSING, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology.* 2009, 47: 177-206.

- WALLIS, M. C., CHEN, J. and CIVEROLO, E. L. Zebra chip-diseased potato tubers are characterized by increased levels of host phenols, amino acids, and defense-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2012, 78:66-72.
- WALTERS, D., NEWTON, A., LYON, G. D. *Induced Resistance for Plant Defence, A Sustainable Approach to Crop Protection*. Blackwell Publishing. 2007. 1st. ed.
- WEN, A., MALLIK, I., ALVARADO, V. Y., PASCHE, J. S., WANG, X., LI, W., LEVY, L., LIN, H., SCHOLTHOF, H., MIRKOV, E., RUSH, C. M., and GUDMESTAD, N. C. Detection, distribution, and genetic variability of 'Candidatus Liberibacter' species associated with the zebra complex disease of potato in the North America. *Plant Dis*. 2009, 93:1102-115.
- YAN, Z., REDDY, M. S., RYU, C. M., M. C., INROY, J. A., WILSON, M. and KLOEPPER, J. W. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by PGPR. *Phytopathol*. 2002, 92: 1329–1333.
- YANG, X. B., ZHANG, Y. M., HUA, L., PENG, L. N., MUNYANEZA, J. E, LIU, T. X. Repellency of selected biorational insecticides to potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Psyllidae). *Crop Protection*. 2010, 29: 1329–1324.
- YEDIDIA, I., BENHAMOU, N. and CHET, I. Induction of Defense responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol*. 1999, 65 (3):1061.
- ZAMBRANO, J., QUINTERO, I., VALERA, A., MAFFEI, M., CORASE, H. y MATERANO, W. Evaluation of promising potato (*Solanum tuberosum* L.) clones in Trujillo state. II Quality attributes. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2010, 27: 399-417
- ZHAO, J., LAWRENCE, C. D., VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv*. 2005, 23:283-333.

Anexos

Anexo 1. Escala de severidad propuesta de acuerdo a la sintomatología expresada por la infección de CaLso.

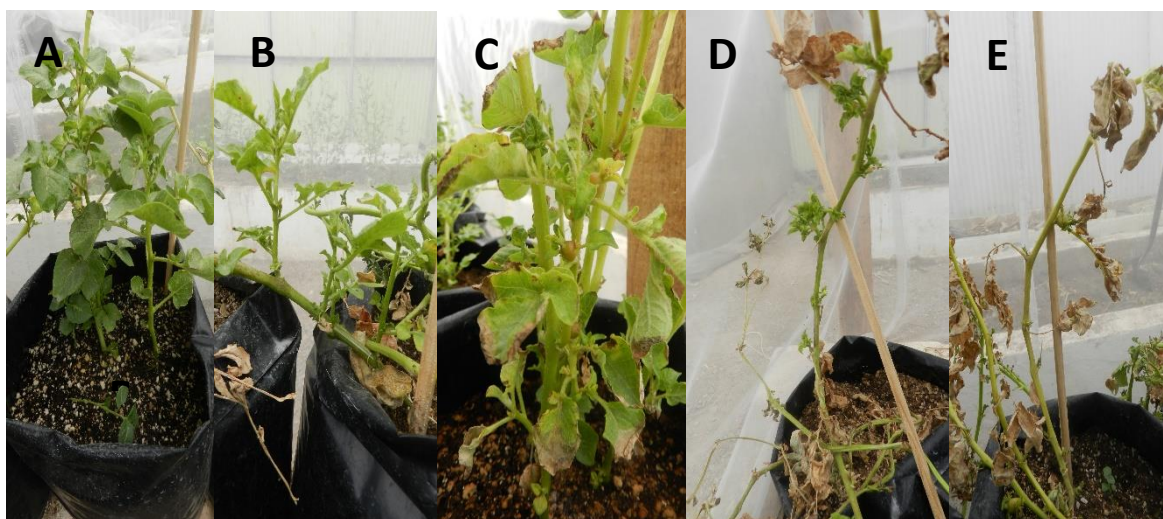
A) 0% severidad (planta sana)

B) 25% severidad

C) 50% severidad

D) 75% severidad

E) 100% (planta muerta).



Anexo 2. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), para PAL en diferentes horas de muestreo y aplicación.

Contenido de PAL a las 12 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	46.727c	78.80	<.0001
T3	3	103.138a		
T5	3	73.929b		
T7	3	66.016 b		

Contenido de PAL a las 24 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	69.009b	20.69	0.0004
T3	3	96.753a		
T5	3	62.417b		
T7	3	72.519b		

Contenido de PAL a las 48 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	110.492a	96.55	<.0001
T3	3	72.836b		
T5	3	70.689b		
T7	3	78.122b		

Contenido de PAL a las 12 h primera aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	89.312a	43.09	<.0001
T4	3	80.234b		
T6	3	82.652ba		
T7	3	66.016c		

Contenido de PAL a las 24 h primera aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	88.532a	8.24	0.0079
T4	3	82.092ba		
T6	3	76.051b		
T7	3	72.519b		

Contenido de PAL a las 48 h primera aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	82.959b	25.16	0.0002
T4	3	89.937a		
T6	3	79.948cb		
T7	3	78.122c		

Contenido de PAL a las 12 h segunda aplicación curativa				
---	--	--	--	--

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	61.956b	87.91	<.0001
T3	3	94.093a		
T5	3	50.118c		
T7	3	69.988b		

Contenido de PAL a las 24 h segunda aplicación curativa

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	96.711a	52.97	<.0001
T3	3	93.840a		
T5	3	57.094c		
T7	3	75.279b		

Contenido de PAL a las 48 h segunda aplicación curativa

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	154.121a	995.69	<.0001
T3	3	67.021b		
T5	3	49.857c		
T7	3	69.606b		

Contenido de PAL a las 12 h segunda aplicación preventiva

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	101.574a	16.51	0.0009
T4	3	61.476b		
T6	3	79.250b		
T7	3	69.988b		

Contenido de PAL a las 24 h segunda aplicación preventiva

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	59.919b	13.07	0.0019
T4	3	73.887a		
T6	3	79.027a		
T7	3	75.279a		

Contenido de PAL a las 48 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	57.120b	12.33	0.0023
T4	3	74.178a		
T6	3	78.104a		
T7	3	69.606a		

Anexo 3. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), para POD en diferentes horas de muestreo y aplicación.

Contenido de POD a las 12 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.24115d	54.85	<.0001
T3	3	0.47363c		
T5	3	0.96540a		
T7	3	0.75557b		

Contenido de POD a las 24 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.91014a	1.89	0.2090
T3	3	0.97096a		
T5	3	0.92086a		
T7	3	0.88130a		

Contenido de POD a las 48 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.77586bc	8.02	0.0085
T3	3	0.75156c		
T5	3	0.93729a		
T7	3	0.91144ba		

Contenido de POD a las 12 h primera aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.43813c	75.97	<.0001
T4	3	0.67161b		
T6	3	0.95132a		
T7	3	0.75557b		

Contenido de POD a las 24 h primera aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	1.26040a	25.53	0.0002
T4	3	1.33519a		
T6	3	0.92181b		
T7	3	0.88130b		

Contenido de POD a las 48 h primera aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.76983b	62.89	<.0001
T4	3	0.33246c		
T6	3	0.94525a		
T7	3	0.91144ba		

Contenido de POD a las 12 h segunda aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.59186a	106.71	<.0001
T3	3	0.28313b		
T5	3	0.14587c		
T7	3	0.59097a		

Contenido de POD a las 24 h segunda aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.56034a	72.67	<.0001
T3	3	0.27370b		
T5	3	0.15777b		
T7	3	0.62079a		

Contenido de POD a las 48 h segunda aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.53413a	98.46	<.0001
T3	3	0.20275b		
T5	3	0.13739b		
T7	3	0.55826a		

Contenido de POD a las 12 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.41112b	33.43	<.0001
T4	3	0.24411c		
T6	3	0.58212a		
T7	3	0.59097a		

Contenido de POD a las 24 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.58717a	13.95	0.0015
T4	3	0.40110b		
T6	3	0.57579a		
T7	3	0.62079a		

Contenido de POD a las 48 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.23745c	75.39	<.0001
T4	3	0.35505b		
T6	3	0.54076a		
T7	3	0.55826a		

Anexo 4. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), para proteínas totales en diferentes horas de muestreo y aplicación.

Contenido de proteínas totales a las 12 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	1.97068a	357.09	<.0001
T3	3	0.93134c		
T5	3	1.00994cb		
T7	3	1.09146b		

 Contenido de proteínas totales a las 24 h primera aplicación curativa

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	1.23703a	15.16	0.0012
T3	3	1.01576b		
T5	3	1.00994b		
T7	3	0.99539b		

 Contenido de proteínas totales a las 48 h primera aplicación curativa

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	1.17298b	86.00	<.0001
T3	3	1.33019a		
T5	3	1.05070c		
T7	3	0.92260d		

 Contenido de proteínas totales a las 12 h primera aplicación preventiva

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	1.05070b	39.17	<.0001
T4	3	1.15842a		
T6	3	0.81779c		
T7	3	1.09146ba		

 Contenido de proteínas totales a las 24 h primera aplicación preventiva

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	1.07108b	15.51	0.0011
T4	3	1.24576a		
T6	3	0.89349c		
T7	3	0.99539cb		

 Contenido de proteínas totales a las 48 h primera aplicación preventiva

Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	1.1293b	165.96	<.0001
T4	3	1.24576a		
T6	3	0.84982d		
T7	3	0.92260c		

Contenido de proteínas totales a las 12 h segunda aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	1.43500a	58.53	<.0001
T3	3	1.19627b		
T5	3	1.52525a		
T7	3	1.16424b		

Contenido de proteínas totales a las 24 h segunda aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	1.19044cb	31.00	<.0001
T3	3	1.26032b		
T5	3	1.53689a		
T7	3	1.08273c		

Contenido de proteínas totales a las 48 h segunda aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.99247d	299.89	<.0001
T3	3	1.79309a		
T5	3	1.54272b		
T7	3	1.17589c		

Contenido de proteínas totales a las 12 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	1.26323a	4.55	0.0384
T4	3	1.05070ba		
T6	3	0.97209b		
T7	3	1.16424ba		

Contenido de proteínas totales a las 24 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	1.42044a	25.52	0.0002
T4	3	1.29816a		
T6	3	0.98665b		
T7	3	1.08273b		

Contenido de proteínas totales a las 48 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	2.42485a	351.84	<.0001
T4	3	2.17739b		
T6	3	0.98665d		
T7	3	1.17589c		

Anexo 5. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), para fenoles totales en diferentes horas de muestreo y aplicación.

Contenido de fenoles totales a las 12 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.0259323c	22.22	0.0003
T3	3	0.0304104b		
T5	3	0.0304782b		
T7	3	0.0335315a		

Contenido de fenoles totales a las 24 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.033260a	3.39	0.0743
T3	3	0.035906a		
T5	3	0.029664a		
T7	3	0.033803a		

Contenido de fenoles totales a las 48 h primera aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.037399a	9.83	0.0046
T3	3	0.037535a		
T5	3	0.030275b		
T7	3	0.034142ba		

Contenido de fenoles totales a las 12 h primera aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.029800a	1.65	0.2534
T4	3	0.032107a		
T6	3	0.030207a		
T7	3	0.033531a		

Contenido de fenoles totales a las 24 h primera aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.031700ba	4.26	0.0450
T4	3	0.036653a		
T6	3	0.030410b		
T7	3	0.033803ba		

Contenido de fenoles totales a las 48 h primera aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.0340743b	30.26	0.0001
T4	3	0.0395701a		
T6	3	0.0304104c		
T7	3	0.0341421b		

Contenido de fenoles totales a las 12 h segunda aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.031089a	2.51	0.1325
T3	3	0.033328a		
T5	3	0.031496a		
T7	3	0.037060a		

Contenido de fenoles totales a las 24 h segunda aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.038552a	4.12	0.0484
T3	3	0.036924ba		
T5	3	0.033667b		
T7	3	0.037195ba		

Contenido de fenoles totales a las 48 h segunda aplicación curativa				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T1	3	0.0407236a	6.84	0.0134
T3	3	0.0388238ba		
T5	3	0.0378060b		
T7	3	0.0367883b		

Contenido de fenoles totales a las 12 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.043438a	25.50	0.0002
T4	3	0.042352a		
T6	3	0.031428c		
T7	3	0.037060b		

Contenido de fenoles totales a las 24 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.045270a	42.79	<.0001
T4	3	0.044320a		
T6	3	0.031496c		
T7	3	0.037195b		

Contenido de fenoles totales a las 48 h segunda aplicación preventiva				
Tratamiento	n	Media	F-Valor	Pr > F
T2	3	0.0466943a	142.00	<.0001
T4	3	0.0460837a		
T6	3	0.0306818c		
T7	3	0.0367883b		

Anexo 6. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para pH.

Tratamiento	Media	n	F-valor	Pr>F
T1	6.82b	4	16.56	<.0001
T2	6.635c	4		
T3	6.78cb	4		
T4	7.1425a	4		
T5	6.825b	4		
T6	6.9275b	4		
T7	6.87b	4		

Anexo 7. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para grados Brix.

Tratamiento	Media	n	F-valor	Pr>F
T1	5.3a	4	7.13	0.0003
T2	4.525ba	4		
T3	5.45a	4		
T4	4.775ba	4		
T5	5.425a	4		
T6	4.825ba	4		
T7	3.975b	4		

Anexo 8. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para vitamina C.

Tratamiento	Media	n	F-valor	Pr>F
T1c	8.8	3	45.57	<.0001
T2a	10.56	3		
T3b	9.68	3		
T4c	8.8	3		
T5a	11	3		
T6a	11.1467	3		
T7a	10.56	3		

Anexo 9. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para firmeza.

Tratamiento	Media	n	F-valor	Pr>F
T1	0.2375a	4	1.96	0.117
T2	0.34375a	4		
T3	0.28375a	4		
T4	0.29875a	4		
T5	0.30875a	4		
T6	0.31a	4		
T7	0.26875a	4		

Anexo 10. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para diámetro ecuatorial.

Tratamiento	Media	n	F-Valor	Pr > F
T1	16.707bac	15	5.66	<.0001
T2	20.067ba	15		
T3	15.19bc	15		
T4	14.74bc	15		
T5	12.897c	15		
T6	12.905c	15		
T7	22.971a	15		

Anexo 11. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para diámetro polar.

Tratamiento	Media	n	F-Valor	Pr > F
T1	21.561bac	15	6.49	<.0001
T2	25.221ba	15		
T3	17.649bc	15		
T4	19.322bc	15		
T5	15.601c	15		
T6	16.167bc	15		
T7	30.558a	15		

Anexo 12. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para peso.

Tratamiento	Media	n	F-Valor	Pr > F
T1	5.485b	15	9.69	<.0001
T2	8.031b	15		
T3	4.213b	15		
T4	4.691b	15		
T5	4.047b	15		
T6	3.888b	15		
T7	14.245a	15		

Anexo 13. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para número de tubérculos por planta.

Tratamiento	Media	n	F-Valor	Pr > F
T1	7.8a	15	7.07	<.0001
T2	5.2bac	15		
T3	3.846bc	15		
T4	2c	15		
T5	5.4ba	15		
T6	3.2bc	15		
T7	7.333a	15		

Anexo 14. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para incidencia.

Tratamiento	Media	n	F-valor	Pr>F
T1	72a	15	10.5	<.0001
T2	78a	15		
T3	72a	15		
T4	42a	15		
T5	78a	15		
T6	72a	15		
T7	0b	15		

ANEXO 15. Comparación de medias y análisis estadístico mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para severidad.

Tratamiento	Media	n	F-valor	Pr>F
T1	33.859a	15	5.56	<.0001
T2	22.935ba	15		
T3	27.351ba	15		
T4	11.95bc	15		
T5	19.567bac	15		
T6	11.44bc	15		
T7	0c	15		