



Saltillo, Coahuila a 14 de diciembre de 2021

### Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

#### Coordinación de Posgrado

PRESENTE


Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por MÓNICA ESTEFANÍA GARCÍA MONTES titulado "Efecto de nanopartículas cargadas con ácido acético salicílico para el control preventivo contra Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 en plantas de tomate (Solanum lycopersicum)" el cual fue presentado el día 10 de diciembre de 2021, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento corresponde a la versión final del documento de tesis.

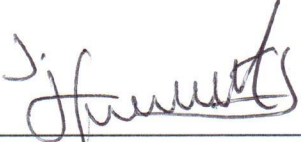
Atentamente,

#### SINODALES

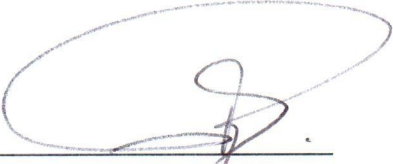
  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ileana Vera Reyes**  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Carlos Patricio Illescas Riquelme**  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Adrien Gallou**  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. José Humberto Valenzuela Soto**

Vo. Bo. de los Asesores

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ramiro Guerrero Santos**



## TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

---

AUTOR: MÓNICA ESTEFANÍA GARCÍA MONTES FIRMA 

TITULO: Efecto de nanopartículas cargadas con ácido acetil salicílico para el control preventivo contra Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 en plantas de tomate (Solanum lycopersicum).

ASESORES: Dr. José Humberto Valenzuela Soto

FIRMA 

Dr. Ramiro Guerrero Santos

FIRMA 

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

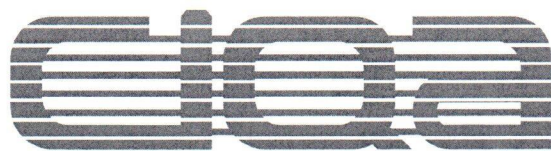
Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 10 de Diciembre de 2021



Sello de la Institución

Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández  
Director General del CIQA



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA**  
**Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura**

***TESIS***

**Efecto de nanopartículas cargadas con ácido acetil salicílico para el control preventivo contra *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)**

***Presentada por:***

**MÓNICA ESTEFANÍA GARCÍA MONTES**

***Para obtener el grado de:***

**Maestro en Ciencia en Agroplasticultura**

***Asesorada por:***

**Dr. José Humberto Valenzuela Soto**  
**Dr. Ramiro Guerrero Santos**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA**  
**Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura**

***TESIS***

**Efecto de nanopartículas cargadas con ácido acetil salicílico para el control preventivo contra *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)**

***Presentada por:***

**MÓNICA ESTEFANÍA GARCÍA MONTES**

***Para obtener el grado de:***

**Maestro en Ciencias en Agroplasticultura**

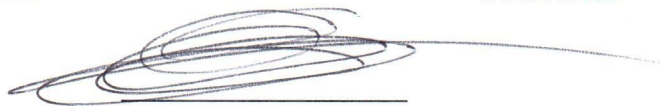
***Asesorada por:***

**Dr. José Humberto Valenzuela Soto  
Dr. Ramiro Guerrero Santos**

**SINODALES**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ileana Vera Reyes**  
**Presidente**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Carlos Patricio Illescas Riquelme**  
**Secretario**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Adrien Gallou**  
**Vocal**



Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

Saltillo, Coah, a 7 de enero de 2022

Declaración de documento libre de plagio:

Mediante esta declaración manifestamos que el documento de tesis titulado "Efecto de nanopartículas cargadas con ácido acetil salicílico para el control preventivo contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*)" redactado por Ing. Mónica Estefanía García Montes, y revisado por el Dr. José Humberto Valenzuela Soto y el Dr. Ramiro Guerrero Santos, está libre de plagio cumpliendo los siguientes aspectos:

Autenticidad y crédito a las fuentes	Revisado*
Los textos son originales	X
El documento está libre de oraciones y párrafos copiados de otras fuentes bibliográficas, sitios de internet, etc.	X
El documento está libre de traducciones literales emanadas de literatura en otro idioma	X
Los textos están debidamente referenciados	X
Las citas textuales (si las hay) están entrecomilladas y referenciadas	X
Fotografías, esquemas, gráficas, tablas y otros materiales emanados de otras fuentes están referenciados.	X
Se adjunta reporte de revisión realizado con el software iThenticate con un registro de 4 % de similitud	X

\*Marque con una "X"

Ing. Mónica Estefanía García Montes  
Nombre y firma de la autora

Dr. José Humberto Valenzuela Soto  
Nombre y firma del  
Asesor/director

Dr. Ramiro Guerrero Santos  
Nombre y firma del  
Co-asesor/Co-director



## **DECLARACIÓN**

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 10 de diciembre de 2021



MÓNICA ESTEFANÍA GARCÍA MONTES

Nombre y Firma

## *Agradecimientos*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico para desarrollar este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada por brindarme su apoyo para continuar con mi formación profesional.

A la Dra. Yolanda Ortega por su apoyo técnico y emocional en todo momento, fue parte esencial para poder terminar esta investigación, sin usted no lo hubiera logrado, ¡Gracias!

A las Dras. Ileana Vera y Mona Kassem por compartir su experiencia y consejos en el laboratorio.

A mis asesores de tesis Dr. Humberto Valenzuela y Dr. Ramiro Guerrero.

## *Dedicatoria*

Al Dios.

A mis padres, Rodolfo García y San Juana Montes por siempre apoyarme en las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida y darme la mejor herencia, mi estudio, qué más puedo pedir ¡Gracias!

A mis hermanos Fito, Elizabeth y Adolfo, por apóyame en esta etapa y sentirse orgullosos de mí. Espero ser ejemplo positivo para sus hijos.

A David Sesmas por apoyarme en todo momento, estar conmigo en otra etapa importante de mi vida, por alentarme a no darme por vencida, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos y por hacerme sentir amada, te amo mi amor.





## ÍNDICE GENERAL

I	RESUMEN .....	8
II	INTRODUCCIÓN .....	9
III	JUSTIFICACIÓN.....	10
IV	ANTECEDENTES .....	10
	IV.1 Cultivo de tomate en México .....	10
	IV.2 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 .....	11
	IV.3 Tratamiento para enfermedades bacterianas.....	12
	IV.4 Respuestas defensivas en plantas.....	12
	IV.5 Inductores de resistencia.....	13
	IV.6 Señalización en plantas contra patógenos.....	14
	IV.7 Resistencia inducida en plantas .....	14
	IV.8 Priming .....	16
	IV.9 Nanomateriales en la agricultura .....	18
	IV.10 Ácido salicílico (AS) .....	19
	IV.10.1 Ácido salicílico como inductor de resistencia frente a patógenos .....	20
	IV.10.2 Biosíntesis del ácido salicílico.....	21
	IV. 11 Ácido acetil salicílico (AAS) en plantas .....	22
	IV.12 Análisis de expresión génica.....	23
	IV.12.1 Genes de interés activados por ácido salicílico .....	23
	IV.12.2 Genes activados por ácido jasmónico.....	24
V	HIPÓTESIS.....	26
VI	OBJETIVO GENERAL.....	26
VII	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
VIII	MATERIALES Y MÉTODOS. ....	27
	VIII.1 Material biológico.....	27
	VIII.2 Preparación de inóculo de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 .....	27
	VIII.3 Nanopartículas de ácido acetil salicílico.....	27
	VIII.4 Diseño experimental .....	28
	VIII.5 Bioensayos de patogenicidad .....	28
	VIII.6 Extracción de ARN total. ....	29
	VIII.7 Análisis de expresión génica por RT-PCR semi-cuantitativa .....	31
IX	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
	IX.1 Efecto de AS y NAAS sobre UFC de DC3000 en plantas de tomate. ....	32
	IX.2 Síntomas de las plantas infectadas.....	33
	IX.3 Análisis de expresión génica. ....	33
X	CONCLUSIONES. ....	44
XI	PERSPECTIVAS .....	44
XII	REFERENCIA .....	45
XIII	ANEXOS.....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resistencia Sistémica Adquirida (RSA).....	15
Figura 2. Resistencia Sistémica Inducida (RSI).....	16
Figura 3. Activación de mecanismos de defensa por distintos endo y exoelicitores, así como por moléculas activadoras.....	18
Figura 4. Rutas de activación del AS y AJ.....	22
Figura 5. Distribución de tratamientos en cámara de crecimiento, 2 experimentos (5 repeticiones por experimento) en la misma cámara.....	28
Figura 6. Unidades formadoras de colonia por gramo de tejido (UFC/g). Control absoluto (Control), Control más <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000(PS), nanopartículas más <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000(NAAS+PS) y ácido salicílico más <i>P. syringae</i> pv. <i>Tomato</i> DC3000 (AS+PS). Análisis de varianza (ANOVA), nivel de significancia: ***, $P < 0.0001$ .....	32
Figura 7. Síntomas de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 en plantas de tomate por cada tratamiento. A) Control total, B) Control más DC3000, C) Nanopartículas cargadas con ácido acetilsalicílico más DC3000, y D) Ácido salicílico más DC3000.....	33
Figura 8. Gel de agarosa al 1.5% en donde C1 - Control absoluto repetición 1, Asp+BR1 - Aspirina con bacteria repetición 1, AS+BR1 - Ácido salicílico con bacteria repetición 1, NAAS+BR1 - nanopartículas de ácido acetil salicílico con bacteria repetición 1, C1 - Control absoluto repetición 1, AspR1 - Aspirina sin bacteria repetición 1, ASR1 - Ácido salicílicosin bacteria repetición 1, NAASR1 - nano partículas de ácido acetil salicílico sin bacteria repetición 1, (-) - Blanco.....	34
Figura 9. A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo ( <i>EIF<math>\alpha</math></i> ) y aleno oxido ciclasa (AOC) en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1-Control (C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 9A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento. B) Gráfico de barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo ( <i>EF1<math>\alpha</math></i> ) ...	35
Figura 10. A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo ( <i>EIF<math>\alpha</math></i> )y ACCO en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1-Control (C),2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Controlmás bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 10A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento. B) Gráficode barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo ( <i>EF1<math>\alpha</math></i> ) .....	36
Figura 11. A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo ( <i>EIF<math>\alpha</math></i> ) y ERP1 en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1-Control (C),	

2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 11A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento. B) Gráfico de barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo ( $EF1\alpha$ ) ..... 38

Figura 12. A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo ( $EIF\alpha$ ) y  $PR1$  en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1-Control (C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 12A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento. B) Gráfico de barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo ( $EF1\alpha$ ) ..... 39

Figura 13. A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo ( $EIF\alpha$ ) y  $Pto-R1$  en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1-Control (C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 13A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento. B) Gráfico de barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo ( $EF1\alpha$ )..... 41

Figura 14. Genes no expresados, los geles de agarosa muestran que no hubo amplificación por RT-PCR de los genes  $PPO$  y  $PAL$  en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1- Control (C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo. Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento..... 42

Figura 15. Gráfica comparativa que resume el comportamiento de expresión de los genes de interés por tratamiento en los 3 experimentos independientes..... 43

## I RESUMEN

Existen distintas plagas y enfermedades que atacan al cultivo de tomate, bajando así el rendimiento y calidad del fruto, para combatir estas enfermedades, se aplican distintas técnicas de control, desde manejo preventivo hasta aplicación de productos químicos u orgánicos, estos al no ser aplicados correctamente se puede inhibir el poder del agente activo o bien los patógenos atacantes se hacen resistentes a las dosis aplicadas, y la aplicación en exceso, causa gran daño al medio ambiente. La nanotecnología permite desarrollar nanoencapsulados de lenta liberación de agroquímicos para combatir patógenos con mayor eficiencia y control. Por lo que, en el presente estudio se utilizaron nanopartículas poliméricas cargadas con ácido acetil salicílico (1 mM; NAAS), infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, después de 15 días de la infección se analizó la respuesta de las plantas de tomate a las NAAS en comparación con la aplicación de ácido salicílico (AS), evaluando sintomatología y expresión de genes de defensa. La aplicación de NAAS, disminuyó el crecimiento de la bacteria en el tejido en 25 % (587.11 UFC/g) presentando la disminución de síntomas en comparación al control (778.57 UFC/g). Mientras que el tratamiento de AS disminuyó la presencia de *P. syringae* en el tejido (536.43 UFC/g) con síntomas menores que NAAS y el control. Los resultados de expresión génica indican una represión de los genes dependientes de ácido jasmónico (aleno oxidociclase AOC y polifenol oxidase precursora de cloroplasto, PPO) y de etileno (aminociclopropano-carboxilato oxidase, ACCO). En contraste, se incrementó la expresión de los genes activados por ácido salicílico (proteína relacionada con la patogénesis PR-1 y PtoR1, la proteína que responde al gen bacteriano *avrPto*) en los tratamientos con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Sin embargo, la respuesta en tomate con los tratamientos AS y las NAAS fue similar hacia el patógeno bacteriano. En conclusión, las plantas tratadas con NAAS tuvieron un efecto similar de expresión génica al tratamiento de AS.

**Palabras claves:** Resistencia, ácido salicílico, DC3000, expresión génica.

## II INTRODUCCIÓN.

El cultivo de tomate es de gran importancia para los productores mexicanos, ya que solo en 2020 hubo 44,519 ha de superficie sembrada en riego y temporal a nivel nacional (SIAP 2021), a través del tiempo este cultivo ha mejorado tanto en sabor, color y tamaño principalmente, ya que existen muchas variedades comerciales las cuales se producen en gran cantidad primeramente en condiciones de invernadero, pero como todas las plantas, existen distintas plagas y enfermedades que atacan este cultivo, bajando así el rendimiento y calidad del fruto (Monge *et al.*, 2019).

Unas de las principales enfermedades son: Pudrición gris que es causada por el hongo *Botrytis cinerea*; Cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis*; Tizón temprano que lo causa *Alternaria solani*; Mancha negra o peca bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; y marchitez vascular por *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*, para combatir estas enfermedades, se aplican distintas técnicas de control, desde manejo preventivo hasta aplicación de productos químicos u orgánicos (Millas *et al.*, 2019). Estos productos al no ser aplicados de manera correcta se puede inhibir el poder del agente activo o bien los patógenos se hacen resistentes a las dosis aplicadas, y la aplicación en exceso de los mismos, causa gran daño al medio ambiente, contaminando, suelo y agua subterránea (Arun, 2020). Hoy en día la biotecnología y nanotecnología aplicada en plantas se ha podido combatir patógenos con mayor eficiencia y control ya que se han aplicado agroquímicos de a escala utilizando nanopartículas en su mayoría, en este caso, se usó una nanopartícula polimérica cargada con ácido acetil salicílico, de la cual se espera que active la respuesta inmune en donde se verá la actuación contra la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 a través de diferencias en la sintomatología y en la expresión de genes de resistencia en plantas de tomate. En cuanto a la información generada por este estudio servirá como inicio de una investigación más a fondo de estas nanopartículas, y hasta donde pueden beneficiar al cultivo de tomate en sí y probarlas contra otros patógenos.

### III JUSTIFICACIÓN

Los problemas fitosanitarios en cultivos han propiciado que se incremente el uso de agroquímicos, los excesos de sus aplicaciones han dañado al medio ambiente y en algunos casos, generando resistencia en insectos o patógenos. Para el caso de patógenos bacterianos, el enfoque tradicional es el empleo de antibióticos con diferentes modos de acción tanto para Gram negativas como Gram positivas. Las limitantes en el uso de antibióticos es la persistencia en la planta y la resistencia que generan en el patógeno bacteriano. Sin embargo, otras alternativas para abordar los problemas de fitopatógenos es el uso de moléculas inductoras o elicitoras para la activación de las defensas en plantas, aunque de modo preventivo. Estas moléculas inductoras también tienen poco tiempo de acción en la planta, ya que la función principal es iniciar la respuesta defensiva en ausencia del patógeno. Por tal motivo, en este estudio se aplicaron nanopartículas cargadas con ácido acetil salicílico en plantas de tomate, para fomentar la activación del sistema defensivo de la planta y a su vez con la expresión de distintos genes de resistencia dependientes de AS y su respuesta contra el patógeno bacteriano *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 como modelo de estudio.,

### IV ANTECEDENTES

#### IV.1 Cultivo de tomate en México

El tomate es uno de los cultivos que son de más utilidad en México por gran variedad de usos culinarios, además es de gran valor social y económico, ya que México es uno de los principales exportadores hacia EUA y se estima que para este año habrá 1,665,259 toneladas para exportación, siendo San Luis Potosí, Zacatecas y Michoacán los principales productores (SIAP, 2021), para lograr los grandes rendimientos se han adaptado nuevas tecnologías, desde ambientes controlados, fuente de nutrición y agua de calidad hasta semillas modificadas (Saavedra 2017).

Este cultivo es susceptible a distintos daños causados por patógenos, de ahí la producción en invernaderos para el mejor y mayor control del cultivo, en donde son aplicados fertilizantes que pueden ser químicos u orgánicos, también soluciones químicas para el combate de enfermedades que pueden ser causadas, por hongos y/o bacterias (De la Cruz-Lazaro *et al.*, 2009).

#### IV.2 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 es un fitopatógeno importante en la agricultura porque es un organismo que causa pérdidas en el cultivo de tomate principalmente por la enfermedad de ‘mancha o peca’ bacteriana, que causa manchas acuosas de color marrón y negro rodeadas de un halo amarillo en hojas y tallos, y en fruto pequeñas manchas negras menores a 0.2 cm con bordes definidos (Bernal R, 2010).

También es importante a nivel de estudios moleculares de interacciones planta-patógeno, esta bacteria se desarrolla en la superficie de las hojas (Montero, 2019), la cual se incorpora a través de heridas o estomas foliares y luego se multiplica en el apoplasto, provoca clorosis y lesiones necróticas que se rodean por halos cloróticos o muerte celular programada en interacciones incompatibles, la movilidad bacteriana facilita la interacción patógeno-huésped y promueve la colonización, penetración e invasión de los tejidos del huésped (Farias, *et al.*, 2019). Fue *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 el primer genoma secuenciado de *P. syringae*, a partir de la proteína de respuesta al gen *avrPto* de *P. syringae* pv. *tomato* (Pto-R1) capaz de infectar tomate causando la enfermedad de mancha bacteriana (Montero, 2019).

Las células individuales dentro de las poblaciones de *P. syringae* existen dentro de diversas comunidades microbianas en una gran cantidad de hojas, en casi todas las especies de plantas terrestres que crecen en condiciones climáticas diferentes, en cualquier momento dado, en cualquier hoja, el tamaño de la población de *P. syringae* es de cuatro etapas de población: crecimiento, muerte, inmigración y emigración, estas condiciones deben persistir en la amplia gama de genotipos de esta especie. Por lo tanto, debe haber genotipos de *P. syringae* para los cuales el crecimiento y la inmigración igualan o superan muerte y emigración en cualquiera de estas plantas en todos los climas (Hirano y Upper, 1990).

Este patógeno bacteriano se subdivide en patovares basados en patogenicidad y el rango de hospederos, es capaz de provocar distintos síntomas dependiendo del huésped y el sitio de infección. En tomate, frijol y soya ocasiona manchas foliares que defolian las plantas, en nogal y especies ornamentales ocasiona canchales y es raro que las cepas de esta bacteria excedan  $10^5$  células por gramo (Feil *et al.*, 2005).

La patogenicidad de DC3000 se asemeja a muchos patógenos fúngicos y bacterianos importantes de las plantas donde la especificidad del huésped está controlada por la



interacción “gen por gen” en donde un alelo dominante en el huésped y uno en el patógeno resulta la interacción planta-patógeno, la interacción que codifica 35 genes según el sistema de secreción TTSS por sus siglas en inglés (Buell *et al.*, 2003). DC3000 tiene un gran repertorio de factores de virulencia, que incluye proteínas efectoras que se secretan a través del sistema de secreción tipo III y la coronatina, una fitotoxina policétida, la cual mimetiza la función de la hormona vegetal del jasmonato (Xiu-Fang Xin *et al.*, 2013).

#### **IV.3 Tratamiento para enfermedades bacterianas**

En agricultura convencional las enfermedades bacterianas de las plantas se tratan con productos compuestos de metales pesados o antibióticos, para una agricultura sustentable entra el uso de antagonistas bacterianos, agentes biológicos, inductores de respuesta de defensa de las plantas o genotipos de plantas resistentes (Perez *et al.*, 2019).

También el uso de extractos vegetales es utilizados en la agricultura para el combate contra bacterias por ejemplo extractos de hojas de cardo (*Cynara cardunculus*), las cuales pudieron inhibir eficazmente el crecimiento de especies Gram negativas y Gram positivas (Scavo *etal.*, 2019). De igual manera el uso de inoculantes microbianos, los cuales están compuestos de microorganismos vivos que son capaces de beneficiar el desarrollo y control de enfermedades en diferentes especies vegetales (Santos *et al.*, 2019).

Los programas de control contra enfermedades bacterianas de la planta de tomate se basan en la profilaxis mediante análisis de diagnóstico realizados en semillas, para detectar presencia de patógenos, también se ha investigado la eficiencia y el mecanismo de acción de las moléculas inductoras de resistencia, que actúan contra los patógenos a través de respuestas mediadas por el huésped. Entre los inductores de resistencia conocidos los que resultaron más eficaces contra las enfermedades bacterianas, al fortalecer las barreras físicas, las defensas pre-infección y mediante la producción de compuestos activos contra patógeno son los que están basados en el principio activo acibenzolar-S-metil, que es un derivado del benzotiadiazol, que imita el papel del ácido salicílico como activador vegetal natural de la resistencia sistémica adquirida y en la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (Perez *et al.*, 2019).

#### **IV.4 Respuestas defensivas en plantas.**

En general, existen distintos mecanismos que están involucrados en la defensa frente a patógenos, los cuales son defensa pasiva o activa (Laredo Alcalá *et al.*, 2017). La respuesta

de defensa pasiva destaca las ceras, cutícula y paredes celulares, estos están formados por los sistemas físicos de la planta que se encuentran en forma natural, sin ningún tipo de esfuerzo para producirlas, en este caso las barreras bioquímicas se encuentran de igual manera de forma natural liberándose al medio con el fin de alejar o no permitir la reproducción de patógenos (Laredo Alcalá *et al.*, 2017).

La respuesta de defensa activa o inducida se activa solo al ataque de un patógeno, la cual involucra cambios en el metabolismo provocados por la expresión de genes, la defensa bioquímica se activa por mecanismos que dependen de distintos factores de entre los cuales los más importantes son la susceptibilidad de la planta, las condiciones del medio ambiente y el tipo de patógeno, en este mecanismo se encuentra la reacción hipersensible, producción de fitoalexinas, síntesis de proteínas PR (relacionadas a patogénesis) y el aumento de la concentración de compuestos fenólicos (Laredo Alcalá *et al.*, 2017).

#### **IV.5 Inductores de resistencia.**

La inducción se basa en transformar la interacción compatible en una incompatible, es decir, que la planta sea resistente a enfermarse, los inductores que impiden o retrasan la penetración del patógeno, limitando también la actividad en el órgano o tejido afectado. Existen varios mecanismos de resistencia de los cuales destacan la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la resistencia sistémica inducida (RSI), la primera se activa localmente después de la infección de por patógenos que producen necrosis, se caracteriza por ser de amplio espectro, pues no solo actúa contra el patógeno que la activo, sino también a otros patógenos, es duradera pues permanece activa días, incluso semanas, la vía de señalización pueden depender del ácido salicílico asociado con la acumulación de proteínas que se relacionan con la patogénesis. Mientras que la RSI es activada por microorganismos benéficos del suelo y que son capaces de colonizar las raíces de las plantas, también es de amplio espectro, pues protege contra bacterias, hongos y algunos virus, la vía de señalización es una cascada generada por un agente biótico y solo sigue la vía del ácido jasmónico y del etileno (Laredo Alcalá *et al.*, 2017).

Este estudio, se enfoca al efecto que causan las nanopartículas cargadas con ácido acetil salicílico en plantas de tomate, la cual es conocida normalmente como un análogo a la fitohormona AS que regula el crecimiento de la planta y éste actúa como molécula señal de respuesta a situaciones de estrés o daño por insectos (Laredo Alcalá *et al.*, 2017).

#### **IV.6 Señalización en plantas contra patógenos.**

El éxito para reconocer al patógeno en las plantas hospederas depende de la capacidad con la que detectan la agresión, sea este un patrón molecular asociado al patógeno (PAMP, por sus siglas en inglés), por ejemplo: la flagelina, quitina, factor de elongación de tubulina, lipopolisacáridos, etc. (Maffei *et al.*, 2007). Posterior a la detección, en la célula se activan otras señales como incrementos citosólicos del ión calcio, el cual es reconocido por proteínas de unión de Ca y dan lugar a una cascada de señalización que incluye la fosforilación de proteínas alteradas y patrones de expresión génica promovidos por la interacción planta-patógeno (Maffei *et al.*, 2007). Las quinasas están involucradas en la transducción de señal temprana, con una cascada de proteínas quinasa activada por mitógeno (MAPK), son vías importantes de sensores y receptores que regulan las respuestas celulares externas como endógenos en eucariotas (Maffei *et al.*, 2007). El cultivo de tomate ha sido tomado como un sistema modelo para estos estudios de interacción planta-patógeno, ya que en este cultivo los ensayos son más rápidos y se tiene extensa información para los genes de defensa y su expresión inducida (Maffei *et al.*, 2007).

#### **IV.7 Resistencia inducida en plantas.**

Las plantas interactúan con muchas plagas durante toda su vida, las cuales tienen distintas formas de vida y distintos modos de ataque, por ello poseen una respuesta inmune primaria que ha evolucionado para el reconocimiento de individuos que se relacionan con la planta, este reconocimiento activa las respuestas de defensa que pueden ser dirigidas específicamente contra el organismo invasor (Peteira *et al.*, 2020).

Se le llama resistencia inducida en forma general ya que no entra en un tipo específico de expresión o regulación de las defensas en las plantas, para que se cumpla esta inducción la función central es el reconocimiento planta-patógeno por esto las plantas, con el fin de aumentar su intensidad y rapidez de respuesta defensiva contra patógeno, desarrollaron reacciones que se activan sistémicamente después de la infección local (Peteira *et al.*, 2020).

El AS y el ácido jasmónico (AJ) son moléculas señal que tienen una función de gran importancia, ya que son vitales para la producción de la resistencia inducida y de igual manera para la correlación antagónica de las vías de RSI por AJ con la RSA que depende del AS, aunque estas son vitales para la planta involucran un gasto de energía, por tal motivo se mantienen constante si no que consiguen ser iniciadas o estar propensas a un

pequeño ajuste, una activación veloz y una acumulación por tiempo y espacio serían la respuesta efectiva contra patógenos (Peteira *et al.*, 2020).

### **Tipos de resistencia inducida. Resistencia**

#### **sistémica adquirida (RSA).**

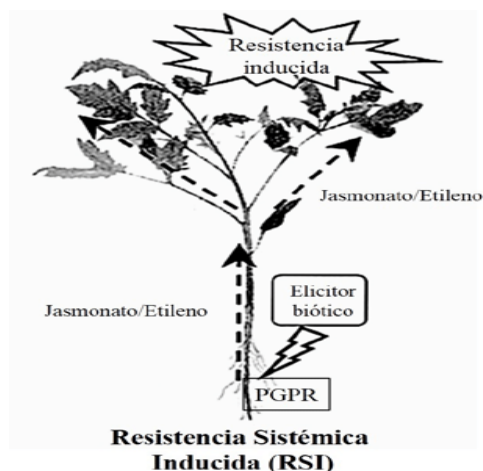
Esta inicia cuando hay lesión en la planta ocasionada por el patógeno, esta causa desintegración celular, se desata por una molécula inductora o la agresión *per se* del patógeno, es inespecífica y de amplio espectro. Una de las primeras manifestaciones en la planta es la respuesta hipersensible (RH), que causa lesiones necróticas por muerte celular, a nivel celular se puede ver ausencia permeable de la membrana, pérdida de electrolitos, la creación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), la pared celular se engrosa y hay acumulación de fitoalexinas. En los tejidos que no han sido dañados, las primeras reacciones son la activación rápida de genes relacionados a la patogénesis que inician con la síntesis de proteínas PR (Peteira Delgado-Oramas, 2020).



**Figura 1.** Resistencia Sistémica Adquirida (RSA), fuente: (Tarqui *et al.*, 2017).

#### **Resistencia sistémica inducida (RSI).**

Este tipo de resistencia la inducen las rizobacterias, en las cuales incluye las *Pseudomonas*, *Bacillus*, entre otros géneros, que pueden incitar defensa local para después desplazarla a distintas secciones de la planta teniendo así la inducción de resistencia sistémica, la RSI es mediada por señalización de jasmonatos y etileno a diferencia de RSA esta no tiene manifestación de hipersensibilidad ni lesiones necróticas (Peteira Delgado-Oramas, 2020).



**Figura 2.** Resistencia Sistémica Inducida (RSI), fuente: (Tarqui *et al*, 2017).

Inicialmente, la RSA y RSI se consideraban sinónimos ya que las dos inician con incitar la defensa local, para después crear la manifestación desde la parte infectada, posteriormente se traslada a otra sección de la planta, aumentando las respuestas de defensa, estas vías tienen el mismo final la inducción de resistencia a plantas, aunque tienen diferentes genes, vías y las señales químicas (Peteira Delgado-Oramas, 2020).

El AS y el AJ son claves para la señalización de la expresión inducida de defensas en las plantas. La respuesta de daños que pueden ser ocasionadas por herbívoros y compuestos orgánicos volátiles, efectos de rizobacterias, resistencia frente a patógenos necrótrofos, estrés abiótico y las interacciones planta-planta, son mediados por AJ, y el AS actúa de manera antagonista de la vía del AJ e induce a la defensa contra patógenos biotróficos, esto aumenta la expresión de proteínas que se relacionan con la patogénesis (Stella y Angarita, 2001).

#### **IV.8 Priming.**

El “priming” es un mecanismo que activa el sistema defensivo de las plantas y consiste en el uso de compuestos/metabolitos que proceden como precursores de diferentes fitohormonas (Artal, 2019).

Existen distintos tipos de priming:

1. En las interacciones beneficiosas planta-microorganismo. Esta interacción es frecuente en la naturaleza y en la planta, con ella se mejora la nutrición y ayuda a superar el estrés

biótico y abiótico en las plantas, en muchos casos estas asociaciones aumentan la prevención de los daños causados por un gran número de patógenos.

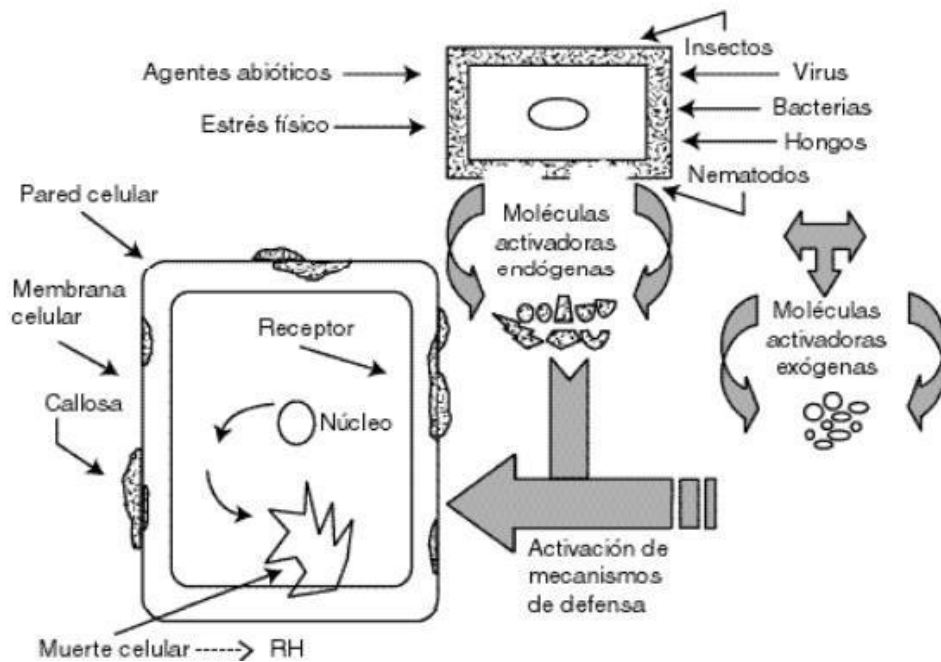
2. Por productos químicos como respuesta al estrés biótico. Hay gran cantidad de elicitores químicos que pueden inducir resistencia en plantas causado por algún tipo de estrés.
3. Cambios en el metabolismo principal. En el cultivo transgénico de papa se mostró una producción voluntaria de peróxido de hidrogeno y una disminución del transportador de ATP/ADP *StAATPI*, también los niveles endógenos de AS y los genes relacionados con las respuestas defensivas, fueron iguales en plantas silvestres.
4. Para aumentar la resistencia frente a factores abióticos. Existen distintos mecanismos que se relacionan con genes que responden al estrés ya sea causado por frío, sequia o salinidad, se dice que el AS y AJ modula la planta a estos tipos de estrés.
5. Priming en las interacciones planta-insecto. Durante el ataque de insectos herbívoros las plantas liberan mezclas complejas de compuestos químicos volátiles que son resultado de distintas rutas metabólicas, que incluye derivados de la vía octadecanoide que son volátiles de hoja verde, terpenoides y compuestos aromáticos.

También se pueden clasificar por sus características que son:

**Endoelicitores:** son producidos de manera natural en el interior de la planta tras localizar algún daño para generar defensas.

**Exoelicitores:** se suministran de manera externa para prevenir un ataque, induciendo las defensas de la planta.

De forma natural; **Bióticos:** moléculas que inducen respuesta defensiva en el tejido vegetal son de origen patógeno. **Abióticos:** estos son generados por condiciones ambientales como frío, metales pesados, luz UV, detergentes, etc. Además, también se encuentran, el AS, AJ, entre otros (Peteira Delgado-Oramas, 2020).



**Figura 3.** Activación de mecanismos de defensa por distintos endo y exoelicitores, así como por moléculas activadoras. Fuente (Riveros, 2001).

#### IV.9 Nanomateriales en la agricultura.

La nanotecnología hoy en día es conocida como un campo muy prometedor con diversas aplicaciones en las comunidades científicas e industriales para fabricar materiales novedosos a nanoescala. Aunque el uso de nanomateriales en la agricultura aún se encuentra en una fase muy joven, pero su aplicación está en constante estudio, gracias al pequeño tamaño de las nanopartículas (1-100 nm en al menos una dimensión) tienen muchas propiedades fisicoquímicas diversas y una mayor reactividad, solubilidad y actividad bioquímica (Ioannou *et al.*, 2020).

Por otra parte, la producción de hortalizas puede enfrentar fenómenos abióticos como: sequías, bajas precipitaciones, altas y bajas temperaturas, fuertes corrientes de viento y excesiva radiación solar que también afectan a su producción y rendimiento (Benavides Sadaka, 2015). Actualmente, en la industria agrícola ya se utilizan distintos nanomateriales como nanotubos con diversos agentes activos como carbono, grafeno, plata, hierro, silicio, zinc, entre otros, que mejoran la protección y nutrición de la planta, consecuente al tamaño, dosificación precisa liberación lenta y otras características de las nanopartículas (Ioannou *et al.*, 2020).

La aportación de productos obtenidos gracias a la aplicación de la nanotecnología en la agricultura permite alcanzar altos rendimientos y calidad en los cultivos, en lo que destaca aplicaciones para el combate de plagas y enfermedades (Sánchez, 2008). Uno de los nuevos productos es el uso de nanomateriales que pueden ser nanopartículas o nanoencapsulados, estos se pueden ser reutilizados como sistemas de transporte de sistemas bioactivos como pesticidas y fertilizantes, las características de estos es que proporcionan más eficiencia ya que pueden extender su duración de acción, una liberación moderada de agentes bioactivos, y mayor eficiencia ya que se dirigen a organismos específicos (Oliveira *et al.*, 2015).

El uso de nanomateriales para el control de plagas es un método muy eficiente, ya que se aplica también en la transferencia de genes y la diseminación de sustancias químicas en tejidos vegetales para la protección contra insectos (Rai *et al.*, 2012). Acorde a investigaciones de Kim *et al.*, (2009), se inhibió el crecimiento de hongos en presencia de nanopartículas de plata, dando pauta al uso de nuevos nanomateriales para el combate de enfermedades fúngicas.

Las nanopartículas actúan de manera positiva contra distintos patógenos, por ejemplo: nanopartículas de ZnO son eficaces como fungicidas y también para el control del crecimiento de bacterias patógenas (Navale *et al.*, 2015); nanopartículas de plata, cobre y zinc tienen alto potencial como nanofungicidas ya que son eficaces tanto el crecimiento micelar como contra la germinación de esporas y suprimir los síntomas de *B. cinerea in vivo* (Anastasios *et al.*, 2019), nanopartículas de plata para el control de la proliferación de cepas bacterianas fitopatógenas (Javed *et al.*, 2020). Recientemente, el uso de un nanobactericida redujo la carga bacteriana un 98% para el patógeno bacteriano *Candidatus Liberibacter solanacearum* en plantas de tomate (García-Sánchez *et al.*, 2021).

#### **IV.10 Ácido salicílico (AS).**

El AS es una molécula señal que se sintetiza de plantas estimuladas y es capaz de dar inicio a una reprogramación transcripcional para ayudar a obtener el mecanismo de resistencia sistémica adquirida (SAR) en las plantas (Chong *et al.*, 2020). Las hormonas vegetales tienen un lugar importante en la señalización de inmunidad del AS, es la fitohormona clásica de resistencia a enfermedades, por lo tanto, desempeña un papel importante en la lucha contra los patógenos biotróficos (Wu *et al.*, 2019).



El ácido salicílico pertenece a un grupo diverso de fenoles vegetales definido como sustancias que poseen un anillo aromático que llevan un grupo hidroxilo. Los fenoles desempeñan un rol importante en la regulación de crecimiento, interacción y desarrollo de plantas con otros organismos, así mismo los fenoles más notables son las fitoalexinas, las cuales se han asociado con la respuesta de defensa de las plantas contra microorganismos, herbívoros e insectos (Raskin, 1992). El rol mejor establecido en la agricultura para el ASes como molécula señal en las respuestas de defensa de las plantas. La aplicación de AS exógeno activa la expresión de genes relacionados con la patogénesis de las plantas e induce la resistencia a enfermedades, participa en la regulación de las respuestas de las plantas a una variedad de estrés abióticos, como temperaturas altas y bajas, sales y condiciones oxidativas (Chen *et al.*, 2009). Se ha confirmado la existencia del ácido salicílico en plantas desde hace mucho tiempo, en donde los niveles más altos de AS se registraron en las inflorescencias de plantas y en plantas infectadas con patógenos necrotizantes (Raskin, 1992). Además de ser conocido comúnmente como una fitohormona, este desempeña un papel importante a nivel fisiológico de la planta en donde incluye el crecimiento de la misma, termogénesis, absorción de nutrientes, termogénesis, biosíntesis de etileno, fotosíntesis y movimiento estomático (Hayat *et al.*, 2008).

#### **IV.10.1 Ácido salicílico como inductor de resistencia frente a patógenos.**

Algunas plantas resistentes a enfermedades pueden desarrollar una pequeña área visible alrededor de un punto de penetración inicial por la infección de bacterias, hongos y virus patógenos, a esta reacción de la muerte de la célula protectora se le conoce como reacción de hipersensibilidad (Raskin, 1992). Informes recientes muestran que el AS juega un papel importante en la regulación de la resistencia a enfermedades, termogénesis, daño y/o reparación en el ADN, tolerancia al estrés abiótico, en el rendimiento de frutos y la germinación de semillas (Koo *et al.*, 2020). La aplicación exógena de AS induce la resistencia local y resistencia sistémica adquirida en tomate, papa y arroz contra varios tipos de patógenos en los que incluye *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Magnaporthe grisea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Xanthomonas* spp. y distintos tipos de virus. El AS aplicado de manera exógena en una concentración de 1 mM suprimió casi por completo el desarrollo de la enfermedad del mildiu polvoroso en plantas de pepino, también indujo mayor resistencia en plantas de tomate contra *B. cinerea* (Koo *et al.*, 2020). En plantas de tomate el AS actuó como inductor de resistencia contra la infección por el virus rizado de

la hoja amarilla del tomate (Li *et al.*, 2019) y actúa como defensa contra el viroide de la exocortis de los cítricos en plantas de tomate transgénicas (Montero, 2019). En plantas de plátano se demostró que el AS y AJ son inductores de resistencia contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y de igual manera evitando la resistencia a los agroquímicos y la contaminación ambiental (Montero, 2019).

El AS aplicado directamente a los tejidos inoculados produce proteínas PR y alguna otra forma de resistencia a patógenos al expresar estos genes de resistencia (PR), incluso también cuando se aplica en suelo redujo las lesiones del virus de la necrosis del tabaco (Raskin, 1992). Acorde a Chen *et al.*, (2009), el bloqueo de la síntesis de AS a través de la expresión de un gen de salicilato hidroxilasa bacteriana en plantas transgénicas de tabaco *NahG*, compromete la respuesta hipersensible inducida por virus mosaico del tabaco y anula la resistencia sistémica adquirida.

#### **IV.10.2 Biosíntesis del ácido salicílico**

La mayor parte (> 90%) de AS se sintetiza a partir del isocorismato. Sin embargo, se ha establecido que el papel de las isocorismato sintasas de plantas en la producción de AS, nose han identificado las enzimas vegetales que convierten el isocorismato en AS. Por lo tanto, aún no está completamente definido cómo se sintetiza AS en plantas (Chen *et al.*, 2009).

Estudios bioquímicos que han utilizado la experimentación con isotopos han sugerido que las plantas sintetizan el AS a partir de cinamato, que es producido por la ruta fenilpropanoide que lo induce bajo las condiciones de estrés biótico y abiótico, el AS se puede formar a partir de cinamato a través de *o*-cumarato o benzoato dependiendo de la hidroxilación del anillo aromático (Chen *et al.*, 2009). Estudios recientes en donde se ha aislado un mutante de *susceptibilidad incrementada a pseudomonas (epsI)* en Arabidopsis. Los mutantes *epsI* están comprometidos en la resistencia a cepas virulentas y avirulentas de *P. syringae* y en la expresión del gen PR inducida por patógenos. Además, la acumulación de AS total se redujo en gran medida en los mutantes *epsI* tras la infección de *P. syringae*. AS restauró la resistencia a *P. syringae* e indujo la expresión de PR1 en los mutantes *epsI-1*. Estos fenotipos de los mutantes *epsI* son sorprendentemente similares a los de *pbs3* (también conocido como *gdg1* o *wim3*) mutantes. Estos resultados sugieren que PBS3 y EPS1 funcionan río arriba de AS en las respuestas de defensa de las plantas (Chen *et al.*, 2009).

La importancia demostrada con experimentos que utilizan plantas mutantes para la acumulación de AS a partir de las vías de fenilalanina amonio liasa e isocorismato sintasa, recientemente se han identificado que los PBS3 y EPS1 son de gran importancia para la producción de AS inducida por patógenos y pueden codificar para enzimas que catalizan reacciones relacionadas y secuenciadas con la síntesis de una molécula precursora o reguladora para la biosíntesis de AS (Chen *et al.*, 2009). Las plantas al entrar en contacto con algún patógeno estas, biosintetizan AS, AJ y etileno, y activan distintas rutas para la defensa contra ellos. En la Figura 4 se muestra que al usar AS y AJ simultáneos hay una acción de bloqueo que inhibe ciertas reacciones de defensa (Stella *et al.*, 2001), de tal manera que esto puede interferir en la expresión de genes dependientes del AS y AJ.

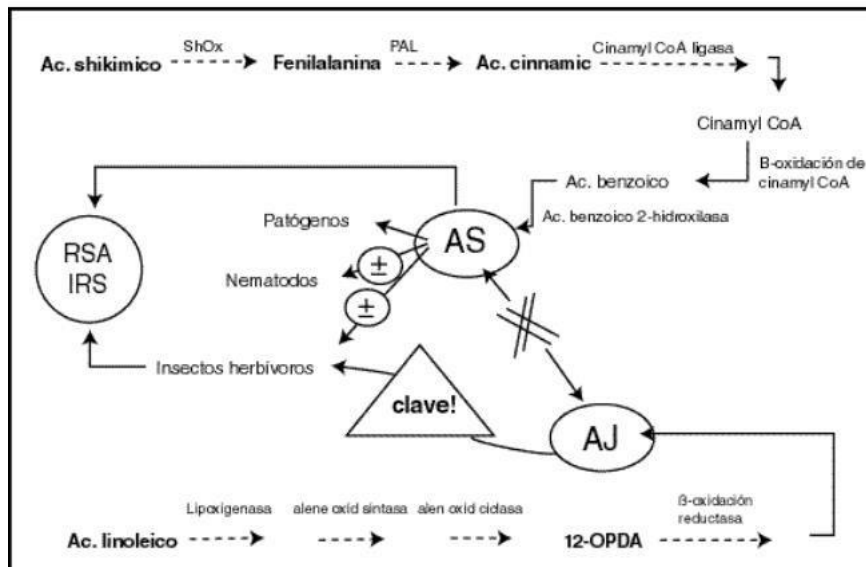


Figura 4. Rutas de activación del AS y AJ. Fuente (Riveros, 2001).

#### IV. 11 Ácido acetil salicílico (AAS) en plantas.

El ácido acetil salicílico o aspirina es comúnmente utilizado en el campo de la medicina, pero se ha demostrado que tiene efectos positivos al ser aplicado en plantas, la aplicación exógena de AAS aumenta la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estrés (Hussain *et al.*, 2020), y también actúa contra patógenos, en plantas de melón, redujo la gravedad de la pudrición por *Fusarium* y mejoró las expresiones génicas que se involucran en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Xue *et al.*, 2020), en plantas de tomate tuvo actividad nematicida (Raddy *et al.*, 2020).

También el proceso de germinación se ve influenciado por la aplicación exógena de ASSel cual es un compuesto fenólico que tiene acción reguladora para algunos procesos fisiológicos de la planta en los que incluye la inhibición de la germinación de semillas, fotosíntesis, metabolismo de nitratos, producción de etileno, como un potente agente antioxidante enzimático relacionado con la activación de respuestas de defensa de la planta en condiciones de estrés, producción de calor y floración. De esta manera influye de forma positiva al ser aplicado de manera exógena en las semillas, ya que al ser tratadas anteriormente aumenta la tasa de germinación y reduce el estrés hídrico en las plántulas (Benth *et al.*, 2019).

#### **IV.12 Análisis de expresión génica.**

La expresión de genes es el proceso en el cual un gen se activa en una célula para producir ARN mensajero y proteínas bajo ciertos estímulos externos (Beltrán Piña *et al.*, 2019).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es un método muy sensible y específico útil para la detección de transcripciones raras o para el análisis de muestras disponible en cantidades limitadas. En la mayoría de los casos, y cuando el ARN requiere un análisis, un estudio cualitativo no es suficiente para dar una respuesta satisfactoria. Una pregunta común es la cuantificación de transcripciones de ARN específicas y la detección de cualquier variación en sus niveles de expresión bajo diferentes condiciones experimentales (Marone *et al.*, 2001).

Aunque la reproducibilidad es siempre un elemento esencial, la precisión puede no ser extrema: en la mayoría de los estudios el enfoque no es medir cambios menores o el número exacto de moléculas, pero un aumento o disminución de al menos 1,2 veces en niveles de expresión. Por lo tanto, a pesar de la mayor precisión de técnicas desarrolladas recientemente, los métodos semicuantitativos son todavía ampliamente utilizados y apropiados para muchos propósitos (Marone *et al.*, 2001).

##### **IV.12.1 Genes marcadores activados por ácido salicílico.**

###### **Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).**

Estas se clasifican en 17 familias, y se acumulan después de la infección por patógenos, entre la familia de estos genes, los PR1 se han utilizado como genes marcadores de

resistencia sistémica adquirida en muchas especies de plantas (Mitsuhara *et al.*, 2008), además de ser junto con el gen PR5 candidatos para la activación del sistema inmune de las plantas (Beatrice *et al.*, 2017). En un reporte demostraron la expresión de los genes relacionados con la defensa inducidos por AS como son: PR1, PR5, ICS1 y PDF1, al aplicarse melatonina mejoró la producción de AS y óxido nítrico en plantas infectadas con el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Zhao *et al.*, 2019).

#### **Proteína de respuesta al gen *avrPto* de *P. syringae* pv. *tomato* (Pto-R1).**

Esta proteína está reportada como modelo de estudio de la interacción planta-patógeno ya que su capacidad para infectar *Arabidopsis thaliana* ya ha sido descrita (Montero, 2019). Este gen (Pto), codifica la proteína quinasa de serina/treonina que confiere resistencia en tomate contra cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, la sobreexpresión de este gen activa la defensa y brinda resistencia contra distintos patógenos bacterianos y fúngicos (Mysore *et al.*, 2003).

#### **Fenilalanina amonio liasa (PAL).**

La fenilalanina amonio liasa es una enzima que genera fitoalexinas antimicrobianas que son de gran importancia en la respuesta de ataque contra patógenos (Wang *et al.*, 2020), también participa en la biosíntesis de la molécula señal de defensa del AS (Zhang *et al.*, 2019). Su presencia en plantas superiores, hongos y algunas bacterias ya ha sido estudiada y describen que su actividad está regulada por AS, etileno, jasmonatos, el ataque por patógenos, la exposición a metales pesados, la radiación ultravioleta, bajas temperaturas y la escasez de nutrientes (Joaquín, 2020). Esta enzima es la única que convierte la fenilalanina en ácido transcinámico que se ha identificado en muchas especies de plantas, por lo cual hay dominancia en la ruta de PAL para la producción de AS, los genes PAL se encuentran en varias copias en genomas y se expresan diferencialmente entre tejidos vegetales (Lefevre *et al.*, 2020).

#### **IV.12.2 Genes activados por ácido jasmónico.**

##### **Aleno Oxido Ciclasa (AOC).**

Es una enzima precursora para la biosíntesis de AJ localizada en los cloroplastos (Wasternack y Song, 2017). Este gen se ha reportado que se activa en plantas por estrés

biótico, como, por ejemplo: herbivoría por lepidópteros y ataque por patógenos necrótrofos. Además, otros reportes indican que en plantas con estrés abiótico activan este gen, siendo estimulado por: metales pesados, daño mecánico, sequía, baja temperatura, AS, ET y ácido giberélico (Sun *et al.*, 2020).

**Enzima polifenol oxidasa (PPO).**

Esta enzima se localiza en los plástidos, incrementa su expresión cuando hay distintos tipos de estrés ya sean bióticos como abióticos. En interacción con compuestos fenólicos produce la polimerización de los mismos y que conduce a una reacción necrótica en los tejidos vegetales ocasionando una barrera que impide el desarrollo de los patógenos y/o herbívoros, esta polimerización es capaz de reducir el estatus nutricional del tejido e inhibe la digestión de los herbívoros causando una toxicidad directa sobre insectos (Joaquín, 2020).

## V HIPÓTESIS.

La aplicación foliar de nanopartículas de ácido acetilsalicílico reducirá los síntomas de manera preventiva contra la enfermedad causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plantas de tomate.

## VI OBJETIVO GENERAL

Conocer la respuesta defensiva ante *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promovida por el uso de nanopartículas de ácido acetilsalicílico en plantas de tomate.

## VII OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Conocer posibles diferencias en síntomas causados por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 y la aplicación de nanopartículas poliméricas en plantas de tomate por medio de ensayos de patogenicidad.
- ❖ Conocer la respuesta de defensa en plantas de tomate por la activación en la expresión de los genes de defensa contra el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 al aplicar las nanopartículas de ácido acetilsalicílico.

## VIII MATERIALES Y MÉTODOS.

Para el desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), para la producción de plántulas de tomate y para la elaboración de bioensayos se utilizó el laboratorio de Agrobiotecnología del Departamento de biociencias y agrotecnología.

### VIII.1 Material biológico.

Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Floradade que se creció en la cámara climática Equitec a 25 °C con un fotoperiodo 16 h luz 8 h oscuridad. Estas se germinaron en charolas que tuvieron como sustrato 70:30, peatmoss:perlita, se colocó una semilla por orificio y el riego se aplicó diariamente, a partir de las 2 hojas verdaderas se fertilizaron con una solución Hoagland (Anexo 1), 300 ml por planta, una vez a la semana. Después de 3 semanas de germinación las plántulas se trasplantaron a macetas de ½ Kg con la misma relación de sustrato.

### VIII.2 Preparación de inóculo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

A partir de células crecidas en medio sólido se tomaron 3 colonias grandes para tener una cantidad deseable y se resuspendieron un matraz de vidrio con 30 ml de medio LB estéril, se incubaron en agitación a 110 rpm a una temperatura de 28°C por 24 h. Posteriormente, se adicionó 1 ml de este cultivo a un matraz con medio LB preparado anteriormente el cual sirvió de inóculo para los ensayos. El inóculo se incubó durante 24 horas y se tomaron lecturas a 600 nm hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 1, para poder alcanzar  $1 \times 10^6$  UFC/ml, según Katagiri, *et al.*, 2002, de este inóculo se tomó 1 ml aforando a 100 ml de agua estéril. Esta solución fue utilizada para realizar el inóculo de infección de las plantas.

### VIII.3 Nanopartículas de ácido acetil salicílico.

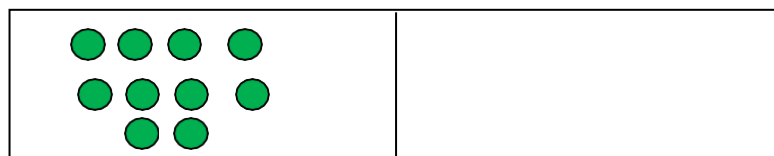
Se utilizaron nanopartículas de poli metacrilato de metilo-co-ácido metacrilico, las cuales se elaboraron previamente por polimerización en heterofase semicontinua, las cuales tienen un diámetro promedio de 12 nm y una relación molar de 1.75 MMA/MAA, está cargado con hasta 22 % ácido acetilsalicílico (AAS) de acuerdo con López-Muñoz *et al.*, 2019. Estas nanopartículas fueron proporcionadas por el Dr. Ramiro Guerrero.



#### VIII.4 Diseño experimental.

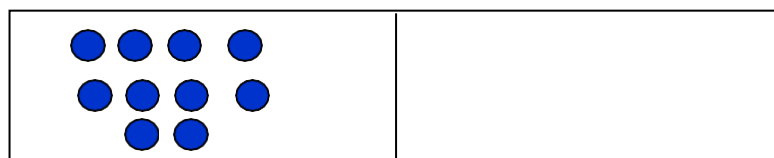
El diseño experimental que se utilizó para los ensayos de patogenicidad con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 fue completamente al azar, con 5 repeticiones por tratamiento y al menos 3 experimentos independientes y se distribuyó como se muestra en la Figura 5, localizándose en la cámara de crecimiento Equitec.

Nivel 1 de la cámara de crecimiento



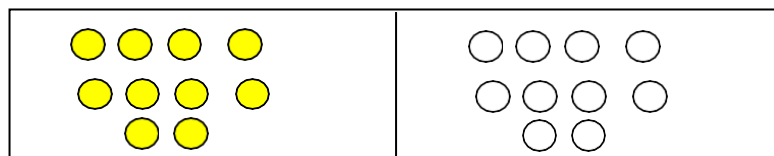
Tratamiento: NAAS+PS

Nivel 2 de la cámara de crecimiento



Tratamiento: AAS+PS

Nivel 3 de la cámara de crecimiento



Tratamiento: CPS

Tratamiento: C

**Figura 5.** Distribución de tratamientos en cámara de crecimiento, 2 experimentos (5 repeticiones por experimento) en la misma cámara.

#### VIII.5 Bioensayos de patogenicidad.

Después de 15 días del trasplante se procedió con la aplicación de los siguientes tratamientos: Plantas sanas, control absoluto(C); Plantas infectadas con bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (PS), Control de infección (CPS); Plantas infectadas con PS y asperjadas con 1 mM de NAAS (NAAS+PS); Plantas infectadas con PS y asperjadas con 1 mM ácido salicílico (AS+PS) según Ortega Martínez *et al.*, (2010).

Como primer paso se aplicaron por aspersión con un aplicador de 100 ml, el ácido salicílico y las nanopartículas NAAS en concentración 1 mM. Después de 24 h se inoculó la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 sobre las hojas, aplicando aproximadamente 3 ml por planta de acuerdo a Souri *et al.*, 2019. Posteriormente, la maceta se colocó dentro de una bolsa de polietileno para promover una humedad relativa aproximadamente del 80%, después de 24 h se quitó la bolsa y se dejó en la cámara de crecimiento Equitec ( $25 \pm 2$  °C, fotoperiodo 16 horas luz x 8 horas noche). Se realizó riego diario aplicando fertilización una vez por semana, con la finalidad de que la planta manifestara síntomas causados por la bacteria.

### **Evaluación del crecimiento de PS en el tejido**

Después de la infección se realizó un muestreo para corroborar que la bacteria estuviera en las plantas. Se utilizó la metodología de unidades formadoras de colonias (UFC), en donde se tomó una hoja de cada planta de cada tratamiento. La cual se realizó en la campana de flujo laminar del Laboratorio de Agromicrobiología, un doble lavado con agua destilada estéril y etanol al 70%. El material vegetal se trituró en mortero con la adición de 10 a 50 ml de agua destilada estéril dependiendo del tamaño de la hoja. Se tomó 1 mL de la muestra y se realizaron diluciones consecutivas, se dejó en gotas de 10 µl en medio LB sólido con 3 repeticiones en placa. Se incubaron de 1 a 3 días a 37 °C y se realizó en conteo de las colonias bacterianas, se reportó la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC).

### **VIII.6 Extracción de ARN total.**

Después de obtener el tejido de cada tratamiento, se tomaron 500 mg de tejido congelado con nitrógeno líquido, que se maceró en un mortero, para luego seguir el protocolo descrito se utilizó el método TRIzol (Invitrogen, USA) aplicando el protocolo del proveedor, en el cual dice la aplicación de 1ml de TRIzol para la extracción (Anexo 2). Se determinó la calidad de ARN obtenido utilizando geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio por 15 minutos. Se obtuvieron imágenes con el fotodocumentador GelDoc, EZImager (Bio-Rad) y se analizaron con el software ImageLab 6.0 de Bio-Rad.

Se utilizó el equipo Sinergy H1 de bioselect para obtener la cuantificación de ARN con una longitud de onda 260/280nm, aquellas muestras que mostraron bajas concentraciones en ug/ul se volvieron a extraer el ARN total, se tomó en cuenta una pureza igual o mayor a

2. Posteriormente, el ARN total se trató con la enzima DNAsa para eliminar posible ADN contaminante y pudiera interferir como templado en los futuros PCRs.

### Tratamiento de la muestra de ARN total con la enzima DNAsa

Para eliminar la posible contaminación con DNA, alícuotas de 10 µl de ARN (1 µg/ µl) se incubaron a 37°C durante 30 min y 1 µl del buffer, posteriormente se adicionó 1 µl de EDTA la enzima se inactivó a 65°C durante 10 min, las muestras de ARN se guardaron a -80°C.

### Síntesis de cDNA

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA se utilizó el kit SensiFAST de BIOLINE, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor (Anexo 5). La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones 25°C por 10 min, 42°C por 15 min y 85°C por 5 min, finalmente las muestras de cDNA se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Oligonucleótidos de genes contemplados son los que se muestran en el siguiente cuadro 1.

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño (pb)
Precursor de la proteína PR-1 relacionada con la patogénesis (PR-1)	PR-1 directo	5'-TAACGCTCACAATGCAGCTC-3'	417
	PR-1 reverso	5'-TCAAAAGCCGGTTGATTTTC-3'	
Proteína que responde al gen 1 (Pto-R1)	Pto-R1 directo	5'-ATGGACCTCAACAGCAAACC-3'	635
	Pto-R1 reverso	5'-GACGCCGTTTCTTCTTCTTG-3'	
Fenilalanina amonio liasa (PAL)	PAL directo	5'-GCTGAGCAACACAACCAAGA-3'	703
	PAL reverso	5'-AGCAGATTGGAAGAGGAGCA-3'	
Aleno Oxido Ciclasa (AOC)	AOC directo	5'-CCACCTCTACTACTGCTTCC-3'	495
	AOC reverso	5'-CAATTCAGATGGCAGACCGG-3'	
Polifenoloxidasa precursora de cloroplasto D (PPO)	PPO directo	5'-TTGGCGGACCTTATGATCTC-3'	630
	PPO reverso	5'-CATTGTTGTCCACGTTTCAGG-3'	
Aminociclopropano-carboxilato oxidasa (ACCO)	ACCO directo	5'-TGCGCCATCTTCCTACTTCT-3'	623
	ACCO reverso	5'-TGGCTCTTTGGCTTGAAACT-3'	
Precursor del inhibidor de proteinasa sensible al etileno (ERPI-1)	ERPI-1 directo	5'-AAGCAAAATGGAGGGAAAGAA-3'	314
	ERPI-1 reverso	5'-CCAGAAAACTCTGCCACAA-3'	
Gen constitutivo EFl $\alpha$	EFl $\alpha$ directo	5'-GCGTTGAGACTGGTGTGAT-3'	241
	EFl $\alpha$ reverso	5'-GATGATGACCTGGGCAGTG-3'	

Cuadro 1. Secuencia de oligonucleótidos y tamaño de los amplicones para los genes contemplados.

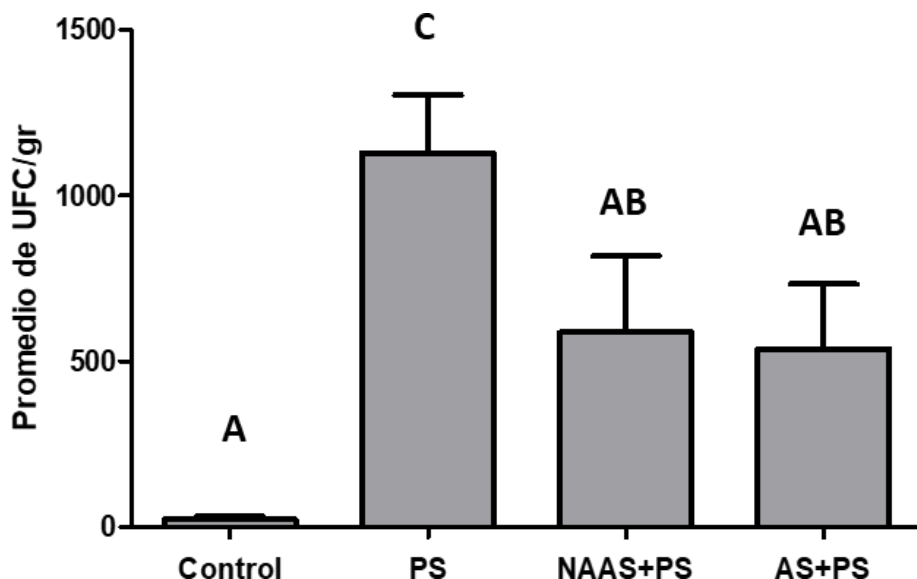
### **VIII.7 Análisis de expresión génica por RT- PCR semi-cuantitativa**

Partiendo del cDNA de cada uno de los tratamientos se utilizó como templado para las reacciones de PCR; se utilizó el kit ThermoScientific DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) por lo tanto se siguió con el protocolo establecido por la marca con algunas modificaciones (Anexo 3). El termociclador se programó con las siguientes condiciones: 95°C durante 3 min para desnaturalizar, después a 55°C para el alineamiento de los oligonucleótidos y a 72°C para sintetizar las nuevas cadenas, esto durante 25 ciclos. Después, el producto de PCR se cargó en gel de agarosa al 1% y se corrió en cámara de electroforésis por 60 min a 80 V, luego de teñirse en bromuro de etidio por 15 min y finalmente observados en el fotodocumentador de geles (GelDoc, BIORAD). Las imágenes fueron procesadas en el equipo GelDoc, BIORAD y software ImageLab 6.0 de Bio-Rad para analizar cada uno de los fragmentos amplificados y cuantificar el valor de pixeles de cada muestra para el análisis densitométrico (expresión relativa) que para obtenerla se dividió la unidad de expresión del gen de interés entre la unidad de expresión del gen constitutivo (Anexo 4). Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA de una sola vía utilizando el programa InfoStat/E.

## IX RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### IX.1 Efecto de AS y NAAS sobre UFC de DC3000 en plantas de tomate.

En los bioensayos de patogenicidad donde se evaluó el crecimiento bacteriano de la cepa *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, en el tejido de la planta se obtuvo como resultado que la aplicación de las nanopartículas actúa de forma similar a AS, ya que, basándonos en los resultados de la UFC, la aplicación libre de AS tiene un comportamiento parecido a las NAAS en la reducción de la población bacteriana (Figura 6) pero se tiene la hipótesis que estas pudieran tener una liberación lenta del AS en la planta.



**Figura 6.** Unidades formadoras de colonia por gramo de tejido (UFC/g). Control absoluto (Control), Control más *P. syringae* pv. *tomato* DC3000(PS), nanopartículas más *P. syringae* pv. *tomato* DC3000(NAAS+PS) y ácido salicílico más *P. syringae* pv. *Tomato* DC3000 (AS+PS). Análisis de varianza (ANOVA), nivel de significancia: \*\*\*,  $P < 0.0001$ .

En la figura 6 muestra el contenido de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 expresado en UFC/g obtenido en cada tratamiento, en donde hay diferencia altamente significativa entre el tratamiento control y el PS, dándonos a entender que en la aplicación de las NAAS y el AS no hay ninguna diferencia estadística, pero al ver las cantidades de UFC/g nos deja con la teoría de que las nanopartículas podrían estar actuando de manera lenta o liberando al AAS lentamente, ya que la liberación del mismo se da por medio de un pH de 7.4, es difícil

saber su comportamiento en la planta ya que estas nanopartículas se hicieron con el objetivo principal de liberar fármacos para la aplicación en humanos (López-Muñoz *et al.*, 2021).

### IX.2 Síntomas de las plantas infectadas.

En la figura 7 se muestran los síntomas por la infección de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 en cada tratamiento es destacado, ya que, en control total es una planta sana erguida con hojas verdes y firmes (Figura 7A), en cuanto el tratamiento con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 son muy notables a simple vista los síntomas típicos que causa la bacteria que son clorosis y manchas en las hojas (Figura 7B), el tratamiento NAAS+PS hay una reducción de los síntomas comparados con el tratamiento anterior aunque tiene algunos de los síntomas como marchitez y clorosis en hojas no llegan a las manchas con halos amarillos (Figura 7C), mientras que el tratamiento AS+PS muestra aún menos síntomas de la enfermedad solo presentan pequeñas manchas cloróticas (Figura 7D).

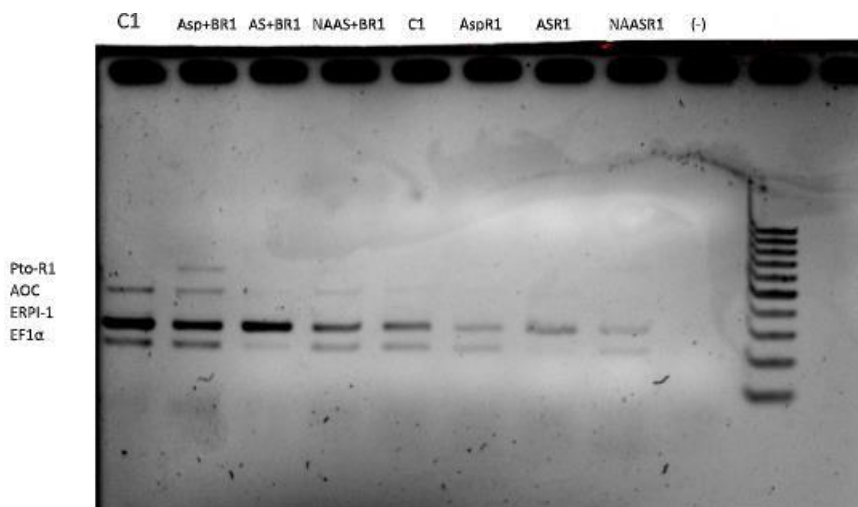


**Figura 7.** Síntomas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 en plantas de tomate por cada tratamiento. A) Control total, B) Control más DC3000, C) Nanopartículas cargadas con ácido acetilsalicílico más DC3000, y D) Ácido salicílico más DC3000.

### IX.3 Análisis de expresión génica.

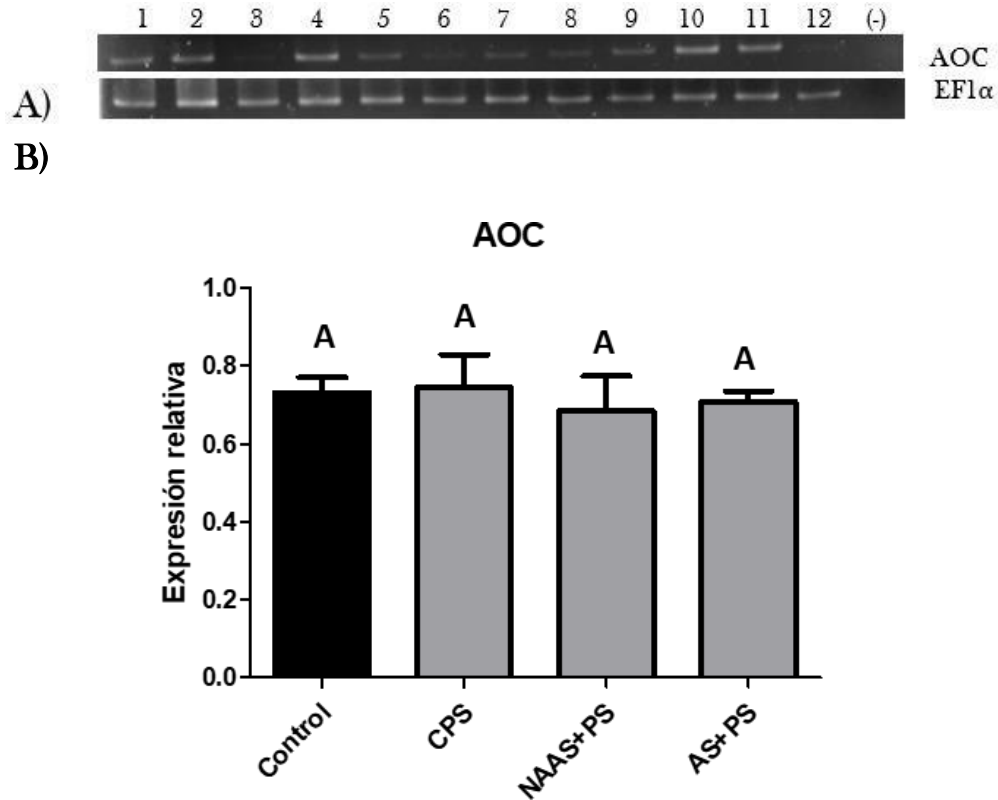
Las nanopartículas fueron utilizadas en plantas de tomate para un ensayo independiente para verificar que éstas no causaran algún estrés o algún impedimento para la extracción de ARN o bien, en futuros RT-PCRs. En la figura 8 se muestran los resultados del efecto de las nanopartículas en plantas de tomate, éstas no afectaron de manera negativa la extracción

de ARN total y el PCR, tampoco causó estrés a la planta, en la figura 8 muestra la expresión de algunos genes dependientes del AS (Pto-R1) que no está expresado en todos los tratamientos ya que reconoce las cepas de *P. syringae* pv. *tomato* y es de esperarse que nose exprese en los tratamientos que no tienen la bacteria, AJ (AOC) y etileno (ERPI-1) así como el factor de elongación (EF1 $\alpha$ ) como control y que fueron amplificados por cada tratamiento.



**Figura 8.** Gel de agarosa al 1.5% en donde C1 - Control absoluto repetición 1, Asp+BR1 - Aspirina con bacteria repetición 1, AS+BR1 - Ácido salicílico con bacteria repetición 1, NAAS+BR1 - nanopartículas de ácido acetil salicílico con bacteria repetición 1, C1 - Control absoluto repetición 1, AspR1 - Aspirina sin bacteria repetición 1, ASR1 - Ácido salicílico sin bacteria repetición 1, NAASR1 - nano partículas de ácido acetil salicílico sin bacteria repetición 1, (-) - Blanco.

Posteriormente, se procesaron las muestras de cada tratamiento por separado de cada uno de los experimentos para su análisis por RT-PCR semi-cuantitativo. La expresión de genes contemplados de cada tratamiento fue comparada con la expresión un gen constitutivo: el factor de elongación 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ). Al no tener diferencias estadísticas (ver Anexo 6) se optó por discutir basándose en el comportamiento de cada tratamiento con la expresión relativa de los genes evaluados.



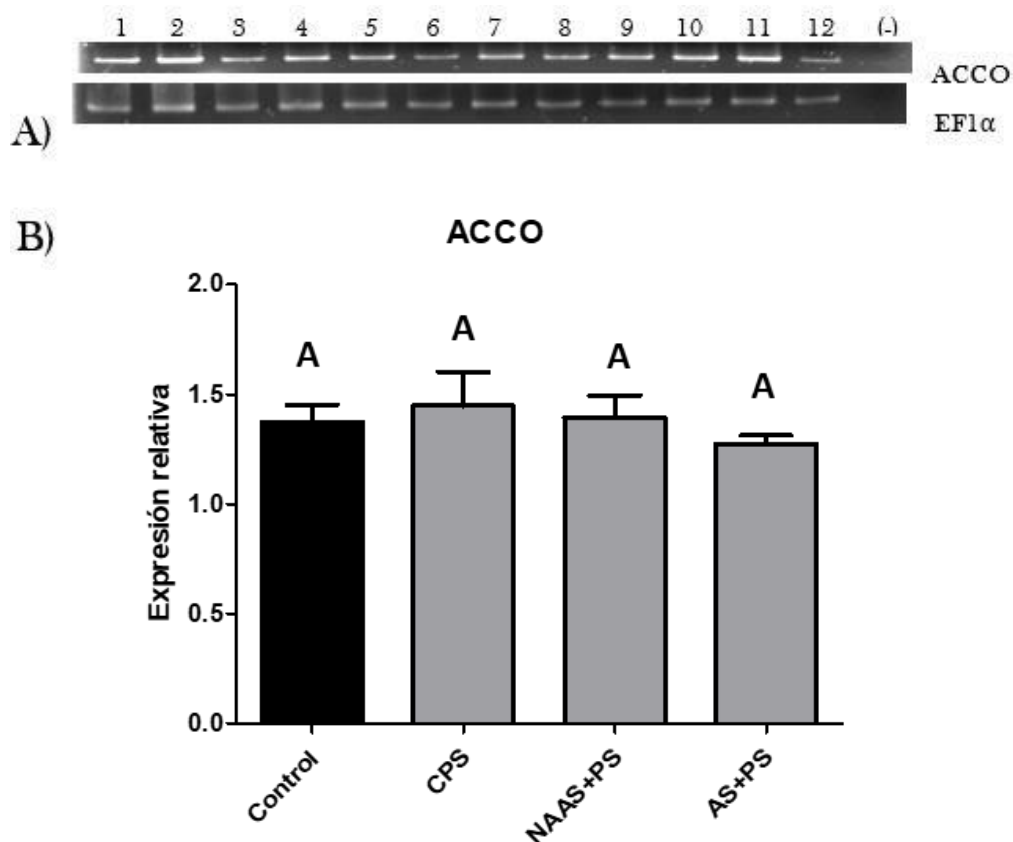
**Figura 9.** A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo (EFl $\alpha$ ) y aleno oxido ciclasa (AOC) en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1-Control (C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 9A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento. B) Gráfico de barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo (EFl $\alpha$ ).

La figura 9 muestra la expresión del gen de Aleno Oxido Ciclasa (AOC) por cada tratamiento en donde predomina en CPS seguido del control, este gen es precursor para



la síntesis del AJ, que juega un papel esencial en la defensa de la planta, aunque estudios recientes confirman un aumento de expresión de este gen en plantas de *Aquilaria sinensis* callial ser tratadas con ácido salicílico, jasmonato de metilo, ácido abscísico, y giberelina (Buell *et al.*, 2003). La cepa DC3000 se ha demostrado que produce una toxina conocida como coronatina y que mimetiza el efecto del AJ en plantas de *Arabidopsis thaliana* y en tomate (Buell *et al.*, 2003), en estos experimentos la expresión de AOC podría verse alterada por la presencia de esta toxina.

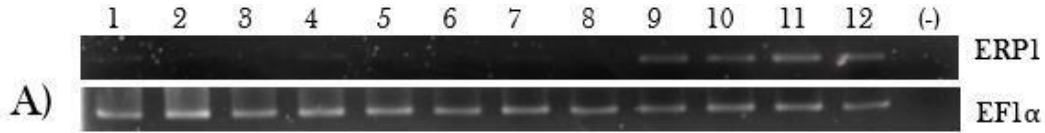
La expresión de AOC es específica del haz vascular y formación de AJ en hojas de tomate por lo tanto induce la señalización sistémica de la planta (Stenzel *et al.*, 2012). La expresión de este gen puede deberse a los volátiles que puede liberar la planta principalmente mediados por el AJ que se les conoce como jasmonatos (Vlot, *et al.*, 2009).



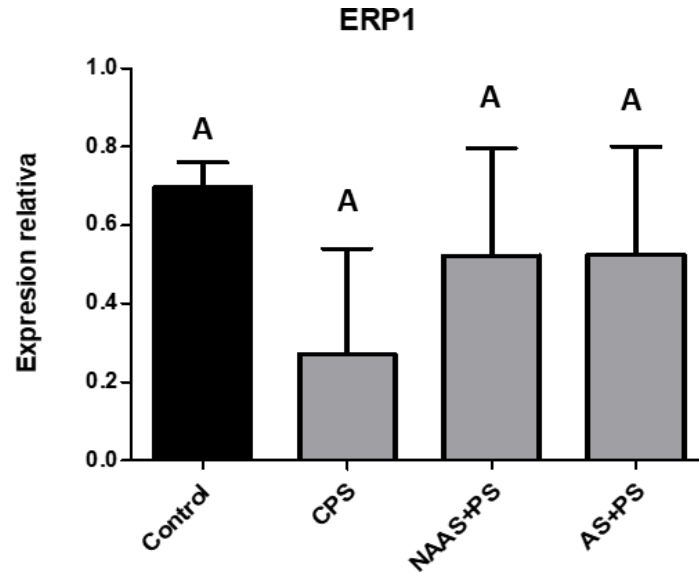
**Figura 10.** A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo (EIF $\alpha$ ) y ACCO en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1- Control (C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control

(C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 10A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento. B) Gráfico de barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo ( $EF1\alpha$ ).

El gen ACCO codifica para una enzima que es precursora del etileno y es utilizada comúnmente en estudios científicos como gen marcador de la ruta de etileno (río arriba). Estudios han reportado que el etileno esclava para determinar la resistencia contra pudrición parda en durazno, también estudios muestran que la expresión de este gen es causado por tratamientos por fitohormonas, por estrés biótico y abiótico (Elías *et al.*, 2018). También se ha reportado que algunas respuestas defensivas actúan JA/ET activando genes en respuesta al estrés biótico, aunque en este estudio el tratamiento CPS presentó una expresión de ACCO ligeramente mayor comparado a los otros tratamientos, pero no es estadísticamente significativo, la expresión de este gen pudiera corresponder a una reacción contra el patógeno DC3000 (Baró-Montel *et al.*, 2019).

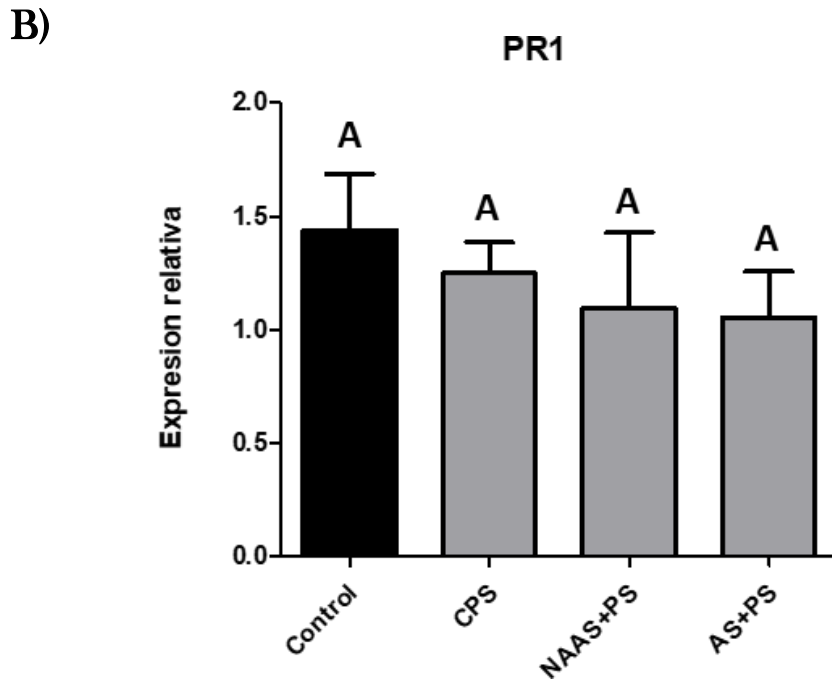
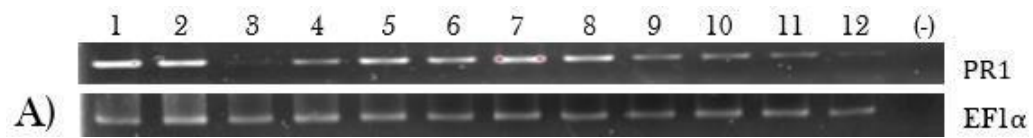


B)



**Figura 11.** A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo ( $EIF1\alpha$ ) y  $ERP1$  en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1-Control(C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control (C), 6-Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 11A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con  $n=5$  por tratamiento. B) Gráfico de barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo ( $EIF1\alpha$ ).

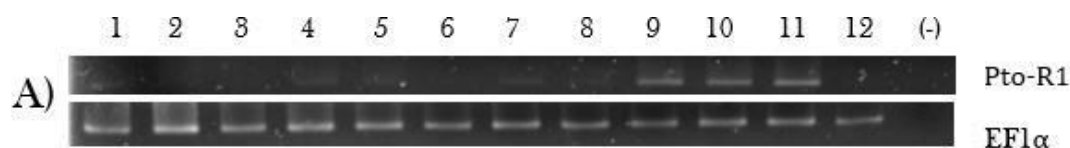
El gen ERP1 de igual manera es dependiente del etileno, este gen codifica para una proteína de respuesta a etileno (río abajo), estos controlan la expresión de distintos genes implicados en las respuestas sistémica inducida y tiene una interrelación con otras vías de defensa controladas por el AS y el jasmonato (Broekaert *et al.*, 2006). Sin embargo, en estos experimentos existe una expresión reducida en los tratamientos, siendo más en el tratamiento CPS, y casi la misma expresión de NAAS+PS y AS+PS; los tratamientos no mostraron diferencias significativas. En este sentido, así que el AS y la DC3000 pudieran estar participando en la expresión ya sea por una inhibición, pues en comparación con el control absoluto hay una mayor expresión. Cabe mencionar que el etileno es un promotor de crecimiento en las plantas de tal manera la activación de la RSI es causada de manera indirecta por el mismo, esto en relación a las rizobacterias promotoras de crecimiento de en las plantas (Elías *et al.*, 2018).



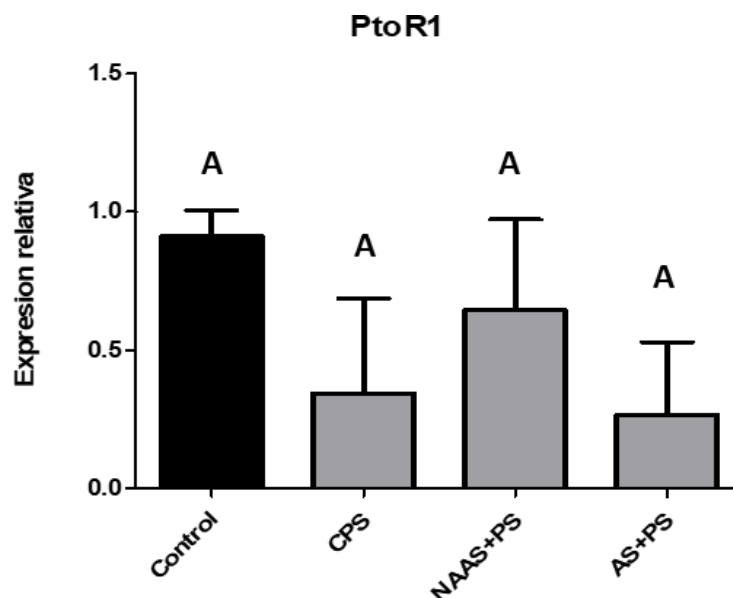
**Figura 12.** A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo (E1F1 $\alpha$ ) y PR1 en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1-Control

(C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5-Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9-Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 12A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento. B) Gráfico de barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo ( $EF1\alpha$ ).

El gen PR1 es dependiente y marcador de la ruta del AS, tuvo una expresión similar en el tratamiento con nanopartículas en comparación con la aplicación del AS libre, aunque es ligeramente mayor en el tratamiento del CPS, dando a entender que la planta intacta está activando los genes de defensa contra la DC3000. En cuanto a la expresión en los tratamientos con DC3000 es debido a la interacción planta-patógeno por lo cual se ha reportado que la percepción de flagelina y otros efectores activan la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (Botella, 2018). La expresión de PR1 en los controles pudiera deberse por algún rozamiento de las plantas control con las plantas tratadas con DC3000, aunque de manera mínima pues en las pruebas de UFC se presenta una pequeña presencia. Otra posibilidad que no se descarta es la posible emisión del volátil metil salicilato (MeSA) en plantas infectadas y pudiera estar activando respuestas de AS en plantas intactas, además de que se ha comprobado que DC3000 reduce la activación de respuestas por AS, debido a la producción de coronatina que mimetiza al AJ (Shulaev, Silverman and Raskin, 1997).

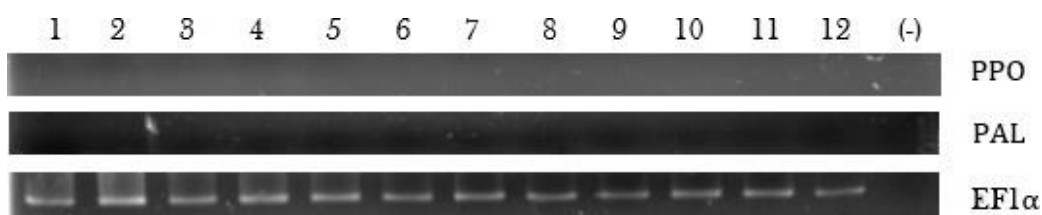


B)



**Figura 13.** A) Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados por PCR de los genes constitutivo (EIF $\alpha$ ) y Pto-R1 en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1- Control (C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5- Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9- Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo (ver Figura 13A). Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento. B) Gráfico de barras utilizando los valores promedios de expresión relativa del gen de interés comparado con el constitutivo (EIF $\alpha$ ).

La proteína Pto actúa junto a la proteína Prf para reconocer las cepas de *P. syringae* pv. *tomato*, que al expresarse provocan resistencia a la infección en hojas de tomate, este reconocimiento gen por gen contribuye a la restricción del rango de hospederos a los distintos patovares de *P. syringae* (Lin *et al.*, 2007). Curiosamente, en este estudio se observó incrementos en la expresión de este gen en plantas control (intactas) comparado a los otros tratamientos con DC3000 cuya expresión fue reducida hasta tres veces (Figura 13B). La expresión de Pto-R1 ocurre durante la interacción planta-patógeno, especialmente con la proteína avirulenta AvrPto de *P. syringae* pv. *tomato* (Tang *et al.*, 1999). Por otrolado, se desconoce si este gen es activado por algún compuesto volátil en otras plantas modelo.

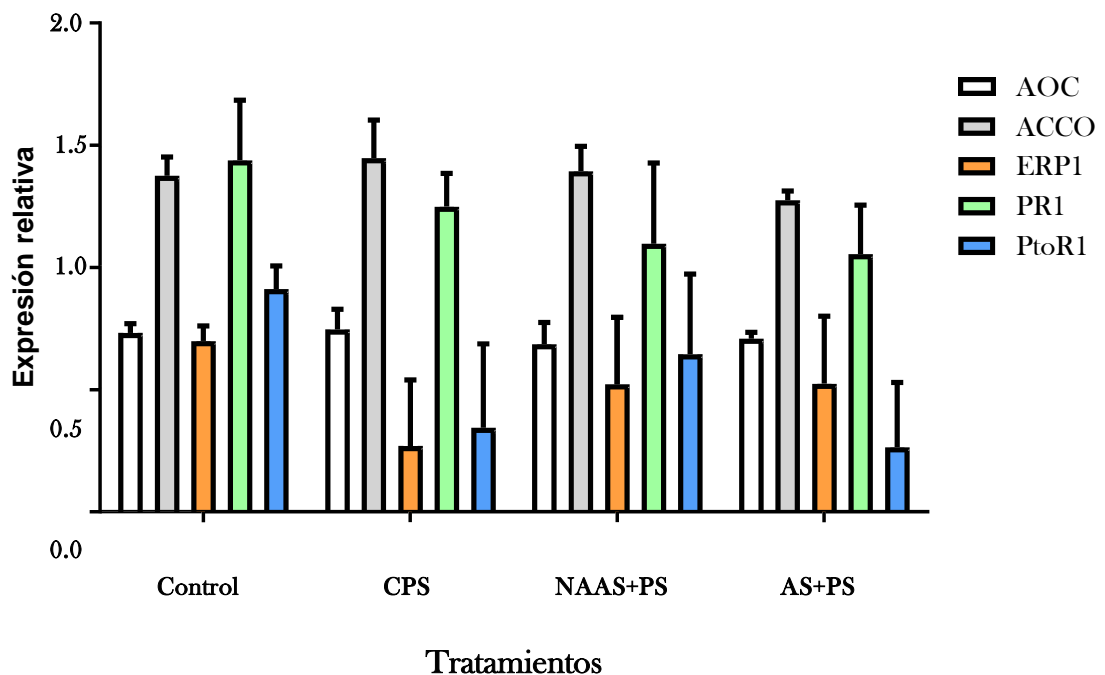


**Figura 14.** Genes no expresados, los gels de agarosa muestran que no hubo amplificación por RT-PCR de los genes PPO y PAL en donde el orden de los pozos (1 al 12) fueron: 1- Control (C), 2- Control más bacteria (CPS), 3- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 4- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del primer experimento independiente, 5- Control (C), 6- Control más bacteria (CPS), 7- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 8- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del segundo experimento independiente, 9- Control (C), 10- Control más bacteria (CPS), 11- Nanopartículas más bacterias (NAAS+PS), 12- Ácido salicílico más bacteria (AS+PS) del tercer experimento independiente, y (-) como el negativo. Cada tratamiento (o pozo del gel) corresponde a un pool de 5 repeticiones por cada experimento, en total, 3 experimentos independientes con n=5 por tratamiento.

Para el caso de los genes PPO y PAL no presentaron expresión en ningún tratamiento, al gen PPO se le ha atribuido una respuesta dependiente a daño mecánico y herbivoría por lepidópteros (*Manduca sexta* y *Trichoplusia ni*) en plantas de tomate (Chung *et al.*, 2011; Scott, *et al.*, 2010). La expresión de PPO se da por la interacción planta-insecto, ya que algunas especies de insectos contienen sustancias que activan este gen, principalmente en

plantas de tomate y papa (Howe *et al.*, 2008). Aunque en estos experimentos no se involucró algún tratamiento que pudiera inducir la expresión de este gen, es por ello su nula expresión en las plantas tratadas.

En el caso del gen PAL que tampoco se detectó su expresión puede deberse a que posee un gran número de copias dispersas en el genoma del tomate, cuya expresión mínima se puede deber a eventos como: silenciamiento transcripcional, degradación post-transcripcional y metilación del ADN o elementos regulatorios (promotores); en este caso, los autores sugieren que puede afectar la metilación del ADN a la expresión de las múltiples copias de PAL en tomate en respuesta al estímulo (Chang *et al.*, 2008).



**Figura 15.** Gráfica comparativa que resume el comportamiento de expresión de los genes de interés por tratamiento en los 3 experimentos independientes.

Al hacer un resumen general comparativo en todos los tratamientos, los genes con mayor expresión relativa son ACCO dependiente del etileno y PR1 dependiente del AS, el ACCO con mayor expresión en CPS donde la planta está reaccionando al patógeno por sí misma, actuando el ET y el AS para reducir el daño (Baró-Montel *et al.*, 2019), los que tuvieron



menor expresión fueron ERP1 y PtoR1, estas reaccionan al AS y a DC3000, pues PtoR1 reconoce las cepas avirulentas de DC3000 y ERP1 tiene una interrelación con las vías de inducción de AS. PR1 puede ser activado por volátiles (Jafarbeigi, *et al.*, 2021), aunque también puede que el AS lo esté activando, pero la bacteria lo esté reprimiendo, ya que en las distintas fases de ataque hay una comunicación cruzada de señalización de AS y coronatina (COR) (Lim, *et al.*, 2014).

## X CONCLUSIONES

- La población de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 fue similar entre los tratamientos de nanopartículas de AS y el AS libre.
- Los análisis de expresión semi-cuantitativa de genes evaluados no mostraron diferencias significativas por los tratamientos. Es necesario separar el tratamiento control sin *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 para evaluar diferencias en expresión. Solamente en PtoR1 se detecta una menor expresión en AS comparado a NAAS, aunque no es significativa.
- No hay diferencia estadística al aplicar las NAAS en comparación con el AS pero en cuanto a sintomatología hay un efecto positivo de las NAAS hacia la reducción de los síntomas causados por la bacteria no de la misma manera que la aplicación del AS, pero si reduce los síntomas, en cuanto a expresión génica los genes dependientes del AJ no hay mayor expresión pues estos son encendidos por otras condiciones que no se tuvieron en este experimento, y los genes dependientes del AS son expresiones basales que pudieren estar afectadas por la acción de la bacteria en cuestión.

## **XI PERSPECTIVAS**

Este trabajo plantea nuevas investigaciones en materia del empleo de nanomateriales en la agricultura, por lo cual se sugiere:

- Realizar experimentos evaluando muestras a distintos tiempos para verificar la liberación del AS de las nanopartículas.
- Realizar nuevas pruebas en distintas etapas de crecimiento de plantas para evidenciar el comportamiento de las nanopartículas.
- Realizar nuevas pruebas en distintas plantas y con distintos patógenos para ver la efectividad de las nanopartículas.
- Realizar pruebas en diferentes tiempos para verificar la expresión génica en distintas horas.

## XII REFERENCIAS

- Anastasios A. Malandrakis, Nektarios Kavroulakis, Constantinos V. Chrysikopoulos, Use of copper, silver and zinc nanoparticles against foliar and soil-borne plant pathogens, *Science of The Total Environment*, Volume 670, 2019, Pages 292-299, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.210>.
- Arun Lal Srivastav, Chapter 6 - Chemical fertilizers and pesticides: role in groundwater contamination, *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation*, Butterworth-Heinemann, 143-159 (2020) <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00006-4>.
- Baró-Montel, N. *et al.* (2019) 'Double-sided battle: The role of ethylene during *Monilinia* spp. infection in peach at different phenological stages', *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson, 144, pp. 324-333. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2019.09.048.
- Beatrice, C., Linthorst, J.M.H., Cinzia, F. *et al.* Enhancement of *PR1* and *PR5* gene expressions by chitosan treatment in kiwifruit plants inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Eur J Plant Pathol* **148**, 163-179 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1080-x>
- Beltrán Piña, B. G., González Castro, M. I. and Rivas García, F. (2019) 'Influence of amino acids that come from the diet in the expression of genes', *Nutricion Hospitalaria*, 36(1), pp.173-182. doi: 10.20960/nh.1986.
- Benth, A. *et al.* (2019) 'Brazilian Journal of Animal and Environmental Research Influence of acetylsalicylic acid on emergence and induction to resistance to water deficit in *Anadenanthera macrocarpa* ( Benth .) Brenan', pp. 664-673.
- Benavides Sadaka, P. I. (2015) 'Capacidad germinativa del genotipo de tomate florada de *Lycopersicon esculentum* MILL.) en condiciones de estrés salino en diferentes fotoperiodos'. Available at: <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/2213>.
- Bernal, R. (2010). Enfermedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero en las zonas de Salto y Bella Unión. *Serie Técnica. INIA. Montevideo, Editorial Hemisferio Sur SRL*, 181, 1-71.
- Botella, J. G. (2018) 'Análisis integrado del metaboloma y del proteoma de plantas de

tomate infectadas con *Pseudomonas syringae*', p. 57.

Broekaert, W. F. *et al.* (2006) 'The role of ethylene in host-pathogen interactions', *Annual Review of Phytopathology*, 44, pp. 393-416. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440.

Buell, C. R. *et al.* (2003) 'The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), pp. 10181-10186. doi:10.1073/pnas.1731982100.

Camarena-Gutiérrez, G. y (2006), "Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos." Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, Vol.12, núm.1, pp.25-30 [Consultado: 9 de Marzo de 2020]. ISSN: 2007-3828. Disponible en : <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=629/62912103>

Corrado, G. *et al.* (2007) 'Systemin regulates both systemic and volatile signaling in tomato plants', *Journal of Chemical Ecology*, 33(4), pp. 669-681. doi: 10.1007/s10886-007-9254-9. Días, L. (2012) 'Systemic Acquired Resistance Induced By Salicylic Acid Resistência Sistêmica Adquirida', *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol 10 No. 2 (257 -267)*, 10(2), pp. 257-267.

Corina Vlot, A., Dempsey, D. A. and Klessig, D. F. (2009) 'Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease', *Annual Review of Phytopathology*, 47, pp. 177-206. doi: 10.1146/annurev.phyto.050908.135202.

Chen, Z. *et al.* (2009) 'Biosynthesis of salicylic acid in plants', *Plant Signaling and Behavior*, pp. 493-496. doi: 10.4161/psb.4.6.8392.

Chong Chen, Lin-Lin Yang, A-Ling Tang, Pei-Yi Wang, Rong Dong, Zhi-Bing Wu, Zhong Li, and Song Yang. Curcumin-Cu(II) Ensemble-Based Fluorescence "Turn-On" Mode Sensing the Plant Defensive Hormone Salicylic Acid In Situ and In Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2020 68 (17), 4844-4850. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c01283

Cristina, T. B. A. (2008) "SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE HÍBRIDOS Y /OVARIEDADES COMERCIALES DE TOMATE DE MESA (

*Solanumlycopersicum*)TOLERANTES A LA SALINIDAD , TANTO EN CONDICIONES IN VITRO COMO DE INVERNADERO ". Escuela politécnica del ejército.

De la Cruz-Lázaro, E., Estrada-Botello, M. A., Robledo-Torres, V., Osorio-Osorio, R., Márquez-Hernández, C., & Sánchez-Hernández, R. (2009). Producción de tomate en invernadero con composta y vermicomposta como sustrato. *Universidad y ciencia*, 25(1), 59-67.

Elías, J. M. *et al.*(2018) 'Role of ethylene and related gene expression in the interaction between strawberry plants and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*', *Plant Biology*, 20(3), pp. 490-496. doi: 10.1111/plb.12697.

Farias, G. A., Olmedilla, A. and Gallegos, M. T. (2019) 'Visualization and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 pellicles', *Microbial Biotechnology*, 12(4), pp. 688-702. doi: 10.1111/1751-7915.13385.

García-Avila C, Trujillo-Arriaga F, López-Buenfil J, González-González R, Carrillo D, Ruiz-Galván I, Quezada-Salinas A, et.al. «First Report of *ewallaceanr.fornicatus* (Coleoptera:Curculionidae) in Mexico.» *Florida Entomologist*, 2016.

Gul, H. T. *et al.*(2014) 'Potential of Nanotechnology in Agriculture and Crop Protection :A Review', *Applied Sciences and Business Economics*, 1(2), pp. 23-28. Available at: [www.bzujournal.org](http://www.bzujournal.org).

Garnica Vergara, A. *et al.* (2012) 'Señalización del ácido jasmónico y el óxido nítrico durante el desarrollo de *Arabidopsisthaliana*.', *Ciencia Nicolaita*, 55(55), pp. 28-41.

Hayat, S. *et al.* (2008) 'Growth of tomato (*Lycopersiconesculentum*) in response to salicylic acid under water stress', *Journal of Plant Interactions*, 3(4), pp. 297-304. doi: 10.1080/17429140802320797.

Hirano, S. S. and Upper, C. D. (1990) *POPULATION BIOLOGY AND EPIDEMIOLOGY OF PSEUDOMONAS SYRINGAE 1*,*Annu. Rev. Phytopathol.* Available at: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).

Howe, G. A. and Jander, G. (2008) 'Plant immunity to insect herbivores', *Annual Review of Plant Biology*, 59, pp. 41-66. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825.

- Hussain, I. *et al.* (2020) 'Foliar Applied Acetylsalicylic Acid Induced Growth and Key-Biochemical Changes in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Under Drought Stress', *Dose-Response*, 18(4), pp. 1-13. doi: 10.1177/1559325820956801.
- Ioannou, A. *et al.* (2020) 'Advanced nanomaterials in agriculture under a changing climate: The way to the future?', *Environmental and Experimental Botany*. Elsevier, 176(April), p.104048. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.104048.
- Iñaky, E. *et al.*(2017) 'Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos\* Application of jasmonic acid as an inducer of plant resistance to pathogens', *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8, pp. 673-683.
- Joaquín, S. P. D. P. (2020) *Caracterización de la producción de compuestos bioactivos y análisis de proteínas en cultivos celulares de brócoli*, *All rights reserved. IJES*. Universidad de Murcia. Available at: <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Universidad+de+murcia#0>.
- José Eladio Monge Pérez, M. L. C. (2019) 'Greenhouse tomato (*Solanum lycopersicum*) production: agronomic comparison between types of tomato', *Revista Posgrado y Sociedad*, 17, pp. 1-20.
- Kasson, M. T. *et al.* (2013) 'An inordinate fondness for *Fusarium*: Phylogenetic diversity of fusaria cultivated by ambrosia beetles in the genus *Euwallacea* on avocado and other plant hosts', *Fungal Genetics and Biology*, 56, pp. 147-157. doi: 10.1016/j.fgb.2013.04.004.
- Katagiri, F., Thilmony, R. and He, S. Y. (2002) 'The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* Interaction', *The Arabidopsis Book*, 1(Appendix D), p. e0039. doi: 10.1199/tab.0039.
- Kim, S. W. *et al.* (2009) 'An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp.', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(8), pp. 760-764. doi: 10.4014/jmb.0812.649.
- Koo, Y. M., Heo, A. Y. and Choi, H. W. (2020) 'Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator', *Plant Pathology Journal*, 36(1), pp. 1-10. doi: 10.5423/PPJ.RW.12.2019.0295.

Laredo Alcalá, E. I. *et al.* (2017) ‘Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos’, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(3), p. 673. doi: 10.29312/remexca.v8i3.40.

Larqué-Saavedra, A. ‘Stomatal Closure in Response to Acetylsalicylic Acid Treatment’, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Volume 93, Issue 4, 1979, Pages 371-375,

ISSN 0044-328X, [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(79\)80271-8](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(79)80271-8).

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044328X79802718>)

Lindsey, K., Casson, S. and Chilley, P. (2002) ‘Peptides: New signalling molecules in plants’, *Trends in Plant Science*, 7(2), pp. 78–83. doi: 10.1016/S1360-1385(01)02194-X.

Li, T. *et al.* (2019) ‘Salicylic acid-induced differential resistance to the Tomato yellow leaf curl virus among resistant and susceptible tomato cultivars’, *BMC Plant Biology*. *BMC Plant Biology*, 19(1), pp. 1-14. doi: 10.1186/s12870-019-1784-0.

Lin, N.-C. and Martin, G. B. (2007) ‘Pto-and Prf-Mediated Recognition of AvrPto and AvrPtoB Restricts the Ability of Diverse Pseudomonas syringae Pathovars to Infect Tomato e-Xtra \*’, *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 20(7), pp. 806–815. doi: 10.1094/MPMI.

López-Muñoz, R. *et al.* (2019) ‘Ultrafine Nanoparticles of Poly(Methyl Methacrylate- co - Methacrylic Acid) Loaded with Aspirin’, *Journal of Nanomaterials*, 2019. doi: 10.1155/2019/3059098.

Maffei, M. E., Mithöfer, A. and Boland, W. (2007) ‘Before gene expression: early events in plant- insect interaction’, *Trends in Plant Science*, 12(7), pp. 310–316. doi: 10.1016/j.tplants.2007.06.001.

Marone, M. *et al.* (2001) ‘Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) is a highly sensitive and specific method useful for the detection of’, *Biological Procedures Online* •, 3(1), pp. 19–25. Available at: [www.biologicalprocedures.com](http://www.biologicalprocedures.com).

Mitsuhashi, I. *et al.* (2008) ‘Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds

(121/180)', *Molecular Genetics and Genomics*, 279(4), pp. 415-427. doi: 10.1007/s00438-008-0322-9.

Michelena, G. *et al.* (2005) 'ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de', *Rev. ICIDCA*, XXXIX(3), pp. 3-7. Available at: <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223120688001.pdf>.

Morante Carriel, J. *et al.* (2014) 'Distribución, Localización E Inhibidores De Las Polifenol Oxidasas En Frutos Y Vegetales Usados Como Alimento', *Ciencia y Tecnología*, 7(1), pp. 23-31. doi: 10.18779/cyt.v7i1.95.

Montero, S. M. M. (2019) *Estudio de una salicilato hidroxilasa implicada en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a la infección con el Viroide de la Exocortis de los Cítricos*. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA. Available at: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/124006/Miguel - Una salicilato hidroxilasa implicada en la respuesta defensiva de plantas de tomate fren. pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/124006/Miguel%20-%20Una%20salicilato%20hidroxilasa%20implicada%20en%20la%20respuesta%20defensiva%20de%20plantas%20de%20tomate%20frente%20a%20la%20infecci%C3%B3n%20con%20el%20Viroide%20de%20la%20Exocortis%20de%20los%20C%C3%ADtricos.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

Mysore KS, D'Ascenzo MD, He X, Martin GB. Overexpression of the disease resistance gene Pto in tomato induces gene expression changes similar to immune responses in human and fruitfly. *PlantPhysiol.* 2003 Aug;132(4):1901-12. doi: 10.1104/pp.103.022731. PMID: 12913147; PMCID: PMC181276.

Ortega Martínez, L. D. *et al.* (2010) 'Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum* MILL)', *Ra Ximhai*, 16(3), pp. 365-372. doi: 10.35197/rx.06.03.2010.05.lo.

Oliveira, H. C. *et al.* (2015) 'Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants', *PLoS ONE*, 10(7), pp. 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0132971.

Perez, S. M. *et al.* (2019) 'Plasma activated water as resistance inducer against bacterial leaf spot of tomato', *PLoS ONE*, 14(5), pp. 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0217788.

Peteira Delgado-Oramas, Belkis. (2020). La resistencia inducida como alternativa para el manejo de plagas en las plantas de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, 35(1), e07. Epub 01 de abril de 2020. Recuperado en 24 de mayo de 2021, de



[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S101027522020000100001&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522020000100001&lng=es)  
&tlng=es

Raddy M, & Marzouk A., & E., Korrat & E., Hamada. (2020). Nematicidal Activity of Acetyl Salicylic Acid against Root-Knot Nematode on Tomato Plants.. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology & Pest Control. 12. 241-247. 10.21608/eajbsf.2020.127980. Muñoz Bonilla A, Heuts J. «Diseño macromolecular por transferencia de cadena.» *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 2010: 30-36.

Rai, M. and Ingle, A. (2012) 'Role of nanotechnology in agriculture with special referenceto management of insect pests', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), pp. 287- 293. doi: 10.1007/s00253-012-3969-4.

Raskin, I. (1992) *ROLE OF SALICYLIC ACID IN PLANTS*, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Available at: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).

Ryan, C. A. and Pearce, G. (2003) 'Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species', *Proceedings of the NationalAcademy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp. 14577-14580. doi:10.1073/pnas.1934788100.

Saavedra, T. M., Figueroa, G. A. and Cauhi, J. G. D. (2017) 'Origin and evolution of tomato production *Lycopersiconesculentum* in México', *Ciência Rural*, 47(5).

Sánchez-Rangel, D. *et al.*(2018) 'Environmental pH modulates transcriptomic responses in the fungus *Fusarium* sp. associated with KSHB *Euwallacea* sp. near *formicatus*', *BMC Genomics*. BMC Genomics, 19(1), pp. 1-21. doi: 10.1186/s12864-018-5083-1.

Sánchez, F. E. (2008) 'Jasmonatos: compuestos de alto valor para la agricultura. Parte I. Actividad biológica y ruta biosintética del ácido jasmónico en planta', pp. 51-59.

Santos, M. S., Nogueira, M. A. and Hungria, M. (2019) 'Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture', *AMB Express*. Springer Berlin Heidelberg, 9(1). doi: 10.1186/s13568-019-0932-0.

Scavo Aurelio, Gaetano Pandino, Cristina Restuccia, Lucia Parafati, Gabriella Cirvilleri, Giovanni Mauromicale, Antimicrobial activity of cultivated cardoon (*Cynaracardunculus* L. var. *atilis* DC.) leaf extracts against bacterial species of agricultural and food interest, *Industrial Crops and Products*, Volume 129, 2019, Pages 206-211, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.005>.(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669018310574>)

Stella, A. and Angarita, R. (2001) ‘Moléculas activadoras de la inducción de resistencia , incorporadas en programas de agricultura sostenible’, *Review Literature And Arts Of The Americas*, (61), pp. 4-11.

Stenzel Irene, Otto Markus, Delker Carolin, Kirsme Nils, Schmidt Diana, Miersch Otto, H. B. y W. C. (2012) ‘ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of methylation and chromatin patterning *Arabidopsis thaliana*: tissue- and organ-specific promoter activities and in vivo heteromerization’, *Journal of Experimental Botany*, 63(17),pp. 695-709. doi: 10.1093/jxb/ers261.

Souri, MK, Tohidloo, G. Efectividad de diferentes métodos de aplicación de ácido salicílico sobre las características de crecimiento de plántulas de tomate bajo salinidad. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 6, 26 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0169-9>.

Sun, T. *et al.* (2020) ‘ScAOC1, an allene oxide cyclase gene, confers defense response to biotic and abiotic stresses in sugarcane’, *Plant Cell Reports*. Springer Berlin Heidelberg, 39(12), pp. 1785-1801. doi: 10.1007/s00299-020-02606-z.

Tarqui Freire, O. M., Sotomayor Cantos, I. A., Jesús Casanova Mendoza, T. de, Rodríguez Zamora, G. A., Plaza Avellán, L. F. y Zambrano Flores, F. G. (2017) «Selección de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con resistencia a escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en Los Ríos, Ecuador», *Ciencia y Tecnología*, 10(1), pp. 17-26. doi: 10.18779/cyt.v10i1.197.

Universidad Autónoma de Barcelona. *ServeigenomicaBioinformatica*. 2016. <http://sct.uab.cat/genomica-bioinformatica/es/content/rt-pcr> (último acceso: Febrero de 2020).

Wang, S. *et al.* (2020) 'miR477 targets the phenylalanine ammonia-lyase gene and enhances the susceptibility of the tea plant (*Camellia sinensis*) to disease during *Pseudopestalotiopsis* species infection', *Planta*. Springer Berlin Heidelberg, 251(3), pp. 1–12. doi:10.1007/s00425-020-03353-x.

Wasternack, C. and Song, S. (2017) 'Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription', *Journal of Experimental Botany*, 68(6), pp. 1303–1321. doi: 10.1093/jxb/erw443.

Wu, Z. *et al.* (2019) 'Cold stress activates disease resistance in *Arabidopsis thaliana* through a salicylic acid dependent pathway', *Plant Cell and Environment*, 42(9), pp. 2645–2663. doi: 10.1111/pce.13579.

Xue Huali, *et al.* (2020) 'Acetylsalicylic acid (ASA) induced fusarium rot resistance and suppressed neosolaniol production by elevation of ROS metabolism in muskmelon fruit' *Scientia Horticulturae*. 265, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109264>

Zhao, L. *et al.* (2019) 'Exogenous application of melatonin improves plant resistance to virus infection', *Plant Pathology*, 68(7), pp. 1287–1295. doi: 10.1111/ppa.13057.

Zhang, Y. *et al.* (2019) 'The cotton laccase gene GhLAC15 enhances *Verticillium* wilt resistance via an increase in defence-induced lignification and lignin components in the cell walls of plants', *Molecular Plant Pathology*, 20(3), pp. 309–322. doi: 10.1111/mpp.12755.

Zhao, L. *et al.* (2019) 'Exogenous application of melatonin improves plant resistance to virus infection', *Plant Pathology*, 68(7), pp. 1287–1295. doi: 10.1111/ppa.13057.

### XIII ANEXOS

#### Anexo 1. Solución Hoagland

<b>NH<sub>4</sub> mmol</b>	<b>NO<sub>3</sub> mmol</b>	<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mmol</b>	<b>K mmol</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> mmol</b>
<i>1</i>	10.8	1.25	6.5	2.75
<b>Mg mmol</b>	<b>SO<sub>4</sub> mmol</b>	<b>CE</b>	<b>pH</b>	
<i>1</i>	1.5	2.4	5.5	

#### Anexo 2. Extracción de ARN total de plantas.

Una vez obtenido el tejido de cada tratamiento, se procedió a la extracción del ARN total de acuerdo a la técnica de TRIzol® (Invitrogen, USA) con algunas modificaciones.

1. Partiendo de 500 mg de tejido, y colocar en un tubo eppendorff de 2 ml conteniendo 1 ml del reactivo TRIzol, homogenizar la muestra en el reactivo por agitación en vortex por unos 5 segundos.
2. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente agregar al tubo 200 µl de cloroformo y mezclar por inversión.
3. La muestra se centrifuga a 13,000 rpm por 10 min en frío. La fase acuosa se añadió a otro tubo de 1.5 ml nuevo y estéril, se agregó 500 µl de isopropanol y dejar incubando a 4°C toda la noche.
4. Los tubos se centrifugan a 12,000 rpm por 10 min en frío; al término, descartar el sobrenadante y la pastilla obtenida se lava con 1 ml de etanol al 70%, y centrifugar a 8,000 rpm por 5 min.
5. Desechar el sobrenadante y secar el tubo. Agregar 100 µl de agua destilada estéril y 50 µl de LiCl 8M, agitar suavemente y dejar incubando a 4°C toda la noche.
6. Al término, centrifugar a 13,000 rpm por 15 min en frío y descartar el sobrenadante; lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%, se pasó a centrifugación a 8,000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante.
7. Finalmente, secar el tubo y resuspender la pastilla en 30-40 µl de agua estéril.
8. Cuantificar en nanodrop o espectrofotómetro y verificar la integridad del ARN obtenido en gel de agarosa.

**Anexo 3.** Protocolo de RT-PCR semicuantitativa.

1. Agitar suavemente y centrifugar brevemente DreamTaq Green Mezcla maestra de PCR (2X) después de descongelar.
2. Colocar un tubo de PCR de pared delgada en hielo y agregue el siguientes componentes para cada reacción de 12  $\mu\text{L}$ :

<b>DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)</b>	6.25 $\mu\text{L}$
<b>Primer Forward</b>	0.5 $\mu\text{L}$
<b>Primer Reverse</b>	0.5 $\mu\text{L}$
<b>cDNA</b>	1 $\mu\text{L}$
<b>Agua libre de nucleasas</b>	3.25 $\mu\text{L}$
<b>Volumen total</b>	12 $\mu\text{L}$

3. Realizar la PCR utilizando el termociclador con las condiciones deseadas.
4. Mantener las muestras en hielo para cargar los geles de agarosa.

Anexo 4. Valores de expresión relativa.

Expresión Relativa=unidad de expresión del gen de interés/unidad de expresión del gen constitutivo														
Exp.	Experimento	Tratamiento	Réplicas	EF1a	AOC	PRI		ACCO		ERP1		PtoR1		
				Valor promedio	Valor promedio	Exp. Rel.	Valor promedio	Exp. Rel.	Valor promedio	Exp. Rel.	Valor promedio	Exp. Rel.	Valor promedio	Exp. Rel.
3,3	1	Control	1	1.3427	1.0434	0.77709094	2.5634	1.9091383	1.9278	1.43576376	0.8683	0.64668206	1.0613	0.79042228
3,3	1	DC3000	2	1.4083	0.962	0.68309309	2.0178	1.43279131	2.3923	1.69871476	0	0	0	0
3,3	1	NP+DC3000	3	1.2837	0.6944	0.54093636	0.8476	0.66027888	1.6072	1.25200592	0	0	0	0
3,3	1	AS+DC3000	4	1.3553	1.0287	0.75902014	1.2648	0.93322512	1.7468	1.28886593	0.8613	0.63550505	1.0754	0.79347746
3,3	2	Control	5	1.308	0.8565	0.65481651	1.7372	1.32813456	1.5965	1.22056575	0.821	0.62767584	1.1085	0.84747706
3,3	2	DC3000	6	1.208	0.7771	0.6432947	1.6062	1.32963576	1.4056	1.16357616	0	0	0	0
3,3	2	NP+DC3000	7	1.2148	0.8123	0.66866974	2.1192	1.74448469	1.6323	1.34367797	0.7846	0.64586763	1.0486	0.86318736
3,3	2	AS+DC3000	8	1.1727	0.7881	0.67203888	1.696	1.44623518	1.5622	1.33213951	0	0	0	0
3,3	3	Control	9	1.1352	0.8667	0.7634778	1.2257	1.07972163	1.6666	1.46811135	0.9331	0.8219697	1.2455	1.0971635
3,3	3	DC3000	10	1.2016	1.0949	0.9120173	1.1828	0.98435419	1.7789	1.48044274	0.9733	0.81000333	1.2396	1.0316245
3,3	3	NP+DC3000	11	1.2059	1.0223	0.84774857	1.0663	0.88423584	1.9154	1.58835724	1.1118	0.921967	1.2916	1.07106725
3,3	3	AS+DC3000	12	1.1568	0.8028	0.6939834	0.9064	0.7835408	1.3937	1.20478907	1.0843	0.93732711	0	0

## Anexo 5. Síntesis de cDNA

mRNA	10µL
5xTransAmpBuffer	4µL
Reverse transcriptase	1µL
Agua libre de ADNasa y RNAsa	10µL
Total	25µL

## Anexo 6. ANOVA

### Análisis de la varianza ACCO

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Exp.Relativa	12	0.17	0.00	14.52

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.06	3	0.02	0.53	0.6753
Tratamiento	0.06	3	0.02	0.53	0.6753
Error	0.33	8	0.04		
Total	0.39	11			

### Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.38129

Error: 0.0410 gl: 8

Tratamiento	Mediasn	E.E.
AS+PS	1.28 3	0.12 A
NAAS+PS	1.39 3	0.12 A
C+PS	1.45 3	0.12 A
Control	1.46 3	0.12 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Análisis de la varianza PR1

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Exp.Relativa	12	0.17	0.00	34.21

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.27	3	0.09	0.53	0.6728
Tratamiento	0.27	3	0.09	0.53	0.6728
Error	1.37	8	0.17		
Total	1.64	11			

### Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.77902

Error: 0.1712 gl: 8

Tratamiento	Mediasn	E.E.
AS+PS	1.05 3	0.24 A

NAAS+PS	1.10	3	0.24	A
C+PS	1.25	3	0.24	A
Control	1.44	3	0.24	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

### Análisis de la varianza ERPI

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Exp.Relativa	12	0.17	0.00	82.00

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.28	3	0.09	0.55	0.6639
Tratamiento	0.28	3	0.09	0.55	0.6639
Error	1.37	8	0.17		
Total	1.65	11			

### Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.77800

*Error: 0.1707 gl: 8*

Tratamiento	Mediasn	E.E.
C+PS	0.27	3 0.24 A
NAAS+PS	0.52	3 0.24 A
AS+PS	0.52	3 0.24 A
Control	0.70	3 0.24 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*

### Análisis de la varianza AOC

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Exp.Relativa	12	0.06	0.00	18.02

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	3	2.6E-03	0.16	0.9230
Tratamiento	0.01	3	2.6E-03	0.16	0.9230
Error	0.14	8	0.02		
Total	0.14	11			

### Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.24482

*Error: 0.0169 gl: 8*

Tratamiento	Mediasn	E.E.
NAAS+PS	0.69	3 0.08 A
AS+PS	0.71	3 0.08 A
Control	0.75	3 0.08 A
C+PS	0.75	3 0.08 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )*



### Análisis de la varianza PTO

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Exp.Relativa	12	0.30	0.04	88.32

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo		0.79	3	0.26	1.15	0.3853
Tratamiento		0.79	3	0.26	1.15	0.3853
Error		1.83	8	0.23		
Total	2.62	11				

### Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=0.89989

Error: 0.2284 gl: 8

Tratamiento	Mediasn	E.E.
AS+PS	0.26 3	0.28 A
C+PS	0.34 3	0.28 A
NAAS+PS	0.64 3	0.28 A
Control	0.91 3	0.28 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Análisis de la varianza UFC/g

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
UFC/g	36	0.38	0.32	91.33

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo		5286740.78	3	1762246.93	6.41	0.0016
Tratamiento		5286740.78	3	1762246.93	6.41	0.0016
Error		8796325.04	32	274885.16		
Total	14083065.83	35				

### Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=503.43824

Error: 274885.1576 gl: 32

Tratamiento	Medias	n	E.E.
Control	45.28 9	174.76	A
AS+PS	536.43 9	174.76	A B
NAAS+PS	587.11 9	174.76	B
Control+PS	1127.44	9	174.76 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )



