

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE BOTÁNICA**

**RESPUESTA ANTIOXIDANTE AL TRATAMIENTO CON  
ÁCIDO SALICÍLICO EN PLANTAS DE PAPA INFECTADAS  
CON FITOPLASMA**

**SILVIA SÁNCHEZ ROJO**

**T E S I S**

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

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2010**

La presente tesis titulada: RESPUESTA ANTIOXIDANTE AL TRATAMIENTO CON ÁCIDO SALICÍLICO EN PLANTAS DE PAPA INFECTADAS CON FITOPLASMA, realizada por la alumna: SILVIA SÁNCHEZ ROJO bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

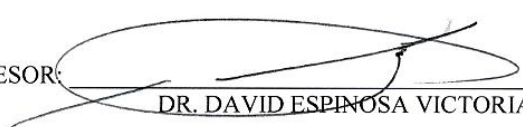
**MAESTRA EN CIENCIAS**

**BOTÁNICA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:   
DRA. HILDA ARACELI ZA VALETA MANCERA

DIRECTOR:   
DR. HUMBERTO ANTONIO LÓPEZ DELGADO

ASESOR:   
DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2010.

# RESPUESTA ANTIOXIDANTE AL TRATAMIENTO CON ÁCIDO SALICÍLICO EN PLANTAS DE PAPA INFECTADAS CON FITOPLASMA

Silvia Sánchez Rojo, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010

## RESUMEN

Durante un ataque patogénico en las células vegetales ocurre sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Esto provoca estrés oxidativo y daño fisiológico. Las plantas toman ventaja de estas moléculas reactivas para desarrollar estrategias que conducen a la autoprotección contra el ataque patogénico. Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular que habitan el floema de las plantas y disminuyen el rendimiento, la calidad de los tubérculos y el valor comercial de las cosechas, entre otros daños. El ácido salicílico (AS) activó la respuesta de defensa de plantas de papa contra el ataque del fitoplasma, redujo los síntomas de la infección, favoreció la translocación de fotosintetizados e incrementó la calidad de los tubérculos. El AS indujo efectos a corto y largo plazo y fue igualmente eficiente en dos formas de aplicación: primero en cultivo *in vitro* y posterior trasplante o asperjado directamente en condiciones de invernadero. Bajos niveles de AS exógeno (0.1 y 0.001 mM) mostraron mayor actividad biológica. La reducción de daño estuvo asociada con alto contenido de peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico, lo que sugiere una función importante del AS en la regulación de éstas moléculas y contrarresta los efectos dañinos del patógeno.

**Palabras clave:** estrés biótico, punta morada de la papa, actividad antioxidante, especies reactivas de oxígeno.

**ANTIOXIDANT RESPONSE TO TREATMENT WITH SALICYLIC ACID ON  
POTATO PLANTS INFECTED BY PHYTOPLASMA**

Silvia Sánchez Rojo, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010

**ABSTRACT**

During a pathogen attack, the cell triggers the overproduction of reactive oxygen species. This causes oxidative stress and physiological damage. Plants take advantages of these reactive molecules, developing strategies that enable them protection against pathogen attack. Phytoplasma are bacteria lacking cell wall that inhabit plants phloem and reduce the yield, tubers quality and the market value of the harvest among other damages. Salicylic acid (SA) activated the plant defense response in potato against phytoplasma attack, reduced infection symptoms, favored photosynthates translocation and improved the quality of tubers. SA induced effects at short and long term and it was equally efficient when it was first applied on *in vitro* culture followed of transplanting or directly sprayed on greenhouse conditions. Low levels of exogenous SA (0.1 and 0.001 mM) showed higher biological activity. The reduction of damage was associated to high hydrogen peroxide and ascorbic acid contents, suggesting an important role of SA on the regulation of these molecules and counteracting the pathogen effects.

**Key words:** biotic stress, potato purple top, antioxidant activity and oxygen reactive species.

**A Guadalupe, Lidia Yaratzy y Joshua Xavier por llenar de alegría y amor a toda mi familia, con cariño.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Laboratorio de Fisiología-Biotecnología del Programa Nacional de Papa (INIFAP) en Metepec, Estado de México y todas las personas que lo integran por contribuir a mi desarrollo profesional y parte de mi formación científica.

Al Colegio de Postgraduados por ser la institución en donde adquirí las bases necesarias para desempeñar mis funciones, como estudiante, de manera concreta, objetiva y competente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología COMECyT por la beca otorgada para Tesis de posgrado.

A mi consejo particular: Dra. Hilda, Dr. David y Dr. Humberto por sus aportaciones y apoyo en el proceso de elaboración y presentación de esta tesis.

A toda mi familia (especialmente a mis padres) por su apoyo incondicional y comprensión en todo momento.

A Eric Eugenio López Vera darle alegría a mi vida y motivar mis anhelos.

## CONTENIDO

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes.....	3
2.1	Síndrome de punta morada de la papa.....	3
2.2	Aspectos biológicos de la interacción fitoplasmas-papa-vectores.....	4
2.2.1	<i>Solanum tuberosum</i> L. ....	4
2.2.2	‘ <i>Candidatus</i> Phytoplasma’.....	5
2.2.3	Vectores .....	6
2.2.4	Adaptaciones fitoplasma-vector: principal mecanismo de transmisión.....	7
2.2.5	Técnicas tradicionales para el estudio de fitoplasmas .....	8
2.3	Defensa de las plantas contra patógenos.....	10
2.3.1	Mecanismos de reconocimiento.....	11
2.3.2	Mecanismos de defensa.....	12
2.4	El ácido salicílico en plantas.....	16
2.4.1	Propiedades y biosíntesis.....	16
2.4.2	Metabolismo y transporte.....	17
2.4.3	AS en procesos metabólicos y fisiológicos .....	18
2.4.4	Relación del ácido salicílico con el sistema antioxidante .....	18
2.4.5	El AS como protector durante infecciones patogénicas .....	19
3	Objetivos.....	21
3.1	Objetivo general.....	21
3.2	Objetivos particulares.....	21
4	Hipótesis.....	22
5	Materiales y métodos.....	23
5.1	Material vegetal.....	23
5.2	Detección de fitoplasmas.....	23
5.3	Establecimiento de experimentos.....	24
5.3.1	Mantenimiento de las microplantas de papa.....	24
5.3.2	Tratamientos <i>in vitro</i> (experimento 1).....	24
5.3.3	Tratamientos en invernadero (experimento 2).....	25

5.4	Análisis de síntomas.....	25
5.5	Análisis de acumulación de biomasa.....	25
5.6	Contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y actividad antioxidante.....	27
5.6.1	Determinación del contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	27
5.6.2	Determinación de actividad peroxidasa.....	28
5.6.3	Determinación del contenido de ascorbato.....	28
5.7	Diseño experimental.....	29
5.8	Análisis estadísticos.....	29
6	Resultados.....	30
6.1	Detección de fitoplasma (PCR anidada).....	30
6.2	Tratamientos <i>in vitro</i> (experimento 1).....	31
6.2.1	Análisis de síntomas.....	31
6.2.2	Análisis de acumulación de biomasa.....	33
6.2.3	Análisis enzimático y antioxidante.....	35
6.3	Tratamientos en invernadero (experimento 2).....	40
6.3.1	Análisis de síntomas.....	40
6.3.2	Análisis de acumulación de biomasa.....	42
6.3.3	Análisis enzimático y antioxidante.....	44
7	Discusión.....	49
7.1	Reducción de síntomas.....	49
7.2	Eficiencia en la acumulación de biomasa.....	51
7.3	Optimización de la actividad enzimática y antioxidante.....	54
8	Conclusiones.....	59
9	Literatura citada.....	60



## CUADROS Y FIGURAS

### Cuadros

Cuadro 1	Rendimiento de plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, previamente tratadas ( <i>in vitro</i> ) con AS por 30 d.....	34
Cuadro 2	Calidad de minitubérculos de plantas de papa cultivadas en invernadero previamente tratadas ( <i>in vitro</i> ) con AS por 30 d.....	34
Cuadro 3	Parámetros de crecimiento en plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, previamente tratadas ( <i>in vitro</i> ) con AS por 30 d.....	35
Cuadro 4	Rendimiento de plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, asperjadas con AS cada tercer día durante el cultivo.....	43
Cuadro 5	Calidad de minitubérculos en plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, asperjadas con AS cada tercer día durante el cultivo.....	43
Cuadro 6.	Parámetros de crecimiento en plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, asperjadas con AS cada tercer día durante el cultivo.....	44

### Figuras

Figura 1	Productos de amplificaciones de la PCR anidada .....	30
Figura 2	Altura de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, previamente tratadas <i>in vitro</i> con AS durante 30 d .....	31
Figura 3	Longitud de entrenudos de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, previamente tratadas ( <i>in vitro</i> ) con AS durante 30 d.....	32
Figura 3	Grosor de entrenudos de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, previamente tratadas ( <i>in vitro</i> ) con AS durante 30 d.....	32
Figura 5	Efecto del AS sobre el porcentaje de tubérculos pardeados en plantas de papa de 90 días de crecimiento en invernadero, previamente tratadas ( <i>in vitro</i> ) con AS durante 30 d.....	33
Figura 6	Contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante 90 días de desarrollo en plantas de papa cultivadas en invernadero por 90 d, previamente tratadas 30 d ( <i>in vitro</i> ) con AS.....	36
Figura 7	Actividad POX durante 90 días de desarrollo en plantas de papa cultivadas en invernadero por 90 d, previamente tratadas 30 d ( <i>in vitro</i> ) con AS.....	36

Figura 8	Contenido de ascorbato reducido y oxidado durante 90 días de desarrollo en plantas de papa cultivadas en invernadero por 90 d, previamente tratadas 30 d ( <i>in vitro</i> ) con AS.....	38
Figura 9	Contenido total de ascorbato (AA+DHA) durante 90 días de desarrollo en plantas de papa cultivadas en invernadero por 90 d, previamente tratadas 30 d ( <i>in vitro</i> ) con AS.....	39
Figura 10	Altura de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, asperjadas con AS cada tercer día durante su cultivo.....	40
Figura 11	Longitud del sexto entrenudo a partir de la base de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, asperjadas con AS cada tercer día durante su cultivo.....	41
Figura 12	Grosor del sexto entrenudo a partir de la base de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, asperjadas con AS cada tercer día durante su cultivo.....	41
Figura 13	Porcentaje de tubérculos pardeados en plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, asperjadas con AS cada tercer día durante su cultivo.....	42
Figura 14	Efecto del AS sobre el contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en plantas de papa asperjadas cada tercer día durante su desarrollo en invernadero.....	45
Figura 15	Efecto del AS sobre la actividad POX en plantas de papa durante 90 días de desarrollo en invernadero.....	45
Figura 16	Contenido de ascorbato reducido y oxidado durante 90 días de desarrollo en invernadero en plantas de papa asperjadas con AS cada tercer día...	47
Figura 17	Contenido total de ascorbato (AA +DHA) durante 90 días de desarrollo en invernadero. Aspersiones con ácido salicílico cada tercer día durante el cultivo en invernadero.....	48

## INTRODUCCIÓN

La producción de papa es una actividad económica muy importante a nivel mundial. Es el cuarto cultivo básico, después del maíz, trigo y arroz y produce mayor cantidad de materia seca y proteínas por hectárea que los cultivos de cereales principales (Ferne y Willmitzer, 2001). Sin embargo, existen diversos factores que limitan la rentabilidad de este cultivo, tal es el caso del síndrome de punta morada, conjunto de síntomas desarrollados por el ataque de fitoplasmas (organismos pleomórficos sin pared celular que habitan el floema de las plantas; Lee *et al.*, 2004). Este problema se presenta en las principales zonas paperas de México. Disminuye el rendimiento y la calidad comercial de la semilla-tubérculo en un rango de 30 a 95%. Durante los años 2003 y 2004, la incidencia de punta morada se incrementó notablemente, con pérdidas hasta del 100% en algunas áreas productoras como Coahuila y Nuevo León (Leyva *et al.*, 2002). Actualmente las medidas empleadas para combatir la enfermedad no han sido eficientes. Los estudios realizados para la comprensión de mecanismos de patogenicidad de fitoplasmas son limitados y la incapacidad de reproducir fitoplasmas *in vitro* ha obstaculizado su caracterización a nivel molecular.

En las plantas algunos metabolitos como el ácido salicílico y el peróxido de hidrógeno están involucrados en el establecimiento de resistencia sistémica adquirida (RSA) para la activación de genes de defensa y producción de barreras físicas después del ataque de algún patógeno (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007). En este contexto, algunos autores reportan que la aplicación exógena de ácido salicílico ó ácido acetil-salicílico en plantas infectadas por diversos patógenos (virus, bacterias y hongos) induce la expresión de genes PR (relacionados con la patogénesis) y promueve la resistencia (Murphy *et al.*, 2001). Además es vasto el conocimiento sobre el efecto de la aplicación exógena de ácido salicílico en diversas especies

vegetales en procesos de productividad, crecimiento, fotosíntesis, relaciones hídricas y actividad enzimática en plantas expuestas a varios tipos de estrés biótico y abiótico (Hayat *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se hizo una revisión de los mecanismos a través de los cuales el fitoplasma actúa en la planta generando una serie de síntomas, que repercuten en la producción del tubérculo. Se evaluó el efecto del AS en la disminución de síntomas causados por fitoplasmas, así como la respuesta fisiológica de la planta en los procesos de acumulación de biomasa y actividad enzimática–antioxidante.

## 1. ANTECEDENTES

### 2.1 Síndrome de punta morada de la papa

La punta morada de la papa (PMP) es una amenaza seria para la producción de papa en América, Europa, Asia y Australia (Maramorosch, 1998). Los síntomas en campo son achaparramiento de la planta, enrollamiento apical, entrenudos cortos, coloración purpúrea en los foliolos, clorosis, proliferación de brotes axilares engrosados en la base y formación de tubérculos aéreos. Los tubérculos presentan diferentes grados de pardeamiento en su parte interna y producen brotes anormales (finos, débiles o ausentes) aunque en algunas variedades se presentan brotes aparentemente normal (INIFAP, 2000; Lee *et al* 2000).

La alteración del equilibrio hormonal en las plantas infectadas por fitoplasmas se manifiesta como cambios en la morfogénesis normal de la especie. Algunos estudios indicaron que los niveles endógenos de fitohormonas en las plantas hospederas son responsables de la inducción de síntomas como la virescencia o filodia (Chang y Lee, 1995; Davey *et al.*, 1981). Smart y Kirkpatrick (1996) y He *et al* (1998) propusieron que la expresión diferencial de genes puede ser responsable de inducir la virescencia y filodia en las plantas durante los estadios tempranos de la infección por fitoplasmas.

Los síntomas observados varían dependiendo de ciertos factores como son: la variedad, órgano de la planta afectado, estado fenológico del cultivo, origen y tiempo de inicio de la infección, así como las condiciones ambientales del cultivo (Martínez-Soriano *et al.*, 2007).

## 2.2 Aspectos biológicos de la interacción fitoplasmas-papa-vectores

### 2.2.1 *Solanum tuberosum* L.

*Solanum tuberosum* L. pertenece a la familia Solanaceae. Es una planta herbácea, dicotiledónea, provista de un sistema subterráneo de naturaleza rizomatosa del cual se originan los tubérculos. El juego cromosómico de la papa es de  $n=12$ . Puede ser clasificada en niveles de ploidía. Las células somáticas de las especies cultivadas pueden variar entre el nivel diploide y pentaploide siendo tetraploides ( $4n=48$ ) las subespecies *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* y *Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* (Alonso, 2002).

Sus raíces son fibrosas, muy ramificadas, finas y largas. El tallo es grueso, fuerte y anguloso, al principio erguido y con el tiempo se extiende hacia el suelo, puede alcanzar una altura entre 0.5 y 1 m, esto depende de la variedad. Presenta un color verde pardo debido a los pigmentos antocianinicos asociados a la clorofila. Los rizomas son tallos subterráneos con raíces adventicias que producen unos hinchamientos ovales o redondeados denominados tubérculos. Los tubérculos son los órganos comestibles de la papa. Están formados por tejido parenquimático, donde se acumulan las reservas de almidón. En las axilas del tubérculo se sitúan las yemas de crecimiento llamadas “ojos”, dispuestas en espiral sobre la superficie del tubérculo de las cuales se puede originar un tallo (Alonso, 2002).

Las hojas son compuestas y con foliolos primarios, secundarios e intercalares. La nervación de los foliolos es reticulada. Las inflorescencias son cimosas, están situadas en la extremidad del tallo y sostenidas por un escapo floral. Es una planta autógama, siendo su androesterilidad muy frecuente, a causa del aborto de los estambres o del polen según las condiciones climáticas. Las flores tienen la corola gamopétala rotada y de acuerdo a la variedad

puede ser de color blanco, rosado o violeta. Los frutos son bayas redondeadas de color verde con un diámetro de 1 a 3 cm., que se tornan amarillos al madurar (CIP, 2004).

### **2.2.2 `Candidatus Phytoplasma`**

Los fitoplasmas son considerados como agentes causales de más de 300 enfermedades en cientos de especies de plantas (Chang, 1998). En la papa se han reportado varias enfermedades producidas por estos organismos, tales como enrollamiento púrpura del ápice (PTR), flavescencia marginal (MF), escoba de brujas (WB), filodia de la papa (PP), marchitez de la punta morada (PTW) y "stolbur". Las características comunes entre estas enfermedades en rango de huéspedes, síntomas, tipo de vectores y eficiencia de transmisión sugieren que son causadas por fitoplasmas relacionados genéticamente (Salazar, 1996).

Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular que se agrupan en la clase Mollicutes, habitan en los tubos cribosos del floema y en raras ocasiones en células del parénquima floemático de las plantas infectadas y causan enfermedades en cientos de especies vegetales de todo el mundo (Liefting *et al.*, 2004). En México Almeyda *et al.* (1999) y Leyva *et al.* (2002) registraron al menos dos tipos diferentes de fitoplasmas asociados con los síntomas de la PMP.

Estos organismos se caracterizan por el pequeño tamaño de su genoma (300-1185 kb), con un bajo contenido de las bases nitrogenadas guanina y citocina. Los fitoplasmas se transmiten mediante insectos que se alimentan de la savia de las plantas (McCoy *et al.*, 1989; Kirkpatrick, 1992). Cuando se observan en el microscopio electrónico de transmisión, aparecen como organismos pleomórficos de redondeados a filamentosos, con un diámetro de 200-800 nm. Los cuerpos de los fitoplasmas contienen un enrejado fibrilar de hebras, que se supone son ADN, y áreas con gránulos semejantes a ribosomas. Son los procariontes más pequeños capaces de

replicación autónoma (Lee *et al.* 2000). El genoma del fitoplasma carece de varios genes metabólicos importantes, como el gen de la ATP sintasa, que posiblemente es el resultado de la reducción de su evolución durante la adaptación a un entorno rico en nutrientes (Christensen *et al.*, 2005).

En 2004, el grupo Taxonómico de trabajo Fitoplasma/Spiroplasma del IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology) propuso clasificar a los fitoplasmas dentro del género '*Candidatus* Phytoplasma' (Firrao *et al.*, 2005; IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group, 2004).

### **2.2.3 Vectores**

Las especies de plantas que pueden ser infectadas por un tipo de fitoplasma en la naturaleza están en función del número de especies de insectos vectores que son capaces de transmitirlo y por el tipo de vectores que se trate (monofagos, oligofagos o polífagos). Hasta ahora los vectores reconocidos de fitoplasmas son principalmente “chicharritas”, insectos libadores pertenecientes a las familias Cicadellidae y Fulgoridea (Lee *et al.*, 1998). Estos insectos se alimentan de la savia de las plantas y al hacerlo adquieren o inoculan a los fitoplasmas (Martínez –Soriano *et al.*, 2007).

Más de 130 especies de insectos han sido reconocidas como vectores de fitoplasmas. Sin embargo, en papa no más de 12 han sido reportadas (Salazar, 1996). Algunas especies son: *Macrostelus orientalis*, *M. Mascifrons*, *M. Striifrons*, *Scleroracus flavopictus*, *Orosius albicinctus* y *Alebroides dravidamus* (Maramorosch, 1998). *Empoasca*, *Aceratagallia* y la especie *Bactericera cockerelli* son vectores de fitoplasmas en México (Almeyda *et al.*, 2004; Garzón *et al.*, 2004).



Los fitoplasmas son organismos que, en relación con su vector, son considerados patógenos transmitidos en forma persistente; por lo tanto requieren de largos periodos de adquisición. La gran mayoría son transmitidos en periodos de 2 a más de 30 días de adquisición, aunque algunas variantes del amarillamiento del áster pueden ser transmitidas entre 8 y 24 horas. En todos los casos hasta ahora estudiados, los vectores de fitoplasmas requieren de un periodo de incubación (desde la adquisición hasta la transmisión). Este varía, dependiendo del fitoplasma, entre 10 y 35 días (Salazar, 1996).

#### **2.2.4 Adaptaciones fitoplasma-vector: principal mecanismo de transmisión**

Varios estudios han demostrado que los fitoplasmas son propagativos en su vector y pueden inducir cambios benéficos y detrimentales en ellos. Estos organismos pueden persistir en el insecto hasta 88 días en algunos casos. Durante este tiempo los insectos pueden transmitir el fitoplasma (Salazar, 1996). En el primer paso de infección del insecto vector, el fitoplasma contenido en la savia del floema, pasa a través del estilete, atraviesa la pared del tracto intestinal, se multiplica en la hemolinfa y se propaga sistémicamente. Posteriormente, los fitoplasmas entran en una glándula salival, donde se siguen multiplicando. Cuando el insecto se alimenta de la savia de otra planta, los fitoplasmas salen de la glándula a la saliva y se transmiten por todo el floema (Suzuki *et al.*, 2006).

Debido a que los fitoplasmas son parásitos intracelulares sus proteínas de membrana deben interactuar directamente con el citoplasma de la planta huésped y de las células de insectos. Estas proteínas deben desempeñar acciones importantes en la interacción huésped-fitoplasma (Shen y Lin, 1993). Estudios anteriores demostraron que una proteína inmunodominante (antigénica) de membrana (amp) constituye la mayor porción de las proteínas

de membrana en muchos fitoplasmas. Algunos autores proponen que la amp es importante en la interacción huésped-fitoplasma ya que contienen una secuencia que funciona como un ligando para otras proteínas (Barvara *et al.*, 2002; Kakizawa *et al.*, 2004). Por ejemplo, Suzuki *et al* (2006) observaron que la especificidad del insecto vector- phytoplasma está determinada por la interacción intracelular entre una serie de proteínas estructurales (microfilamentos) y una proteína bacteriana (amp) de superficie y no por la afinidad entre estructuras de superficie parásito-hospedero.

Dentro del insecto vector, los fitoplasmas se localizan principalmente en las células que rodean el tracto intestinal. Las amp forman un complejo con la actina y la miosina, proteínas constituyentes de los órganos musculares del insecto y la interacción de las amp con el complejo de microfilamentos (AM) del tracto intestinal del insecto desempeña un papel determinante para la transmisibilidad del fitoplasma. La formación del complejo amp-microfilamentos intestinales es necesario para cruzar las barreras dentro del insecto (Suzuki *et al.*, 2006).

### **2.2.5 Técnicas tradicionales para el estudio de fitoplasmas**

Regularmente los fitoplasmas en plantas infectadas se presentan en cantidades muy bajas y su distribución en el hospedero no es uniforme; por tal motivo, su identificación y clasificación es difícil. Los métodos tradicionales de detección de fitoplasmas usan la sintomatología conocida asociada con la cepa en cuestión, y la microscopía para localizar los organismos. Poghosyan y Lebsky (2009) proponen que la microscopía electrónica de barrido es una herramienta para el diagnóstico de fitoplasmas en el floema de plantas infectadas por su alta resolución, la capacidad de mostrar las estructuras en tres dimensiones y ser una técnica rápida y precisa.

En la década de los 80, el desarrollo de sondas moleculares tales como anticuerpos mono y policlonales y DNA clonado específico para fitoplasmas, dio un gran impulso al diagnóstico de las enfermedades ocasionadas por fitoplasmas (Kuboyama *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1998). Las pruebas serológicas como ELISA y microscopía de inmunofluorescencia, permitieron la detección e identificación de cepas de fitoplasmas específicos. Hibridaciones de tipo dot y southern usando sondas de DNA clonado permitieron el estudio de relaciones genéticas entre estos patógenos, dando como resultado el reconocimiento de varios grupos y subgrupos (Martínez –Soriano *et al.*, 2007).

Actualmente, los sistemas de clasificación basados en técnicas moleculares han reemplazado a la taxonomía biológica tradicional. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una herramienta que permite una detección rápida y sencilla con alto nivel de sensibilidad para el diagnóstico de plantas e insectos vectores. (Lee *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 1998).

Debido a que los fitoplasmas se localizan en los tubos del floema, su concentración en las plantas infectadas es baja. Por este motivo se han adaptado procedimientos para extraer y enriquecer el DNA del fitoplasma tales como centrifugación convencional con cloruro de cesio (CsCl) y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Sin embargo, el ADN obtenido a partir de dichos métodos contiene frecuentemente ADN de la planta hospedera por lo que otra de las técnicas de purificación utilizada en estos procedimientos es la supresión de extracción por hibridización (SSH) y la selección de orientación en espejo (MOS; Tran-Nguyen y Gibb, 2007).

La SSH es una técnica que permite la identificación de secuencias que están presentes en un genoma, y no otro. La amplificación de enrollamiento en círculo (RCA) también se utiliza

para generar grandes cantidades de ADN, en organismos difíciles de cultivar y que típicamente se encuentran en bajas concentraciones. Es útil para amplificar genomas circulares (Dean *et al.*, 2001; Detter *et al.*, 2002). PFGE es el único método que puede utilizarse para separar físicamente y estimar el tamaño de todo un cromosoma de fitoplasma (Tran-Nguyen y Gibb, 2007).

### **2.3 Defensa de las plantas contra patógenos**

A lo largo de la evolución las plantas se han ido adaptando al ambiente y a las interacciones biológicas con otros organismos. La resistencia a enfermedades es una de las adaptaciones más importantes y complejas, involucra la generación de barreras físicas, químicas y metabólicas cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección.

Los mecanismos de defensa constitutivos de la planta proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Estos pueden ser: a) físicos (estructurales) como la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas y deposición de ceras que impiden la penetración de patógenos y luego su distribución en los tejidos; ó b) químicos que involucra la producción y acumulación de sustancias tóxicas para los patógenos y cambios en las condiciones normales de la planta (como el pH). A diferencia de la defensa constitutiva, la resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que se activa solamente como una reacción al ataque de un patógeno e involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno. Estos mecanismos de defensa también ocurren cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés abiótico (Madriz-Ordeñana, 2002).

La resistencia a enfermedades producidas por hongos, bacterias y virus depende de que la planta sea capaz de reconocer al patógeno al inicio del proceso de infección. Los eventos de reconocimiento conducen a una necrosis rápida del tejido en el sitio de ataque, fenómeno que es llamado respuesta hipersensitiva (RH). Los mecanismos inducidos en el sitio de infección y asociados con la RH incluyen la síntesis de enzimas hidrolíticas, síntesis de compuestos antimicrobianos llamados fitoalexinas y alteraciones en la síntesis de proteínas estructurales de la pared celular (Camarena-Gutiérrez, 2006). La activación de la defensa en plantas supone la existencia de mecanismos de reconocimiento mediante los cuales la planta determina la presencia del patógeno. Ciertas sustancias como carbohidratos, proteínas y pequeñas moléculas inorgánicas son capaces de actuar como “*inductores*” de defensa (Madriz-Ordeñana, 2002).

### **2.3.1 Mecanismos de reconocimiento**

Las interacciones planta-patógeno, particularmente las que involucran organismos biótros, están gobernadas por interacciones específicas entre patógenos con genes *avr* de avirulencia y sus correspondientes genes R (de resistencia) en las plantas. Cuando los genes R y *avr* están presentes en el hospedante y el patógeno existe una interacción incompatible, la consecuencia es la resistencia a la enfermedad. Si la interacción es compatible, se debe a que cualquiera de los genes está ausente o inactivo y el resultado es la enfermedad. Este modelo de interacción específica hospedante-patógeno, que describe las respuestas de defensa inducidas en plantas ha sido influenciado por las interacciones gen a gen. El modelo más simple que explica esta interacción requiere que los productos del gen R reconozcan las señales que dependen del gen *avr* y disparen la cadena de eventos de transducción de señales que culminan en la activación de mecanismos de defensa y detienen el crecimiento del patógeno (Camarena-Gutiérrez, 2006). Los genes R no son responsables directos de la resistencia, pero sí tienen una función

determinante de especificidad del reconocimiento, actuando como iniciadores de la defensa (De Wit, 1997).

### **2.3.2 Mecanismos de defensa**

Los mecanismos de defensa, que son inducidos como consecuencia del reconocimiento, son los responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen principalmente la muerte celular por reacción hipersensitiva, la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobina, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno, entre otros.

#### El estallido oxidativo

El estallido oxidativo es una respuesta muy rápida y transitoria que involucra la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en grandes cantidades y la activación de enzimas preexistentes como respuesta a la invasión por un agente patógeno. Ocurre en dos fases, una inicial, que sucede minutos después de la adición del patógeno, y una secundaria, que comienza de una a tres horas después que la fase inicial ha terminado. Ambas fases involucran sustratos y vías de inducción similares pero se regulan de manera independiente. La fase I es una reacción biológicamente no específica, mientras que la fase II del estallido depende de la expresión *avr* en la interacción planta-patógeno y la expresión del grupo de genes *Hrp* o genes de la respuesta hipersensitiva y patogenicidad (Camarena-Gutiérrez, 2006).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son radicales libres que se producen en las plantas mediante procesos ligados a un incremento ó disipación en la energía de excitación.

Éstos incluyen al oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Las ERO pueden actuar directamente contra el patógeno causando su muerte, retrasan la infección mediante la construcción de barreras mecánicas y actúan como moléculas señal que activan la respuesta de defensa de las plantas. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  actúa como una señal para la muerte localizada de células durante la respuesta hipersensitiva (Martínez *et al.*, 2000) y como una señal difusible en la inducción de genes de protección en células y tejidos sanos adyacentes (Levine *et al.*, 1994). Además, obstaculiza la penetración del microorganismo en los tejidos vegetales debido a que contribuye al reforzamiento de la pared celular y facilita las reacciones de las peroxidasas mediante la catálisis intra e intermolecular de enlaces cruzados entre los componentes estructurales de las paredes celulares y la polimerización de lignina (Ros Barceló, 1997). El consecuente incremento en las barreras mecánicas retrasa la penetración del patógeno y permite la organización de defensas vegetales que requieren más tiempo para su activación. Como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una molécula difusible en las membranas biológicas, actúa además como una señal intracelular que es capaz de activar mecanismos de defensa (Durner *et al.*, 1997).

#### Respuesta hipersensitiva (RH).

La muerte del tejido hospedante, causada por el ataque del patógeno o por la respuesta hipersensitiva, libera componentes de la pared celular vegetal que inducen la activación de defensa en tejidos adyacentes (Madriz-Ordeñana, 2002). Se caracteriza por disturbios metabólicos como flujo iónico a través de la membrana plasmática (influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , eflujo de  $\text{Cl}^-$ ), cambios en el pH y despolarización de la membrana. La muerte celular que ocurre durante la RH es un tipo de muerte celular programada, requiere de generación y consumo de ATP así como la expresión *de novo* de genes y síntesis de proteínas (De Gara, 2003).

La reacción hipersensitiva está asociada con la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa incluyendo la acumulación de fitoalexinas; deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida (RSA; Ryals *et al.*, 1996).

Para inducir la muerte celular programada en la planta hospedera se requiere la producción simultánea de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y óxido nítrico durante la respuesta hipersensitiva, además este último compuesto parece actuar independientemente en la inducción específica de genes responsables de la síntesis de metabolitos de defensa (Delledone *et al.*, 1998).

Producción de fitoalexinas.

Las fitoalexinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos y condiciones adversas (estrés abiótico). Éstas poseen propiedades antimicrobianas y normalmente se encuentran en niveles basales muy bajos en las plantas sanas pero su acumulación se incrementa después del ataque de un patógeno o algún daño mecánico (Paxton 1981). Se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan con la HR. La producción de fitoalexinas se asocia con la inducción de una serie de genes que codifican para enzimas específicas responsables de su síntesis. Algunas de éstas son la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI) (Madriz-Ordeñana, 2002).



Formación de barreras estructurales.

La lignificación puede ocurrir de forma localizada en los tejidos atacados por patógenos. La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica; además, la lignina es resistente a la degradación por patógenos (Nicholson y Hammerschmidt 1992). Otro tipo de barrera se forma cuando las proteínas ricas en hidroxiprolina ("HRGP" hydroxyproline-rich glycoproteins"), se acumulan alrededor de los sitios de ataque del patógeno evitando su penetración. Las papilas, otro tipo de barrera física, se producen por modificaciones de las células de la epidermis, están compuestas principalmente de calosa ( $\beta$ -1,3-glucano) y se asocian con la resistencia porque evitan la penetración de hongos (Skalamera *et al.* 1997).

Proteínas relacionadas con la patogénesis.

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) se acumulan en las células durante y después de una infección. Son proteínas de bajo peso molecular, resistentes a las proteasas que se localizan en compartimientos extracelulares con valores de pH extremos. Algunas de las PR poseen actividades definidas tal como las PR-2 ( $\beta$ -1,3-glucanasas) y PR-3 (quitinasas). Esto sugiere que la alta expresión de éstas durante la patogénesis tiene una función importante en la defensa contra patógenos que contienen  $\beta$ -1,3-glucano y quitina. A pesar de que algunas PR como las PR-2 y PR-3 poseen actividad antimicrobiana, aún se desconoce la función que tienen el resto de ellas (Madriz-Ordeñana, 2002).

Existen genes vegetales inducidos por ácido salicílico (AS) que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis, algunas de ellas tienen actividades antifúngicas y antivirales (Murphy *et al.* 2001).

Resistencia Sistémica Adquirida (RSA).

Después de una primera infección, o algún daño, la planta se “inmuniza” contra infecciones posteriores por patógenos homólogos independientemente si son virus, hongos o bacterias. Esta capacidad se dispersa a través de toda la planta principalmente en dirección apical y hacia las yemas axilares. A esta respuesta se le llama resistencia sistémica adquirida. La RSA es efectiva contra un amplio espectro de diferentes patógenos y es a largo plazo (Camarena-Gutiérrez y De la Torre-Almaráz, 2007).

Algunos metabolitos como el ácido salicílico (AS) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), presentes en las plantas, están involucrados en el establecimiento de resistencia sistémica adquirida (RSA) para la activación de genes de defensa y producción de barreras físicas en las plantas infectadas. Dentro de la secuencia de eventos que permiten la RSA, cuando la síntesis del ácido salicílico y la actividad de catalasa es baja, se tiene la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la consecuente expresión de proteínas PR involucradas en la protección antimicrobiana (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007).

## **2.4 El ácido salicílico en plantas**

### **2.4.1 Propiedades y biosíntesis**

El AS es un regulador de crecimiento vegetal endógeno de naturaleza fenólica que posee un anillo aromático con un grupo hidroxilo o su derivado funcional. En estado libre, el AS se encuentra como polvo cristalino, su punto de fusión es de 157-159°C y pH de 2.4. La síntesis de ácido salicílico en plantas puede ser a partir de ácido cinámico por descarboxilación de la cadena lateral a ácido benzoico, y una 2-hidroxilación para formar ácido salicílico. Esta vía biosintética

ha sido reportada para tabaco y arroz. Una segunda vía implica la 2-hidroxilación a ácido o-cumarico, mediante la acción de trans-cinamato-4-hidroxiato, y posterior descarboxilación a ácido salicílico (vía descrita por primera vez en semillas de chícharo). Recientes estudios en *Arabidopsis* mostraron una nueva ruta de síntesis a partir de corismato, mediante la acción de isocorismato sintasa, en cloroplastos. Además se propuso que el ácido salicílico sintetizado por esta vía es responsable de proveer resistencia adquirida local y sistémica en plantas (Hayat *et al.*, 2009).

#### **2.4.2 Metabolismo y transporte**

El AS tiene la propiedad de formar conjugados mediante la esterificación con varias moléculas (Popova *et al.*, 1997) y es metabolizado a ácido 2,3-dihidrobencico ó ácido 2,5-dihidrobencico (Billek y Schmoock, 1967). El AS celular puede moverse libremente dentro y fuera las células, tejidos y órganos. A menudo el transporte a través de membranas es regulado por la generación de ROS y por la activación de una cascada de señalización de  $Ca^{2+}$  y proteínas de fosforilación (Chen *et al.*, 2001). Durante el ataque de algún patógeno; el movimiento del AS desde la zona infectada hacia otros órganos no infectados de la planta es a través del floema. Este movimiento es lo suficientemente rápido y fluido para permitir una distribución sistémica de la señal (AS) a través del cuerpo vegetal en un corto espacio de tiempo para proporcionar tolerancia a infecciones. Cuando el AS es aplicado de manera exógena, éste puede pasar a través de la capa cuticular en su forma metilada (salicilato de metilo), que lo hace difusible independientemente del pH. Este compuesto representa un precursor inactivo que puede ser traslocado y convertido en AS cuando es necesario. La proteína SABP2 (SA binding protein) convierte biológicamente el salicilato de metilo inactivo en ácido salicílico activo mientras que, SAMT1 (SA methyl transferase 1) cataliza la formación de salicilato de metilo a SA. Algunos autores reportan que la

SABP2 es esencial para la percepción de señales durante la RSA en los tejidos no infectados (Niederl *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 1999).

### **2.4.3 AS en procesos metabólicos y fisiológicos**

El ácido salicílico actúa como una molécula de señalización y regula la biogénesis de los cloroplastos (Uzunova y Popova, 2000), la actividad fotosintética (Fariduddin *et al.*, 2003), gravitropismo (Medvedev y Markova, 1991) y la inhibición de la maduración del fruto (Srivastava y Dwivedi, 2000).

El AS en bajas concentraciones ( $10^{-6}$  a  $10^{-8}$ M) presenta efectos favorables sobre la bioproductividad en plantas hortícolas y ornamentales cuando es aplicado en el follaje (Larqués-Saavedra y Martín-Mex., 2007). Además induce la activación en el balance hormonal, asociado con una transitoria acumulación de ácido indolacético (IAA) y ácido abscísico (ABA). Algunos autores asocian la acción promotora del crecimiento del SA con la acumulación de auxinas y la acción protectora en contra estrés con la acumulación de ABA (osmoprotector con efectos a largo plazo; Shakirova, 2007).

### **2.4.4 Relación del ácido salicílico con el sistema antioxidante**

Se ha propuesto que el  $H_2O_2$  activa la biosíntesis de AS por la vía fenil-propanoide y que altos niveles de SA inhiben la actividad de enzimas antioxidantes importantes como la ascorbato peroxidasa (APX) y la catalasa (CAT) para facilitar la acumulación de ERO. El efecto del AS en el estado pro y antioxidante juega un papel importante en la acción protectora en plantas (Holuigue *et al.*, 2007).

Las respuestas de defensa anti-estrés están asociadas con el incremento en la actividad de enzimas y metabolitos antioxidantes (ácido ascórbico, glutatión,  $\alpha$ -tocoferol y carotenoides). La generación de cantidades evadas de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  y la actividad de superóxido-dismutasa y peroxidasas inducidas por el AS es fundamental para la protección de las plantas contra el estrés oxidativo. Es importante asociar este efecto (activación de enzimas antioxidantes) con la acumulación de ABA ya que se ha reportado que este compuesto activa la expresión de genes SOD (superóxido dismutasa) y a la enzima misma (Shakirova, 2007).

El AS puede desviar a la catalasa hacia la vía peroxidativa al actuar como un donador de electrones. Con la inhibición esta enzima, el AS se convierte en un radical libre que produce peroxidación lipídica. Niveles altos de  $H_2O_2$  provocados por la inhibición de catalasa y la peroxidación lipídica favorecen la señalización en procesos de transducción de señales durante la resistencia dependiente de AS. Por lo tanto, se sugiere que la activación de señales durante el estrés abiótico ocurre mediante vías de transducción donde participan el ABA,  $Ca^{2+}$  y  $H_2O_2$ , responsables de la activación de factores de transcripción comunes asociados con ciertas enzimas antioxidantes (Janda *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que el gen TOP2 codifica para la topoisomerasa II, que es regulada por varios factores de estrés como la salinidad y baja temperatura y por fitohormonas como el ABA y el AS. Este es un ejemplo del efecto del estrés biótico sobre los componentes de la maquinaria de replicación del DNA (Janda *et al.*, 2007).

#### **2.4.5 El AS como protector durante infecciones patogénicas**

La infección por patógenos conduce a la producción de ERO principalmente través de la actividad de la NADPH-oxidasa localizada en la membrana plasmática y peroxidasas

encontradas en el apoplasto (Holuigue *et al.*, 2007). El AS activa una cascada de señales que conducen a un bloqueo en la replicación y transmisión célula-célula y a distancia durante una infección viral (Singh *et al.*, 2004). Es el principal regulador de RSA y la inducción de genes relacionados con la patogénesis. Además de que contribuye con la RH mediante la generación elevada de ROS y la muerte celular (Raffaele *et al.*, 2006). La inducción de resistencia local y RSA puede ocurrir a través de la generación de radicales de AS, como producto de la interacción del AS con las enzimas catalasa y peroxidasas (Holuigue *et al.*, 2007).

La aplicación exógena de ácido salicílico ó ácido acetyl salicílico induce la expresión de genes PR (relacionados con la patogénesis) promueve la resistencia contra varios patógenos de origen viral, fúngico, y bacteriano e incrementa la eficiencia del sistema antioxidante en gran variedad de plantas (Hayat *et al.*, 2009).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la repuesta antioxidante al tratamiento con ácido salicílico de plantas de papa var. Alpha infectadas por fitoplasma.

### **3.2 Objetivos particulares**

Comprobar si el AS induce la reducción de daño causado por el fitoplasma en la planta y en los tubérculos.

Determinar la actividad fisiológica del AS como en los procesos de asimilación de biomasa bajo condiciones de estrés biótico.

Analizar los mecanismos antioxidantes de la planta mediante los cuales la papa responde al ataque de fitoplasma.

### **3. HIPÓTESIS**

Si el ácido salicílico regula procesos de productividad, crecimiento y fotosíntesis e interactúa con el peróxido de hidrógeno para la activación de genes de defensa y producción de barreras físicas después del ataque de algún patógeno, entre otros, entonces podrá aminorar el daño producido por fitoplasma en plantas de papa.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de papa (*Solanum tuberosum* L. variedad Alpha) positivas y negativas a fitoplasma, provenientes del banco de germoplasma *in vitro* del laboratorio de Fisiología-Biotecnología Vegetal del Programa Nacional de Papa, INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) en Metepec, Estado de México.

### 5.2 Detección de fitoplasmas

Las plantas seleccionadas fueron sometidas a detección de fitoplasmas con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mediante la amplificación de secuencias específicas del ADN de manera directa y en la modalidad de PCR secuencial ó “Nested PCR”. Esta técnica consiste en dos ciclos de amplificaciones: en el primer ciclo se utilizaron los iniciadores P3/P7 y en el segundo los pares R16F2n/ R16R2 (Smart *et al.*, 1996; Smart y Kirkpatrick, 1996). Las PCR se realizaron en tubos Ependorf de 0.5 mL, en un volumen total de 25 µL, que contenía 100 ng de DNA, 12.5 pmoles de cada iniciador, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), solución amortiguadora para PCR al 1X y 1.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Bioline). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (Techne TC-312). Para ambos ciclos de amplificación se aplicó un ciclo con temperatura de desnaturalización de 94 °C por 2 min; 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94 °C por 1 min, temperatura de apareamiento de 50 °C por 30 seg y temperatura de polimerización de 72 °C por 1.5 min; al final un ciclo de 72 °C por 10 min. Antes de realizar la segunda amplificación se hizo una dilución 1:5 para cada producto de la primera amplificación con agua miliQ y se agregaron 5 µL de esta dilución como muestra de

ADN para la segunda amplificación. Los productos de PCR se fraccionaron en geles de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio ( $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y se visualizaron con luz ultravioleta.

### **5.3 Establecimiento de experimentos**

#### **5.3.1 Mantenimiento de las microplantas de papa**

Como material vegetal para los experimentos se propagaron microplantas positivas a fitoplasma durante 30 días en medio de cultivo (base) que constó de las sales de Murashige y Skoog (1962) y los siguientes compuestos orgánicos por litro: sacarosa 30 g; glicina 2 mg (Merck), tiamina 0.10 mg (Merck), mio-inositol 100 mg (Sigma, pantotenato de calcio 10 mg (Fluka); y como agente gelificante: fitagel (Sigma). Las condiciones del cuarto de cultivo donde se desarrollaron las microplantas fueron: 16 horas de fotoperíodo, temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y radiación de  $35 \mu\text{mol m}^{-2}$  (400-700 nm).

#### **5.3.2 Tratamientos *in vitro* (experimento 1)**

Las plantas positivas a fitoplasma fueron propagadas en medio de cultivo base adicionado con ácido salicílico (AS) en concentraciones 0.1, 0.01 y 0.001 mM durante 28-30 días. Para los tratamientos testigo positivo y negativo (plantas sin fitoplasmas) se usó el mismo medio base sin agregar AS. Después del cultivo *in vitro* se transplantaron las microplantas a macetas con peat-moss y agrolita en relación 2:1 bajo condiciones de invernadero: fotoperíodo natural, temperatura  $15-25 \pm 3^\circ\text{C}$ . y densidad del cultivo =  $36.02 \text{ plantas.m}^{-2}$ . El cultivo en invernadero duró 90 días bajo las condiciones mencionadas. La unidad experimental fue de 20 plantas por a cada tratamiento.

### **5.3.3 Tratamientos en invernadero (experimento 2)**

Se cultivaron microplantas de 28-32 días de edad positivas a fitoplasma en macetas con peat-moss y agrolita en relación 2:1 bajo condiciones de invernadero: fotoperiodo natural, temperatura  $15-25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . y densidad del cultivo =  $36.02 \text{ plantas.m}^{-2}$ . Las plantas se asperjaron dos veces por semana con las soluciones 0.1, 0.01 y 0.001 mM de AS (pH 5.6-5.7) a partir de los 15 días del trasplante y hasta los 90 días (cuando se efectuaron las evaluaciones correspondientes y la cosecha). Los testigos positivo y negativo (plantas sin fitoplasma) se asperjaron con agua destilada (pH 5.6-5.7).

### **5.4 Análisis de síntomas**

Después de 90 días de cultivo en invernadero se evaluaron algunos síntomas en 10-15 plantas de cada unidad experimental (tratamiento). Los síntomas evaluados fueron: altura de la planta, grosor y longitud del sexto entrenudo a partir de la base, porcentaje de pardeamiento en los minitubérculos, número y peso de tubérculos por planta. Algunos de los síntomas se evaluaron también a los 60 días de desarrollo en invernadero.

### **5.5 Análisis de acumulación de biomasa**

Se realizaron dos muestreos destructivos, a los 60 (t1) y 90 (t2) días. Diez plantas de cada unidad experimental o tratamiento se seccionaron en folíolos, tallo, peciolo, raíz y tubérculos. Se pesó una muestra significativa de folíolos y se dibujó en papel milimétrico para registrar el área de éstos. Posteriormente se pesaron los folíolos de las 10 plantas y se calculó el área foliar. Los folíolos, peciolo, raíz y tallo se secaron en una estufa de circulación de aire a  $70^{\circ}\text{C}$  por 48 horas hasta registrar un peso constante. Los tubérculos se picaron en secciones pequeñas y se

sometieron a secado en estufa de circulación de aire a 70 ° por 36 horas y 3 h a 105 ° C hasta registrar una masa constante. Se calcularon los siguientes parámetros estándar para el análisis de crecimiento y se calculó la materia seca de las plantas y tubérculos de acuerdo con Tekaling y Hammes (2005):

$$\begin{aligned} \text{IAF} &= [(A_{F2} + A_{F1})/2] (1/A_C) \\ \text{TCR} &= [(\ln P_2 - \ln P_1) / (t_2 - t_1)] \times 1000 \\ \text{PFE} &= (F_{P2} / A_{F2} + P_{F1} / A_{F1}) / 2 \\ \text{TCC} &= 1 / A_C (P_2 - P_1) / (t_2 - t_1) \\ \text{TCT} &= 1 / A_C (T_2 - T_1) / (t_2 - t_1) \\ \text{TAN} &= [(P_2 - P_1) / (t_2 - t_1)] [(\ln A_{F2} - \ln A_{F1}) / (A_{F2} - A_{F1})] \\ \text{CP} &= \text{TCC} / \text{TCC} \end{aligned}$$

Donde IAF es el índice de área foliar,  $A_{F2}$  y  $A_{F1}$  son el área foliar en las fechas de muestreo ( $t_2 = 90$  d y  $t_1 = 60$  d).  $A_C$  es el área ocupada por el cultivo; TCR es la tasa de crecimiento relativa expresada en  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ .  $P_2$  y  $P_1$  son el peso total de la materia seca (g) en  $t_2$  y  $t_1$  respectivamente; PFE es el peso foliar específico expresado en  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $F_{P2}$  y  $F_{P1}$  son el peso foliar seco en  $t_2$  y  $t_1$  respectivamente; TCC es la tasa de crecimiento del cultivo expresada en  $\text{gm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ , TCT es la tasa de crecimiento del tubérculo expresada en  $\text{gm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $T_2$  y  $T_1$  son el peso seco del tubérculo (g); TAN es la tasa de asimilación neta expresada en  $\text{gm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  y CP es el coeficiente de partición. El porcentaje de materia seca y contenido de almidón en el tubérculo se calcularon mediante el método de gravedad específica de Gould y Plimpton (1985) que es la relación entre el peso en aire y peso en agua de los minitubérculos. El porcentaje de materia seca y almidón se obtuvieron con valores de tablas relacionados con la gravedad específica.

## 5.6 Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y actividad antioxidante

La actividad de enzimas antioxidantes como las peroxidasas, el contenido de ascorbato y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron cuantificados a los 30, 60 y 90 días de desarrollo en invernadero. Se tomaron tres plantas de cada tratamiento y se tomó el foliolo apical de la quinta hoja compuesta, a partir del ápice, como tejido para procesar tratando de uniformizar el grado de desarrollo de la planta.

### 5.6.1 Determinación del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se maceraron 250 mg de tejido foliar en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, la extracción se realizó con 1.2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, se centrifugó el extracto a 11000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante de las muestras (0.5 mL) se pasaron a través de columnas de cromatografía con 0.5 g de resina Dowex-1 (Dow Chemical Company, Midland, MI) seguido de 3.5 mL de TCA 5%. El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue cuantificado en las muestras procesadas usando el método quimioluminiscencia dependiente de luminol de Warm and Laties (1982): a 0.5 mL de las muestras se adicionó 0.5 mL de luminol y 4.5 mL de NH<sub>4</sub>OH (pH 9) 0.2 M. De esta mezcla se analizaron 450 µL con un luminómetro (Optocomp P, MGM Instruments, USA). La reacción de quimioluminiscencia fue iniciada mediante la inyección de 50 µL de 0.5 mM de ferricianuro de potasio en 0.2M de NH<sub>4</sub>OH. Los fotones emitidos fueron cuantificados durante cinco segundos. Una muestra paralela de cada extracto inicial fue procesada después de la adición de una concentración conocida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para recuperar el factor de corrección. (Warm and Laties, 1982).

### **5.6.2 Determinación de actividad peroxidasa**

Se maceraron 0.5 g de tejido foliar en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, la proteína soluble se extrajo mediante la homogenización con 2 mL de 50 mM de buffer de fosfato de potasio pH 7.2, que contenía 5 mM de DTT, 1 mM de EDTA y 1% de PVP (Anderson *et al.*, 1995). Los materiales insolubles fueron removidos mediante la centrifugación a 11000 g por 15 min a 4°C. La actividad peroxidasa fue determinada de acuerdo con el método de Srivastava and Dwivedi (1998). La mezcla de reacción (3 mL) 50 mM de buffer de fosfato de sodio pH 7.0, 3.33 mM de guaiacol y 4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción fue iniciada por la adición de 20 µL del extracto. El progreso de la reacción fue medido directamente por el incremento en la absorbancia a 470 nm (coeficiente de extinción: 2.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) en intervalos de 30 s por 3 minutos a 22°C. El contenido de proteína en el extracto fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop 1000.

### **5.6.3 Determinación del contenido de ascorbato**

Se maceraron 0.1 g de tejido foliar en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. La extracción se realizó en 1M de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>). Se centrifugaron los extractos por 10 min a 17 000 g, el sobrenadante (0.5 mL) de cada extracto fue transferido a tubos limpios con 0.1 mL de buffer de fosfato de sodio (120mM, pH 7.6). El pH de cada muestra se ajustó a 5 con 80± 5 µL de 2.5 M de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El KClO producido durante la neutralización fue removido por 15 min de centrifugación a 17 000 g. El sobrenadante se utilizó para cuantificar el contenido de ascorbato reducido en el tejido. Posteriormente se procesaron 100mL del sobrenadante para la cuantificación de ascorbato total y calcular el ascorbato oxidado por diferencia como describen Foyer *et al.*, (1983).

### **5.7 Diseño experimental**

Los tratamientos fueron distribuidos en arreglos completamente aleatorizados para cada tratamiento (una unidad experimental de 25 plantas) con tres réplicas en experimentos independientes.

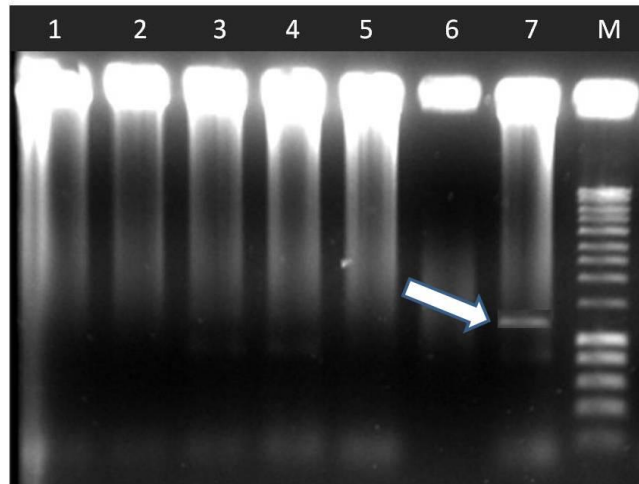
### **5.8 Análisis estadísticos**

Se realizaron pruebas de ANOVA para comparar los tratamientos. Posteriormente comparación de medias (Tukey) para los tratamientos con diferencias significativas. Los resultados se analizaron en el programa Statistica 6 software (StatSoft, Inc., Tulsa OK) con un nivel de confianza de 95-99%.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Detección de fitoplasma PCR anidada

Para la PCR anidada con amplificaciones del fragmento esperado de aproximadamente 1250 pb fueron usados los pares de iniciadores R16F2n/ R16R2. Se obtuvo una muestra positiva (carril 7) de 7 analizadas provenientes del Banco de Germoplasma *in vitro* del Programa Nacional de Papa (INIFAP, Fig. 1). Otros autores igualmente detectaron fitoplasmas en clones sintomáticos y asintomáticos de papa var. Alpha mediante la técnica de PCR anidada con los mismos iniciadores (Alarcón-Rodríguez *et al.*, 2009). Las plantas que resultaron positivas (carril 7) se propagaron *in vitro* y fueron utilizadas como material vegetal positivo en este trabajo.



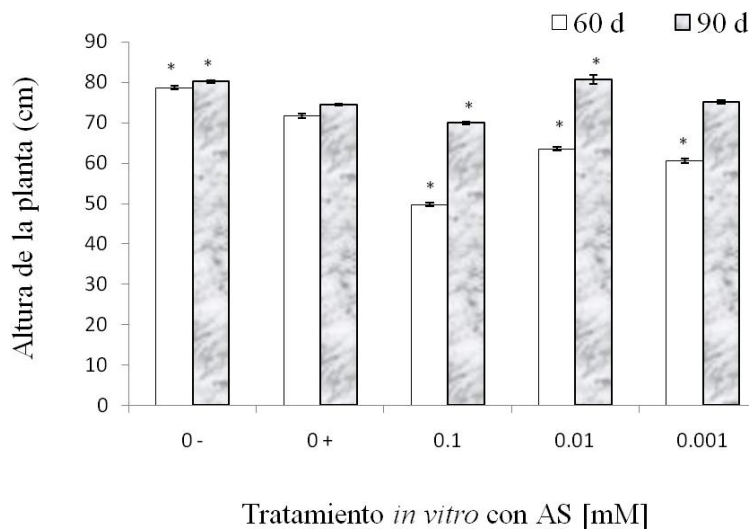
**Figura 1.** Productos de amplificaciones de la PCR anidada. Carriles 1-7: plantas de papa var. Alpha desarrolladas *in vitro* a partir de plantas con síntomas provenientes de campo; M: marcador Hyper Ladder I (Bioline). La flecha indica la banda de amplificación de la PCR anidada usando los iniciadores R16F2n/R16R2, por lo tanto: presencia de fitoplasma en la muestra.



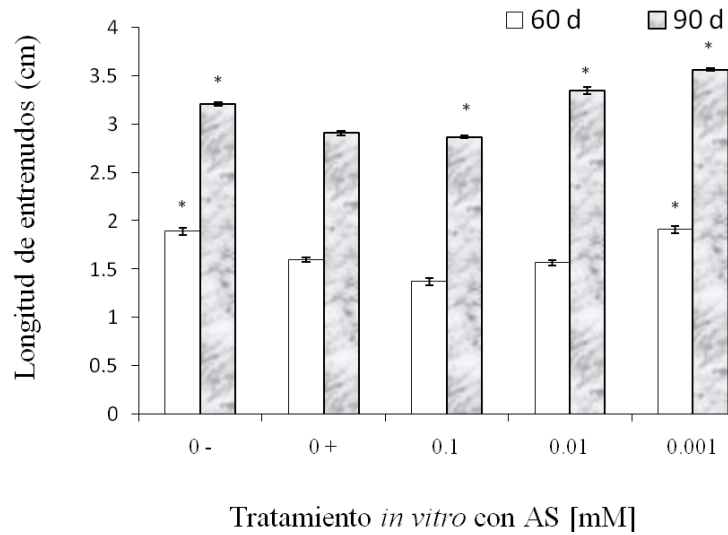
## 6.2 Tratamientos *in vitro* (experimento 1)

### 6.2.1 Análisis de síntomas

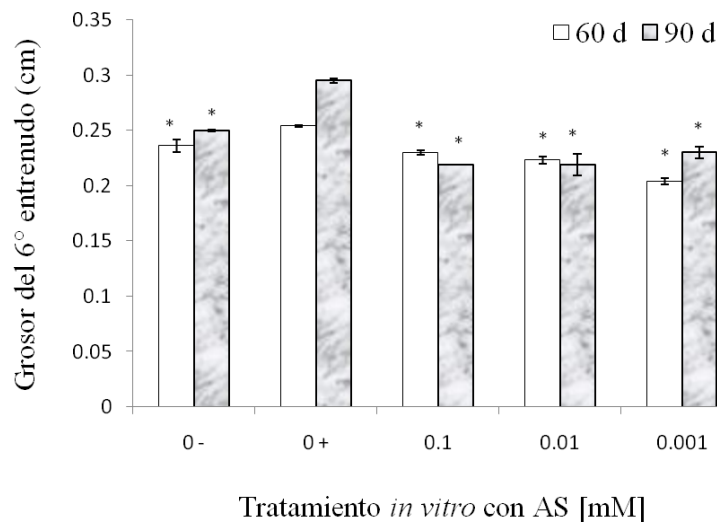
Las plantas infectadas con fitoplasmas presentaron algunos de los síntomas que se han reportado para cultivos en campo (achaparramiento, entrenudos cortos y engrosados en la base del tallo y desarrollo de tubérculos pequeños (Figs. 2-4 y Cuadro 1). En las dos fechas de monitoreo de síntomas se presentaron diferencias significativas con respecto al testigo sano (0- ). Los síntomas ausentes para condiciones de invernadero fueron: pigmentación clorótica de los folíolos apicales y brotes de tubérculo ahilados. El pardeamiento se presentó también en el testigo sano (Fig. 5). En los tratamientos con AS se observó un efecto a largo plazo en la inhibición del crecimiento (Fig. 2) principalmente a los 60 días de desarrollo en invernadero, siendo gradual conforme a la concentración aplicada *in vitro*.



**Figura 2.** Altura de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, previamente tratadas (*in vitro*) con AS durante 30 d. \* Diferencias significativas con respecto al testigo positivo,  $p \leq 0.005$  y  $n=15-18$ .

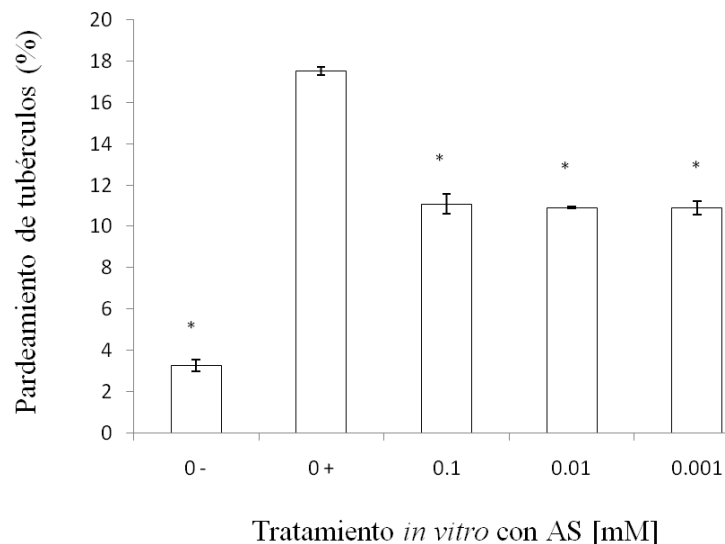


**Figura 3.** Longitud de entrenudos de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, previamente tratadas (*in vitro*) con AS durante 30 d. \* Diferencias significativas con respecto al testigo positivo (0+),  $p \leq 0.005$  y  $n=15-18$ .



**Figura 4.** Grosor del sexto entrenudo a partir de la base en plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, previamente tratadas (*in vitro*) con AS durante 30 d. \* Diferencias significativas con respecto al testigo positivo,  $p \leq 0.005$  y  $n=15-18$ .

El achaparramiento no fue evaluado debido a la acción propia del AS como inhibidor del crecimiento y en cuanto al peso de los tubérculos solo se presentó un aumento en peso en la concentración 0.001 mM de AS (Cuadro 1). El fitoplasma no redujo el número de minitubérculos por planta, sin embargo, el tratamiento con AS aumentó la producción en número de estos en la concentración 0.1 y 0.01 mM y la redujo en 0.001 mM. La relación peso-número de minitubérculos muestra la eficiencia de las plantas a desarrollar tubérculos más pesados y de mejor tamaño, por lo que en este caso el tratamiento que favoreció al rendimiento en plantas infectadas fue 0.001 mM de AS (Cuadro 1).



**Figura 5.** Efecto del AS sobre el porcentaje de tubérculos pardeados en plantas de papa de 90 días de crecimiento en invernadero, previamente tratadas (*in vitro*) con AS durante 30 d. \*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo (0+),  $p \leq 0.001$  y  $n=15-18$ .

### 6.2.2 Análisis de acumulación de biomasa

Los análisis de crecimiento mostraron que además de tener mayor peso, los tubérculos son de mejor calidad pues incrementaron significativamente el contenido de materia seca y almidón en plantas positivas a fitoplasma tratadas con AS (0.1 y 0.01 mM) incluso con

porcentajes mayores a aquellos obtenidos en las plantas sanas (testigo negativo) en el tratamiento con 0.001 mM de AS (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Rendimiento de plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, previamente tratadas (*in vitro*) con AS por 30 d.

Trat. <i>in vitro</i> con AS [mM]	Peso de minitubérculos (g)	Número de minitubérculos por planta (%)	Relación peso-número de minitubérculos
0 -	5.2 ± 0.11 *	5.5 ± 0.10	0.97 ± 0.01 *
0 +	3.3 ± 0.06	5.6 ± 0.06	0.32 ± 0.00
0.1 +	3.7 ± 0.20	7.2 ± 0.09 *	0.51 ± 0.02 *
0.01 +	3.4 ± 0.04	6.4 ± 0.05 *	0.70 ± 0.03
0.001 +	4.5 ± 0.27 *	5.1 ± 0.07 *	0.93 ± 0.05 *

Los testigos fueron: plantas sanas (0-) y plantas infectadas con fitoplasma (0+).

\*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo,  $p \leq 0.001$  y  $n=10$ .

De los tratamientos con AS los que incrementaron la tasa de crecimiento del tubérculo (TCT) y el coeficiente de partición (CP) fueron 0.1 y 0.001 mM lo que representa mejor traslocación de fotosintatos hacia el tubérculo, aunque esto no repercutió en el tamaño de los mismos si mejora la calidad ya que el porcentaje de materia seca y almidón en el minitubérculo fueron favorecidos por la aplicación de AS en plantas enfermas (Cuadros 1, 2 y 3).

**Cuadro 2.** Calidad de minitubérculos de plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, previamente tratadas (*in vitro*) con AS por 30 d.

TRATAMIENTO <i>in vitro</i> CON AS [mM]	Materia seca (%)	Almidón (%)
0 -	18.55 ± 0.33 *	12.70 ± 0.31 *
0 +	14.29 ± 0.57	8.90 ± 0.54
0.1 +	19.47 ± 0.23 *	13.37 ± 0.22 *
0.01 +	18.76 ± 0.17 *	12.96 ± 0.28 *
0.001 +	23.97 ± 0.47 *	17.42 ± 0.38 *

Los testigos fueron: plantas sanas (0-) y plantas infectadas con fitoplasma (0+).

\*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo,  $p \leq 0.001$  y  $n=10$ .

**Cuadro 3.** Parámetros de crecimiento en plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, previamente tratadas (*in vitro*) con AS por 30 d.

TRATAMIENTO <i>in vitro</i> CON AS [mM]	TCR ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )	TCC ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )	TCT ( $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ )	CP
0 -	39.17 ± 3.56 *	12.44 ± 0.10 *	5.71 ± 0.36 *	0.542 ± 0.00
0 +	20.64 ± 1.28	4.472 ± 0.37	2.34 ± 0.36	0.275 ± 0.013
0.1 +	29.945 ± 0.87	6.463 ± 1.32	4.93 ± 0.67 *	0.728 ± 0.058 *
0.01 +	26.99 ± 1.98	5.511 ± 0.42	3.61 ± 0.71	0.548 ± 0.03
0.001 +	32.659 ± 3.29	8.760 ± 0.63	5.80 ± 0.05 *	0.747 ± 0.051 *

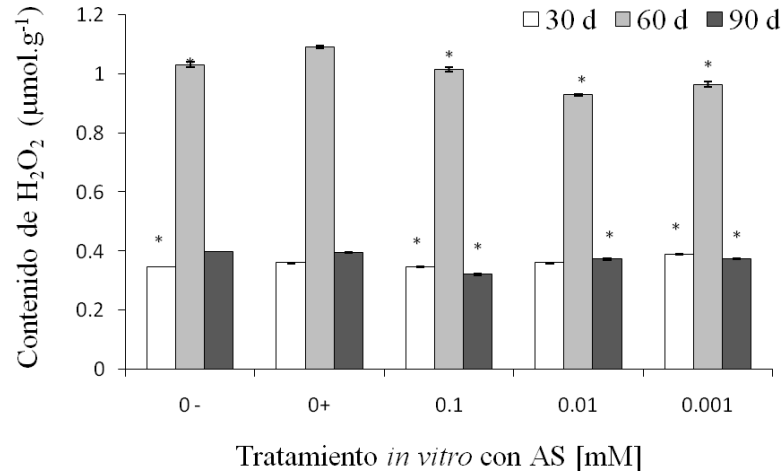
Los testigos fueron: plantas sanas (0- ) y plantas infectadas con fitoplasma (0+). TCR: tasa de crecimiento relativa, TCC: tasa de crecimiento del cultivo, TCT: tasa de crecimiento del tubérculo y CP: coeficiente de partición. \*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo (0+),  $p \leq 0.005$  y  $n = 10$ .

### 6.2.3 Análisis enzimático y antioxidante

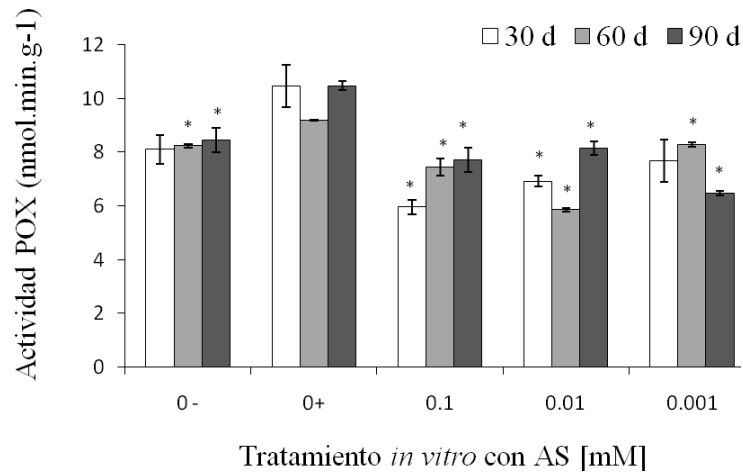
Las plantas infectadas con fitoplasma presentaron mayor contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante todo el periodo de cultivo en invernadero. A los 30 días tanto el tratamiento con 0.1 mM de SA como las plantas sanas (0- ) presentaron menor contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con respecto a las plantas del testigo positivo (0+). La concentración 0.01 mM no presentó diferencias significativas con respecto al testigo positivo y 0.001 mM presentó niveles significativamente mayores que las plantas del 0+. A partir de los 60 días de cultivo en invernadero los tratamientos con AS disminuyeron significativamente el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 6).

La actividad de peroxidasas (POX) fue significativamente mayor en plantas con fitoplasma a lo largo del cultivo en invernadero, excepto a los 30 días de cultivo. En los tratamientos con 0.1 y 0.01 mM de AS disminuyó significativamente la actividad POX a los 30 días de cultivo con respecto a los testigos. El tratamiento con 0.001 mM no presentó diferencias

significativas. A los 60 y 90 días los tratamientos con AS redujeron la actividad de esta enzima con respecto al testigo positivo (Fig. 7).



**Figura 6.** Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 90 días de desarrollo en plantas de papa cultivadas en invernadero por 90 d, previamente tratadas 30 d (*in vitro*) con AS. \*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo (0+;  $p \leq 0.001$  y  $n = 9$ ).

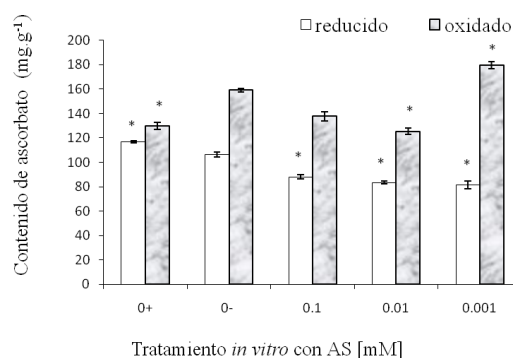


**Figura 7.** Actividad POX durante 90 días de desarrollo en plantas de papa cultivadas en invernadero por 90 d, previamente tratadas 30 d (*in vitro*) con AS. \*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo (0+;  $p \leq 0.001$  y  $n = 9$ ).

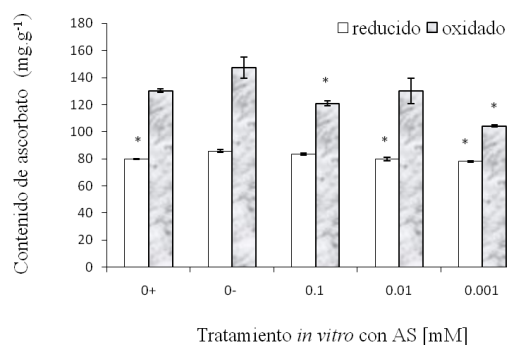
A los 30 días de crecimiento el contenido de ácido ascórbico oxidado (DHA) fue significativamente mayor en el testigo positivo con respecto al testigo negativo, con el tratamiento 0.001 mM de AS incrementó significativamente el contenido de DHA y disminuyó con 0.01 mM con respecto a ambos testigos (Fig. 8A). A los 60 días las plantas positivas presentaron mayor contenido de AA con respecto a las negativas. El tratamiento con 0.001 mM redujo significativamente el contenido de AA y de DHA (Fig. 8B).

A los 90 días de crecimiento en invernadero no hubo diferencias significativas en el contenido de AA entre plantas con y sin fitoplasma, el testigo positivo tuvo menor contenido de DHA. En los tratamientos con 0.1 y 0.01 mM de AS el contenido de AA aumentó significativamente, mientras que, el DHA aumentó gradualmente en las tres concentraciones aplicadas de AS con respecto al testigo positivo (Fig. 8C).

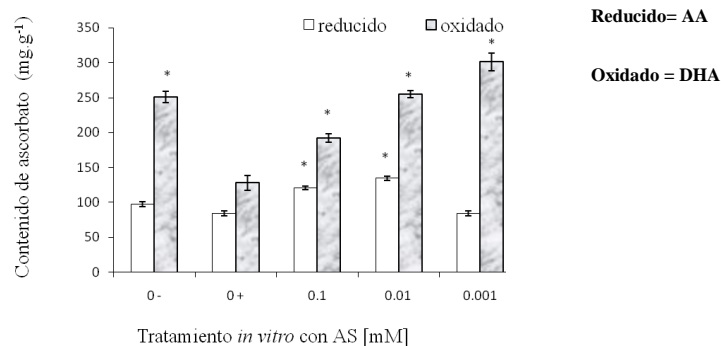
A



B



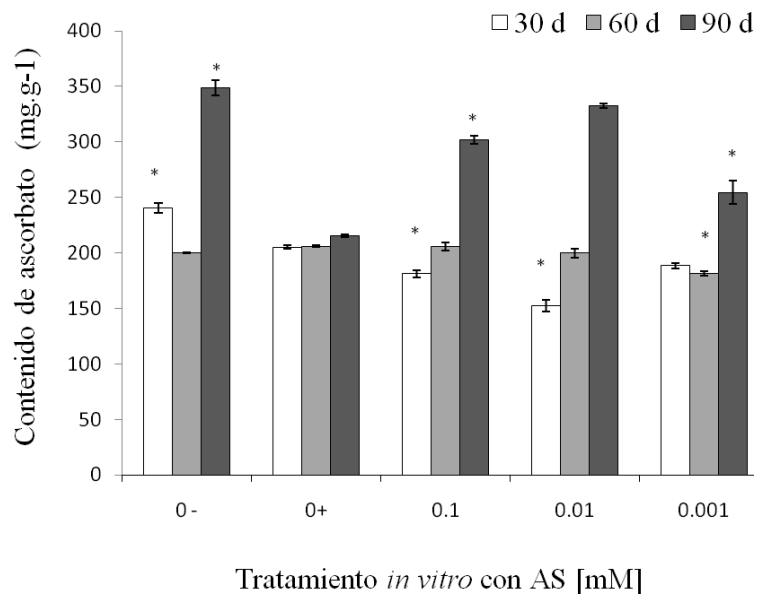
C



**Figura 8.** Contenido de ascorbato reducido y oxidado durante 90 días de desarrollo en plantas de papa cultivadas en invernadero por 90 d, previamente tratadas 30 d (*in vitro*) con AS. A: 30 d, B: 60 d y C: 90 d. \*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo (0+;  $p \leq 0.001$  y  $n = 9$ ).

El contenido total de ascorbato (AA+DHA) fue significativamente mayor en las plantas sanas a los 30 y 90 días. A los 30 días las plantas tratadas con AS presentaron menor contenido de AA+DHA, a los 60 días solo el tratamiento 0.001 mM presentó bajo contenido, mientras que, a los 90 días los tratamientos presentaron mayor contenido de AA+DHA significativamente, con respecto a las plantas infectadas (Fig. 9).



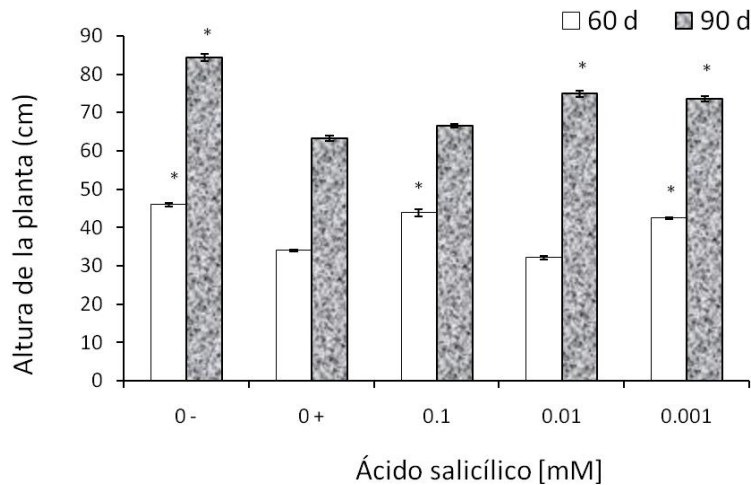


**Figura 9.** Contenido total de ascorbato (AA+DHA) durante 90 días de desarrollo en plantas de papa cultivadas en invernadero por 90 d, previamente tratadas 30 d (*in vitro*) con AS. \*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo ( $p \leq 0.001$  y  $n = 9$ ).

## 6.3 Tratamientos en invernadero (experimento 2)

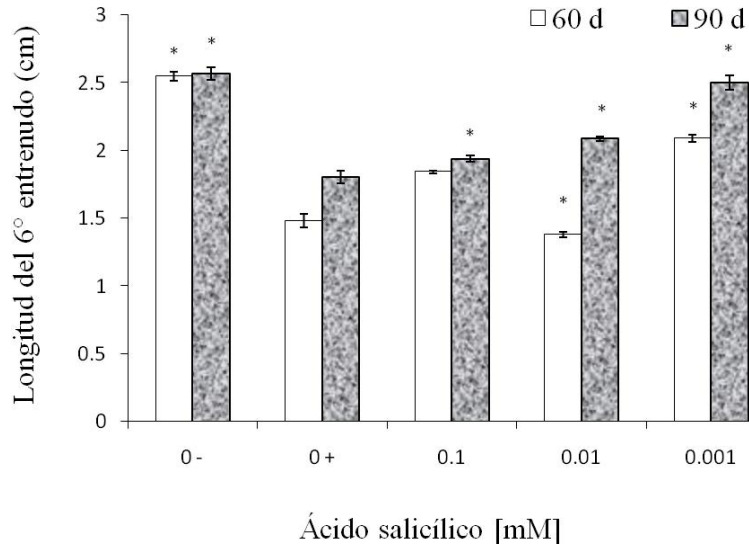
### 6.3.1 Análisis de síntomas

En las plantas tratadas con AS se observó un efecto de inhibición del crecimiento: a los 60 días con 0.01 y 0.001 mM y a los 90 días con 0.1, 0.01 y 0.001 mM con respecto a las plantas sanas, que se asperjaron solo con agua destilada (Fig. 10).

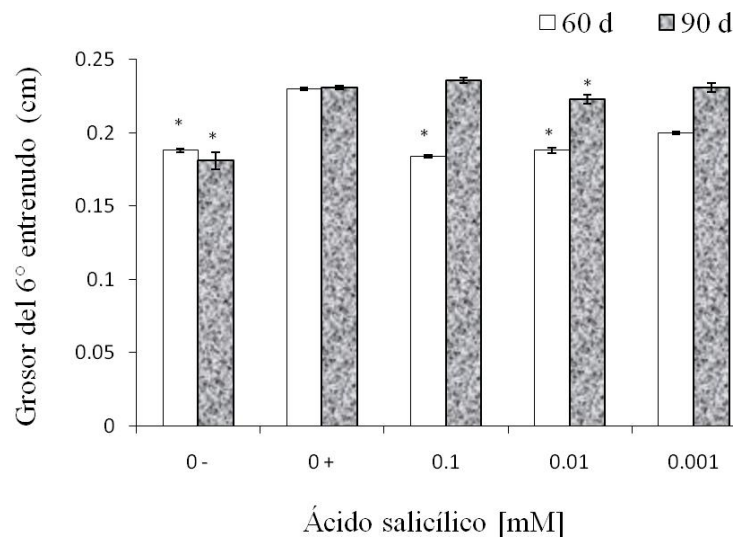


**Figura 10.** Altura de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, asperjadas con AS cada tercer día durante su cultivo. \*Significativo con respecto al testigo positivo,  $p \leq 0.005$  y  $n=15-18$ .

El efecto del AS sobre la reducción de síntomas en las plantas tratadas fue significativa con respecto al testigo positivo en la longitud de entrenudos a los 60 días en el tratamiento con 0.001 mM y a los 90 días en 0.1, 0.01 y 0.001 mM con entrenudos menos cortos; en el grosor de entrenudos se observó reducción a los 60 días en todos los tratamientos y a los 90 días en 0.01 mM (Figs. 11 y 12). El porcentaje de pardeamiento de la pulpa del tubérculo fue menor en los tratamientos con AS, con mayor efecto en baja concentración (0.001 mM) con respecto al testigo positivo (Fig. 13). El achaparramiento no fue evaluado debido a la acción del AS como inhibidor del crecimiento.

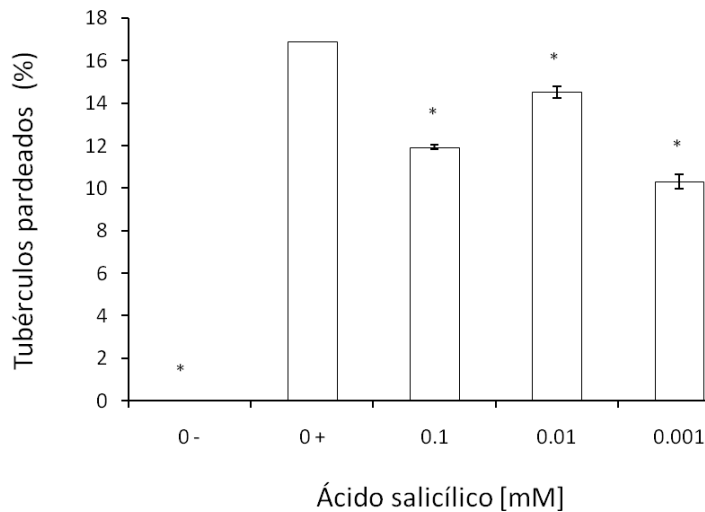


**Figura 11.** Longitud del sexto entrenudo a partir de la base de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, asperjadas con AS cada tercer día durante su cultivo. \*Significativo con respecto al testigo positivo (0+),  $p \leq 0.005$  y  $n=15-18$ .



**Figura 12.** Grosor del sexto entrenudo a partir de la base de plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, asperjadas con AS cada tercer día durante su cultivo. \*Significativo con respecto al testigo positivo (0+),  $p \leq 0.005$  y  $n=15-18$ .

En cuanto al peso de los minitubérculos, se presentó un aumento en los tratamientos con AS. El fitoplasma produjo más tubérculos (pequeños) con menos peso por planta, sin embargo, el tratamiento con AS (0.1 y 0.01 y 0.001 mM) aumentó el volumen (relación peso-número de minitubérculos) y por lo tanto, mejoró el tamaño. El tratamiento que favoreció más el rendimiento en plantas infectadas fue 0.1 mM de AS (Cuadro 4).



**Figura 13.** Porcentaje de tubérculos pardeados en plantas de papa de 60 y 90 días de crecimiento en invernadero, asperjadas con AS cada tercer día durante su cultivo. \*Significativo con respecto al testigo positivo (0+),  $p \leq 0.005$  y  $n=15-18$ .

### 6.3.2 Análisis de acumulación de biomasa

Los porcentajes de materia seca y almidón en el tubérculo fueron significativamente mayores en plantas sanas con respecto al testigo positivo, lo cual reveló el efecto negativo que tiene el fitoplasma sobre la calidad de los tubérculos. Los tratamientos con AS incrementaron significativamente la tasa de crecimiento del tubérculo (TCT) y el coeficiente de partición (CP), lo que favoreció la traslocación de fotosintatos hacia el tubérculo, repercutiendo en el tamaño de los mismos en las concentraciones 0.1 y 0.001 mM y aumentando el porcentaje de materia seca,

Sin embargo el porcentaje de almidón no incrementó significativamente en los tratamientos (Cuadros 4, 5 y 6).

**Cuadro 4.** Rendimiento de plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, asperjadas con AS cada tercer día durante el cultivo.

<b>TRATAMIENTO <i>in vitro</i> CON AS [mM]</b>	<b>Peso por minitubérculo (g)</b>	<b>Cantidad por planta (%)</b>	<b>Relación peso-número</b>
0 -	6.29 ± 0.06 *	3.1 ± 0.08 *	1.52 ± 0.02 *
0 +	2.97 ± 0.07	3.8 ± 0.15	0.71 ± 0.05 c
0.1 +	5.97 ± 0.06 *	2.6 ± 0.10 *	1.34 ± 0.03 *
0.01 +	3.48 ± 0.10 *	3.7 ± 0.09	0.96 ± 0.03
0.001 +	3.74 ± 0.02 *	3.2 ± 0.08 *	1.17 ± 0.03 *

Los testigos fueron: plantas sanas (0-) y plantas infectadas con fitoplasma (0+).

\*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo,  $p \leq 0.001$  y  $n=10$ .

**Cuadro 5.** Calidad de minitubérculos en plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, asperjadas con AS cada tercer día durante el cultivo.

<b>TRATAMIENTO <i>in vitro</i> CON AS [mM]</b>	<b>Materia seca (%)</b>	<b>Almidón (%)</b>
0 -	25.083 ± 0.26 *	16.66 ± 0.59 *
0 +	22.96 ± 0.06	13.98 ± 0.41
0.1 +	24.51 ± 0.03 *	15.00 ± 0.29
0.01 +	24.18 ± 0.17 *	15.76 ± 0.39
0.001 +	25.16 ± 1.20 *	15.26 ± 0.51

Los testigos fueron: plantas sanas (0-) y plantas infectadas con fitoplasma (0+).

\*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo,  $p \leq 0.001$  y  $n=10$ .

**Cuadro 6.** Parámetros de crecimiento en plantas de papa cultivadas en invernadero durante 90 d, asperjadas con AS cada tercer día durante el cultivo.

TRATAMIENTO <i>in vitro</i> CON AS [mM]	TCR (mg.m <sup>-2</sup> .d <sup>-1</sup> )	TCC (mg.m <sup>-2</sup> .d <sup>-1</sup> )	TCT (mg.m <sup>-2</sup> .d <sup>-1</sup> )	CP
0 -	41.50 ± 1.08 *	9.98 ± 0.25 *	4.74 ± 0.19 *	1.323 ± 0.05 *
0 +	33.93 ± 1.79	3.90 ± 0.18	2.30 ± 0.13	0.973 ± 0.11
0.1 +	39.76 ± 2.13 *	5.89 ± 0.14 *	4.71 ± 0.27 *	0.999 ± 0.05
0.01 +	39.67 ± 0.96 *	6.65 ± 0.06 *	4.63 ± 0.23 *	1.082 ± 0.07 *
0.001 +	41.02 ± 1.82 *	4.75 ± 0.34	2.84 ± 0.02	1.119 ± 0.04 *

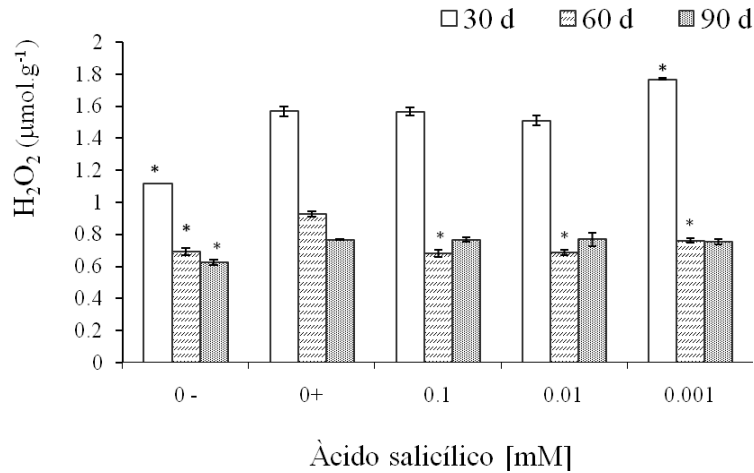
AS: = ácido salicílico, testigos: 0- = plantas sanas; 0+ = plantas infectadas con fitoplasma. \*Significativo con respecto al testigo positivo, n = 10 y p < 0.005.

### 6.3.3. Análisis enzimático y antioxidante

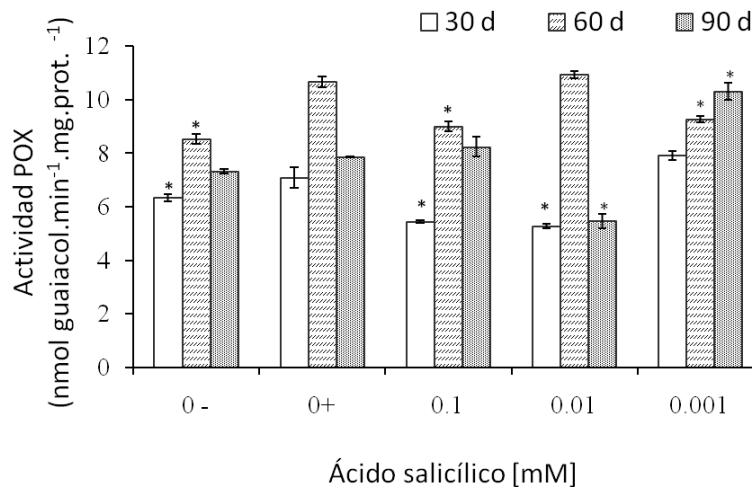
El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue significativamente mayor en las plantas positivas a fitoplasma comparado con el contenido en las plantas sanas. A los 30 días de cultivo en invernadero las plantas infectadas y los tratamientos con AS presentaron niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significativamente mayores que las plantas sanas (0- ). A los 60 días de cultivo en invernadero disminuyeron los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas tratadas con respecto al testigo positivo (0+) y a los 90 días no presentaron diferencias significativas (Fig. 14).

A lo largo del cultivo en invernadero las plantas con fitoplasma presentaron significativamente mayor actividad POX con respecto a las plantas sanas, excepto a los 90 días. A los 30 días de cultivo la actividad POX disminuyó significativamente en los tratamientos con 0.1 y 0.01 mM de AS con respecto a los testigos 0+ y 0-. El tratamiento con 0.001 mM no presentó diferencias significativas con respecto al testigo positivo. A los 60 días de crecimiento los tratamientos con 0.1 y 0.001 mM disminuyeron significativamente la actividad POX, como en el testigo negativo. A los 90 días las plantas con AS (0.01 mM) redujeron la actividad de esta

enzima con respecto los testigos y la concentración 0.001 incrementó con respecto a los testigos (Fig. 15).



**Figura 14.** Efecto del AS sobre el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas de papa asperjadas cada tercer día durante su desarrollo en invernadero. \*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo,  $p \leq 0.001$  y  $n = 9$ .



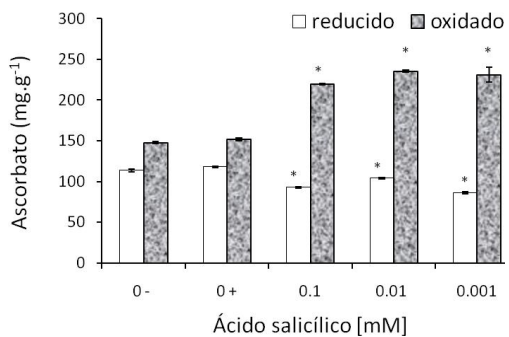
**Figura 15.** Efecto del AS sobre la actividad POX en plantas de papa durante 90 días de desarrollo en invernadero. Aspersiones cada tercer día. \*Diferencias significativas con respecto al testigo positivo (0+),  $p \leq 0.001$  y  $n = 9$ .

A los 30 días de crecimiento, las plantas con fitoplasma tratadas con AS presentaron mayor contenido de ácido ascórbico reducido ó dehidro-ascorbato (DHA), con respecto los testigos positivo y negativo. No hubo diferencia significativa entre plantas sanas y enfermas. Los tratamientos con SA disminuyeron significativamente el contenido de ácido ascórbico oxidado ó mono-dehidro-ascorbato (MDA), sin diferencias significativas entre los testigos (Fig. 16.A). A los 60 días las plantas positivas presentaron mayor contenido de DHA y MDA con respecto a las negativas. Con respecto al testigo positivo el tratamiento con 0.001 mM aumentó significativamente el contenido de DHA, los tratamientos con 0.1 y 0.001 mM de SA redujeron el contenido de MDA y la concentración 0.01 mM aumentó significativamente (Fig. 16.B). A los 90 días las plantas enfermas presentaron menor contenido de MDA y DHA con respecto a las sanas, el tratamiento con 0.001 mM aumentó significativamente el contenido de DHA. Los tratamientos con 0.1 y 0.001 mM de SA disminuyeron significativamente el contenido de MDA y con 0.01 mM aumentó el contenido de MDA con respecto los testigos (Fig. 16.C).

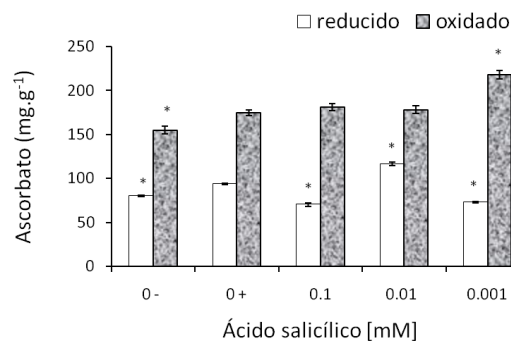
El contenido de ascorbato total (AA) fue significativamente mayor en las plantas sanas a los 30 y 90 días con respecto a las plantas infectadas. Los tratamientos con AS incrementaron significativamente el contenido de AA con respecto a los testigos durante todo el periodo de cultivo en invernadero. Incluso con respecto a las plantas sanas a los 30 y 60 días. A los 90, días las plantas sanas presentaron significativamente mayor contenido de AA con respecto a las plantas con fitoplasma y a las tratadas con AS (Fig. 17).



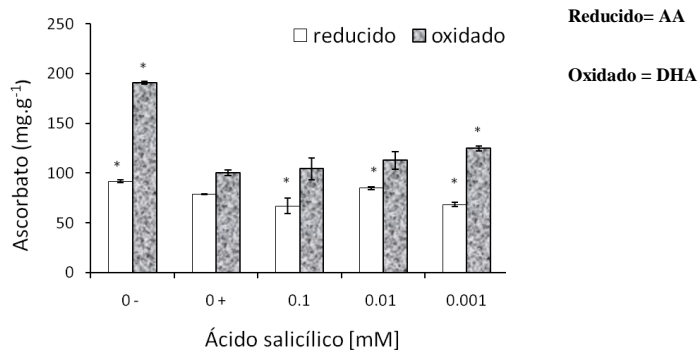
A



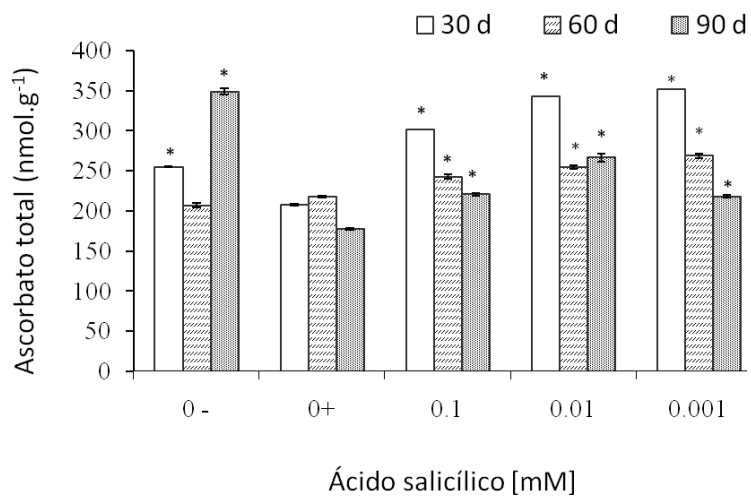
B



C



**Figura 16.** Contenido de ascorbato reducido y oxidado durante 90 días de desarrollo en invernadero en plantas de papa asperjadas con AS cada tercer día. \*Significativo con respecto al testigo positivo (0+),  $p \leq 0.001$  y  $n=9$ . A=30 d, B=60 d, C=90 d.



**Figura 17.** Contenido total de ascorbato (AA +DHA) durante 90 días de desarrollo en invernadero. Aspersiones con ácido salicílico cada tercer día durante el cultivo en invernadero. \*Significativo con respecto al testigo positivo,  $p \leq 0.001$  y  $n=9$ .

## 7. DISCUSION

El estudio de la naturaleza, función y modo de acción de los fitoplasmas como patógenos de diversos cultivos vegetales es muy difícil ya que a la fecha no existen métodos de aislamiento y cultivo para su experimentación sobre métodos de control. Las estrategias básicas de prevención consisten en la eliminación de las plantas que presenten síntomas y aplicación de insecticidas para controlar la presencia de los insectos vectores. Un método auxiliar para incrementar la eficacia de estas medidas de control consiste en la reducción del potencial de infección e incremento en la resistencia o tolerancia de las plantas a estos organismos ya que la eliminación del patógeno hasta el momento no ha sido posible con ningún tratamiento. Por ello este trabajo se enfocó en la aplicación de AS para probar el potencial del AS en la inducción de tolerancia al estrés biótico por fitoplasma e incrementar la productividad de las plantas de papa.

### 7.1 Reducción de síntomas

Algunos de los síntomas típicos de la infección por fitoplasmas en campo (INIFAP, 2000; Martínez-Soriano *et al.*, 2007; Secor *et al.*, 2006) no se registraron durante el cultivo en invernadero, dichos síntomas fueron: pigmentación clorótica de los folíolos apicales, brotación en la parte aérea del tallo y brotes ahilados en los tubérculos. Posiblemente Estos síntomas además de estar asociados al ataque del fitoplasma, probablemente también estén relacionados con factores como sequía, altas radiaciones, frío, alguna toxina inyectada por el vector, etc., los cuales no se presentan en condiciones de invernadero.

El papel del AS en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico ha sido investigado durante varias décadas. López-Delgado y Scott (1997) reportaron el efecto del ácido acetil-salicílico en la inhibición del crecimiento *in vitro* de microplantas de papa de la variedad

Russet Burbank al aplicar concentraciones de 1 y 0.1 mM aplicadas. Este mismo efecto se registró en el presente trabajo para los tratamientos con ácido salicílico en las concentraciones 0.1, 0.01 y 0.001 mM en condiciones de cultivo *in vitro*, con efecto a largo plazo (60 días después del trasplante a invernadero; Fig. 2). Los autores antes citados, reportaron que los tratamientos 0.01 y 0.001 mM no presentaron diferencias significativas durante el crecimiento *in vitro* con respecto al testigo. Sin embargo, en este trabajo dichas concentraciones produjeron efectos a largo plazo (después del trasplante al invernadero). Al respecto Benavides-Mendoza *et al.* (2004) reportaron que en semillas de chile pretratadas con soluciones de ácido salicílico en la concentración  $10^{-3}$  inhibió el crecimiento de las plántulas e indujo modificaciones en la estructura de las mismas, lo cual apoya la idea de que el tratamiento previo con AS induce efectos a largo plazo sobre el crecimiento de las plantas. Un efecto diferente ocurre cuando la aplicación del mismo compuesto se realiza directamente por aspersion, en condiciones de invernadero, donde el efecto del compuesto fue promover el crecimiento en plantas infectadas con fitoplasma, reduciendo los síntomas de achaparramiento característicos del patógeno a los 60 (0.1 y 0.001 mM) y 90 d (0.01 y 0.001 mM; Fig. 10).

Otros efectos en la reducción de síntomas producidos por la infección de fitoplasmas en plantas de papa fueron observados en plantas tratadas con AS. Entrenudos cortos y engrosados, producción de tubérculos pequeños y necrosis interna del tubérculo fueron síntomas de infección por fitoplasmas en los que el AS tuvo un notable efecto para la planta ya que inhibió la presencia de tales síntomas. El efecto fue favorable tanto por aplicación directa del AS mediante aspersion, como por incubación *in vitro* y posterior trasplante a invernadero (a largo plazo) en condiciones de estrés biótico producido por el fitoplasma. Efectos a largo plazo inducidos por ácido acetil salicílico (ASA) en papa fueron previamente reportados por López-Delgado *et al.* (1998) quienes

demonstraron que el ASA indujo termotolerancia en plantas de papa aún en la segunda generación de microplantas que se subcultivaron en medio de cultivo libre de ASA (efectos a largo plazo sin presencia del salicilato).

Hayat *et al.* (2009) reportaron que las plantas reaccionan a un ataque microbiano mediante numerosos mecanismos de defensa integrados por un complejo sistema de señalización. Esta serie de señales actúa en cascadas de transducción que conducen a la expresión de genes responsables de la defensa donde el AS es el principal regulador, permitiendo la inducción de resistencia sistémica adquirida y la activación de genes que codifican para las proteínas relacionadas con la patogénesis (Holuigüe *et al.*, 2007; Dangl y Jones, 2001; Sticher *et al.*, 1997). En este trabajo se logró la reducción a largo plazo de síntomas de daño por fitoplasma (debido a que el compuesto solo estuvo presente antes del crecimiento en invernadero) y se sugiere que una de las vías de acción del AS pudo haber sido mediante la activación de genes responsables de proteger a la planta ante un ataque bacteriano, el fitoplasma.

## **7.2 Eficiencia en la acumulación de biomasa**

El AS en diferentes concentraciones promovió la producción de minitubérculos aun bajo diferentes tipos de aplicación del compuesto (en el medio de cultivo *in vitro* o por aspersión en invernadero). Ambas formas de aplicación fueron eficientes para reducción de síntomas de ataque por fitoplasma y el incremento en la productividad de la planta. La eficiencia de las plantas a desarrollar tubérculos más pesados y grandes fue mayor en las concentraciones 0.1 y 0.001 mM de AS en los tratamientos tanto *in vitro* como por aspersión en invernadero (relación peso-número de tubérculos por planta, Cuadros 1 y 4 respectivamente). Otros autores reportaron que el ácido salicílico aumentó en plantas de trigo de diferentes variedades el número de granos

por espiga en tratamientos con 0.1 y 0.001 mM de AS e incrementó el rendimiento agronómico con el tratamiento de 0.001 mM (López *et al.*, 1998). En plantas de chile var. Tampiqueño 74 el tratamiento de semillas con soluciones de ácido salicílico en concentración de 0.1 mM previo a baja temperatura, indujo mayor tolerancia e incrementó el contenido de biomasa después de la exposición al estrés ambiental (Benavides-Mendoza *et al.*, 2004).

El fitoplasma causa efectos negativos a nivel fisiológico en diversas especies de plantas. Algunos de los efectos descritos en la literatura incluyen la acumulación de carbohidratos en hojas maduras y decremento en el contenido de almidón en órganos de reserva como resultado de la deficiencia en la translocación de fotosintetizados. Esto sugiere la influencia indirecta del parásito sobre el metabolismo y funcionamiento del floema de la planta hospedera (Christensen *et al.*, 2005). En las plantas testigo positivas el fitoplasma redujo significativamente el porcentaje de materia seca y almidón en los tubérculos y los parámetros de crecimiento con respecto a plantas libres de fitoplasma. Los parámetros evaluados fueron tasa de crecimiento relativa, tasa de crecimiento del cultivo, tasa de crecimiento del tubérculo y coeficiente de partición.

La acumulación de materia seca es un parámetro usado comúnmente para caracterizar el crecimiento del tubérculo ya que éste es el órgano de importancia económica para el hombre (Tekaling y Hammes, 2005). En plantas infectadas con fitoplasma los tratamientos con AS (0.1, 0.01 y 0.001 mM) aplicados en condiciones *in vitro* indujeron la producción de minitubérculos con mayor calidad pues incrementaron significativamente el porcentaje de materia seca y almidón, mientras que en las plantas asperjadas en invernadero con las mismas concentraciones de AS presentaron solamente mayor contenido de materia seca en el tubérculo, sin diferencias significativas en el porcentaje de almidón de los mismos. En otros trabajos se reporta el efecto de la aplicación foliar de AS sobre: a) la acumulación de materia seca en *Brassica juncea*

(Fariduddin *et al.* 2003), b) incrementó en el área foliar y la producción de materia seca en maíz y soya (Khan *et al.*, 2003) y c) aumento en la producción y contenido de carbohidratos en el grano en maíz (Khodary, 2004) y trigo (Hussein *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se realizaron estudios de análisis de crecimiento como complemento para explicar la respuesta fisiológica en el periodo de traslocación de fotosintetizados hacia el tubérculo en las plantas de papa infestadas con fitoplasma y tratadas con diferentes concentraciones de AS; a diferencia de los estudios tradicionales que normalmente relacionan los parámetros de crecimiento con la fenología del cultivo. Por ello solo se tomaron dos fechas de muestreo y un solo valor para cada parámetro de crecimiento. De los tratamientos con AS los que incrementaron la tasa de crecimiento del tubérculo (TCT) y el coeficiente de partición (CP) fueron principalmente 0.1 y 0.001 mM lo que representó una efectiva traslocación de fotosintetizados hacia el tubérculo, incrementando el porcentaje de materia seca en los minitubérculos de ambos experimentos y el porcentaje de almidón en el tratamiento *in vitro* con efectos a largo plazo (90 días de crecimiento en invernadero) en plantas enfermas. Larqué-Saavedra y Martin-Mex (2007) concluyeron que el SA aplicado al follage en bajas concentraciones (0.001–0.00001 mM) en plantas de importancia hortícola y ornamental induce efectos positivos en la bioproductividad de las mismas.

En estudios realizados por Tekaling y Hammes (2005) con diferentes variedades de papa el coeficiente de partición (CP) incrementó progresivamente a través del tiempo, esto indica la fracción incorporada de asimilados disponibles. El parámetro CP representa la proporción de la tasa de crecimiento del tubérculo con respecto a la tasa de crecimiento del cultivo y, por lo tanto, la eficiencia en la acumulación de materia seca en el tubérculo. Los resultados del presente ensayo revelaron que con un coeficiente de partición significativamente mayor, los tratamientos

*in vitro* con 0.1 y 0.001 mM de AS y los tratamientos por aspersión en invernadero con 0.01 y 0.001 mM de AS optimizaron los procesos de acumulación de biomasa mediante la translocación de fotosintetizados hacia el tubérculo, siendo éstos de mayor tamaño y calidad. Se demostró que el AS tiene efecto en la acumulación de biomasa no solo por aspersión directa en la planta (en invernadero) si no también al aplicarlo en el medio de cultivo *in vitro* antes del transplante a invernadero, lo que implica cambios metabólicos inmediatos y que permanecen durante el desarrollo de la planta.

Los experimentos realizados demostraron que el AS aplicado en concentraciones de 0.1 y 0.001 mM favorece la acumulación de biomasa en papa, como se ha reportado para otros cultivos de importancia económica; además reduce el daño producido por el estrés biótico y es un compuesto que actúa a corto y largo plazo, con eficiencia en diferentes formas de aplicación. Los resultados sugieren que la concentración que tuvo mayor actividad fisiológica fue 0.001 mM. De manera similar, esta concentración en otros trabajos incrementó el peso del fruto, productividad y translocación de azúcares de las hojas a los frutos en *Capsicum annuum* L. (Elwan y El-Hamahmy, 2009).

### **7.3 Optimización de la actividad enzimática y antioxidante**

Mucho se ha difundido que el efecto del AS durante respuestas a estrés biótico y abiótico está acoplado con la producción de ERO que además de tener acción directa sobre los patógenos, actúan como señales regulando el establecimiento de la reacción de defensa a nivel de la expresión génica o del fortalecimiento de la pared celular (Benezer *et al.*, 2008). En plantas infectadas por fitoplasmas, se reconoce un incremento en las ERO como producto del estrés oxidativo causado por el patógeno (Musetti *et al.*, 2005). En este trabajo se registró el mismo



efecto: las plantas con fitoplasma presentaron mayor contenido de  $H_2O_2$  durante todo el periodo de cultivo en invernadero en los dos experimentos (aspersión e incubación *in vitro*). La sobreproducción de  $H_2O_2$  en plantas libres de fitoplasma fue significativamente menor posiblemente porque éstas no manifestaron estrés oxidativo.

En este trabajo las plantas con fitoplasma presentaron mayor contenido de peroxidasas, mientras que las plantas tratadas con AS redujeron significativamente la actividad de estas enzimas e incrementaron el contenido de ascorbato reducido a lo largo del periodo de cultivo. Esto produjo la acumulación limitada de  $H_2O_2$  y balance en la respuesta antioxidante, la cual pudo haber permitido llegar al umbral de concentración donde resulta suficiente para restar la virulencia del patógeno, bajar las concentraciones del mismo ó bien activar en la planta genes de defensa que le permiten resistir al estrés biótico y reducir el daño.

Autores como Musetti *et al.* (2004 y 2005) reportaron que en hojas de manzanos y duraznos infectados por fitoplasma ocurrió una recuperación natural de la canopia (sin aplicación de ningún tratamiento) cuando los niveles de  $H_2O_2$  fueron mayores y la actividad de peroxidasas menor que en organismos sintomáticos posiblemente debido a la insuficiente inducción de POX y relativamente baja oxidación de glutatión reducido. Ellos hipotetizan que el  $H_2O_2$  puede impedir expansión y replicación del fitoplasma en hojas, inhibiendo directamente al patógeno ó generando otros radicales libres con actividad antimicrobiana. En la actualidad se sabe que tratamientos con  $H_2O_2$  inducen la acumulación de SA en plantas que induce a su vez la expresión de genes relacionados con la resistencia sistémica adquirida, que significa resistencia contra la expresión de síntomas pero no necesariamente contra el patógeno (Fodor *et al.*, 1997; León *et al.*, 1995; Neuenschwander *et al.*, 1995).

Algunos autores han propuesto que el AS inhibe la actividad de enzimas antioxidantes importantes como la ascorbato peroxidasa (APX) y la catalasa (CAT) que causan la acumulación de ERO (Holuigue *et al.*, 2007). En las plantas infectadas con fitoplasma la aplicación de ácido salicílico (0.001 mM) indujo la sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a corto y largo plazo durante la primera fase de crecimiento en invernadero (30 d). Los tratamientos con 0.1 y 0.001 también mantuvieron altos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin diferencias significativas (aspersión) o menores (incubación *in vitro* y posterior trasplante) con respecto al testigo positivo. Este incremento limitado “umbral” (descrito anteriormente) en las plantas es importante para la defensa contra el patógeno ya que el estado redox regula la actividad de la proteína NPR1, un activador esencial en las respuestas de defensa que dependen del ácido salicílico. Esta proteína se acumula en el citosol como un oligómero inactivo (mantenido así por enlaces de disulfuro) que después de la estimulación (dependiente de ERO) se reduce para liberar unidades monoméricas que migran hacia el núcleo e interactúan con el cofactor de transcripción reducido TGA1, el cual en turno activa la expresión de genes de defensa dependientes de ácido salicílico (Mou *et al.*, 2003).

En árboles de manzana la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se asoció con la desaparición de fitoplasmas y síntomas relacionados en hojas de árboles infectados y con síntomas. Los autores proponen que la recuperación ocurre en función de la constante acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tejidos el cual no es rápidamente removido debido a menor actividad antioxidante (POX; Musetti *et al.* 2004). En este trabajo se presentaron niveles significativamente menores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de los 60 días de cultivo en las plantas infectadas tratadas con AS con respecto a las plantas testigo positivo. En algunas concentraciones hubo incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sin embargo estuvo asociado al incremento en actividad POX. Estos datos demuestran la importancia de la aplicación de ácido salicílico en fases tempranas del crecimiento para elevar las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

que aunado al propio AS como metabolito secundario aminoran la patogenicidad del fitoplasma, su concentración y/o la activación de genes de defensa con efectos sobre el incremento en la productividad en presencia de estrés biótico. López-Delgado *et al.* (1998) reportaron que la aplicación de ASA en microplantas de papa durante un mes y posterior subcultivo ya sin el compuesto (seguido de un choque térmico de 42°C por 15.25 h) produjo la tolerancia a estrés térmico y proponen que existen efectos persistentes relacionados con cambios epigenéticos de considerable estabilidad y que la persistencia de dichos efectos pueden estar relacionados con el hecho de que las microplantas termotolerantes derivaron de células tratadas inicialmente en estadio meristemático. Por lo tanto se sugiere que el AS, de manera similar al ASA, actúa sobre células en estadios tempranos de diferenciación provocando cambios en la fisiología de la planta y por lo tanto tolerancia a diversos factores de estrés y que la aplicación de salicilatos *in vitro* puede ser una forma eficaz en estudios de tolerancia en papa.

Otra molécula que participa en respuesta al estrés biótico es el ácido ascórbico (AA), que actúa como un antioxidante que protege a la célula contra el daño producido por la infección. Se encuentra en altas concentraciones en varios compartimientos celulares, incluyendo el apoplasto. Éste compuesto detoxifica a la célula eliminando las ERO, protege o regenera los carotenoides y tocoferoles, y es el principal amortiguador redox en plantas (Noctor y Foyer, 1998). El contenido de ascorbato reducido (AA) fue significativamente mayor en las plantas con fitoplasmas, a los 30 y 60 días de crecimiento en invernadero. Esta tendencia estuvo asociada al incremento en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y mayor actividad POX, lo que manifestó el estado de estrés provocado por el fitoplasma y la respuesta antioxidante que tuvieron las plantas. Sin embargo, la activación de mecanismos de defensa en plantas infectadas fue insuficiente para atenuar o evitar el desarrollo de síntomas.

El contenido de AA en los tratamientos con AS tuvo la tendencia a disminuir en las dos formas de aplicación (tratamiento *in vitro* y aspersión en invernadero) durante los primeros 60 d, mientras que la sobreproducción de éste a los 30 d fue favorecedor probablemente para actuar tanto directamente sobre el patógeno como para la transducción de señales y activación de genes de defensa de la planta. Por otro lado, a los 60 y 90 días hubo pequeñas fluctuaciones en el contenido de POX, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DHA con tendencia general a disminuir con respecto al testigo positivo. Esto refleja el balance en el estado redox de las plantas tratadas con AS, posiblemente a los 60 días de cultivo las concentraciones de fitoplasma en las plantas habían reducido como producto del choque oxidativo registrado a los 30 días, asociado con la inducción de la defensa vegetal.

Cambios en el contenido de ácido ascórbico total (AA + DHA) pueden regular la expresión de genes PR y la resistencia sistémica adquirida (RSA) ya que actúa como una molécula de transducción de señales (Romero-Romero y López-Delgado, 2009). En plantas asperjadas en invernadero con AS, se presentó un incremento en el contenido de ascorbato total durante todo el periodo de cultivo (90d) con tendencia a disminuir en el tiempo, mientras que en la incubación de plantas en AS (*in vitro*) y posterior trasplante a invernadero solo a los 90 d fue significativamente mayor en los tratamientos, con respecto al testigo positivo, con tendencia a aumentar en el tiempo. Esto demuestra que el efecto del AS sobre el contenido de ascorbato total es diferente de acuerdo con la forma de aplicación obteniéndose distinta respuesta a corto y a largo plazo. En la condición de aplicación previa (*in vitro*) se registró menor contenido de AA durante los primeros 60 días pero el tratamiento incrementó la calidad de los tubérculos, ya que el contenido de materia seca, almidón y tamaño de los tubérculos fue mayor en las plantas tratadas con AS.

## 8. CONCLUSIONES

El AS aplicado en concentraciones de 0.1 y 0.001 mM en plantas de papa favorece la acumulación de biomasa y reduce el daño producido por el ataque de fitoplasma.

El AS actúa a corto y largo plazo y es igualmente eficiente si se aplica primero en cultivo *in vitro* o asperjado directamente en el invernadero.

La concentración con mayor actividad fisiológica fue 0.001 mM.

El balance oxidativo en las plantas de papa es un factor primordial en las respuestas de defensa para contrarrestar el daño producido por el patógeno y favorecer la eficiencia en los procesos de asimilación de fotosintatos en el tubérculo.

La aplicación de AS en fases tempranas del desarrollo (tratamiento *in vitro*) de la papa es fundamental para estimular la capacidad de respuesta al ataque patogénico.

## LITERATURA CITADA

- Alarcón-Rodríguez N., M., H. Lozoya-Saldaña, y E. Valadez-Moctezuma. 2009. Caracterización de ADN de clones de papa e identificación de fitoplasmas asociados al síndrome de la punta morada. *Agrociencia* 43: 357-370.
- Almeida L., I., H., J. A. Sánchez S., y J. A. Garzón T. 2004. Detección molecular de fitoplasmas en papa. Ed. Buenavista. Saltillo, Coah., México. pp: 4-13.
- Almeida L., I., H., O. A. Rubio C., y T. Zavala Q. 1999. Determinación de la implicación de fitoplasmas con la expresión sintomatológica de punta morada en papa (*Solanum tuberosum* L.). Desarrollo Agropecuario. Ed. Secretaría de Educación Pública. Monterrey, N. L., México. pp: 45.
- Alonso F., A. 2002. El cultivo de la patata. 2ª. ed. Mindi-Prensa, México 496 p.
- Anderson M., D., K. Prasad T., y R. Steward C. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant physiology*. 109: 1247-1257.
- Barvara D., J., A. Morton, F. Clark M., y L. Davies D. 2002. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology* 148: 157-167.
- Benavides-Mendoza A., A. M. Salazar-Torres, F. Ramírez-Godina, V. Robledo-Torres, H. Ramírez-Rodríguez, y R. Maiti. 2004. Tratamiento de semilla de chile con ácidos salicílico y sulfosalicílico y respuesta de las plántulas al frío. *TERRA Latinoamericana* 22 (1): 41-47.
- Benezer B. M., E. Castro M., E. García P. 2008. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 56-61.
- Billek G, F. P. Schmook. 1967. For the biosynthesis of gentisinaure. *Monatsch chemistry*. 98: 1651-1664.
- Camarena-Gutiérrez G, y R. de la Torre-Almaráz. 2007. Resistencia sistémica adquirida: estado actual. *Revista Chapingo, Serie ciencias forestales y del ambiente* 13: 157-162.
- Camarena-Gutiérrez G. 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo, serie ciencias forestales y del ambiente* 12: 25-30.

- Chang C. J., y I-M. Lee. 1995. Pathogenesis of diseases associated with mycoplasma-like organisms. En: Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, ed. Singh U., S., R. P. Singh, y K. Kohmoto. Elsevier. New York pp: 237–46.
- Chang C., J. 1998. Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. *Phytopathology* 88(12): 1347-1350.
- Chen H.J., W. C. Hou, J. Kuc, y Y. H. Lin. 2001. Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent excretion modes of salicylic acid in tobacco cell suspension culture. *The Journal of Experimental Botany* 52: 1219–1226.
- Christensen N., M., K. B. Axelsen, M. Nicolaisen, y A. Schulz. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *TRENDS in Plant Science* 11: 526-535.
- CIP. 2004. La papa en cifras, Producción, uso, consumo y comercialización. En: ULR <http://www.cipotato.org>. Centro Internacional de la Papa (CIP). Noviembre 2007.
- Davey J.E., Van Staden J., y DeLeeuw G.T.N. 1981. Endogenous cytokinin levels and development of flower virescence in *Catharanthus roseus* infected with mycoplasmas. *Plant Pathology* 19: 193–99
- De Wit P.J.G.M. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science* 2: 452-458.
- Dean F.B, J.R. Nelson, T.L. Gielser y R.S Laskan. 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Research* 11:1095–1099.
- Delledone M., Y. Xia, R.A. Dixon, y C Lamb. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease response. *Nature* 394: 585-588.
- Detter J.C., J.M. Jett, S.M. Lucas, E. Dalin, A.R. Arellano y M Wang. 2002. Isothermal strand-displacement amplification applications for high-throughput genomics. *Genomics* 80:691–698.
- Durner J., J. Shah, y D.F. Klessing. 1997. Salicylic acid and disease in plants. *Trends of Plant Science* 2: 266-274.
- Fariduddin Q., Hayat y A. Ahmad. 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* 41: 281–284.

- Fernie A., R., y L. Willmitzer. 2001. Molecular and Biochemical Triggers of Potato Tuber Development. *Plant Physiology* 127:1459-1465.
- Firrao G., K. Gibb y C. Streten. 2005. Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus* phytoplasma'. *Journal of plant pathology* 87: 249-263.
- Fodor, J., G. Gullner, A. L. Ádám, B. Barna, T. Koómvés, y Z. Király. 1997. Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiology* 114:1443-1451.
- Foyer C.H., J. Rowell y D. Wallker. 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplast and chloroplast during illumination. *Planta* 157: 239-244
- Garzón T. J. A., M. R. Bujanos, F. S. Velarde, J. A. Marín, T. V. M. Parga, G. M. C. Aviles, I. H. Almeyda L., A. J. Sánchez S., J. L. Martínez C., y J. A. Garzón C. 2004. *Bactericera (Paratriozia) cockerelli* Sulc., vector de fitoplasmas en México. En: Flores O. A., M. G. Gallegos y O. M. García (eds.) *Memorias del Simposio Punta Morada de la Papa*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro pp: 64-83.
- Gould W.A., y S. Plimpton. 1985. Quality evaluation of potato cultivars for processing . Ohio Agricultural Research and Development Center, Research Bulletin pp: 1172.
- Hayat Q., S. Hayat , Irfan, y A. Ahmad. 2009. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* doi:10.1016/j.envexpbot.2009.08.005.
- He F-T., I-M. Lee, R. W. Hammond, y Y. Zhao. 1998. Preliminary investigation of the role of protein kinase gene expression in the induction of phyllody symptoms on plants infected with phytoplasmas. *International Organization for Mycoplasmaoligy Conference, 12th*, Sydney, Australia pp: 184.
- Holuigue L., P. Salinas, F. Blanco, y V. Garretón. 2007. Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. En: Hayat S., y A. Ahmad (eds.). *Salicylic acid: a plant hormone*. Springer, AA Dordrecht, The Netherlands pp: 197-246.
- INIFAP 2000. Manual para la producción de papa en las sierras y valles altos del centro de México. Centro de investigación regional del centro. Programa Nacional de Investigaciones en el cultivo de la papa. No.1, 81pp.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group. 2004. '*Candidatus* phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize



- plant phloem and insects. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 54: 1243-1255.
- Janda E., E. Horváth, G. Szalai, y E. Páldi. 2007. Role of salicylic acid in the induction of abiotic stress tolerance. En: Hayat S., y A. Ahmad (eds), *Salicylic acid: a plant hormone*. Springer, AA Dordrecht, The Netherlands pp: 91-150.
- Kakizawa S., K. Oshima, H. Nishigawa, H.-Y. Jung, W. Wei, S. Suzuki, M. Tanaka, S. Miyata, M. Ugaki, P. J. Markham, y R. Townsend. 1979. Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents. Maramorosch K., y K. F. (eds.). *Academic*, New York pp: 413-445.
- Kirkpatrick B. C. 1992. Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. *En: Balows A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, y K. H. Schleifer (eds.). The prokaryotes*. Springer, New York. pp: 4050-4067
- Kuboyama T., C.C. Huang, X. Lu, T. Sawayanagi, T. Kanazawa, T. Kagami, I. Matsuda, T. Tsuchizaki, y S. Namba. 1998. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. *Molecular Plant Microbe Interaction* 11: 1031-1037.
- Larqué-Zaavedra A., R. Martín-Mex. 2007. Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. En: Hayat S., y A. Ahmad (eds.), *Salicylic acid: a plant hormone*. Springer, AA Dordrecht, The Netherlands. pp: 15-23.
- Lee I. M., D. E. Gundersen-Rindal, R. E. Davis, y I. M. Bartoszk. 1998. Revised clasification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.
- Lee I. M., K.D. Bottner, J. E. Munyaneza, G. A. Secor, y N. C. Gudmestad. 2004. Clover proliferation group (16SrVI), subgrup a (16SrVI-A) phytoplasma is probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon. *Plant disease* 88: 429.
- Levine A., R. Tenhaken, R. Doxon, y C. Lamb. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- León, J., M. A. Lawton, e I. Raskin. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 108:1673-1678.
- Leyva L. N. E., J. C. Ochoa S., D. S. Leal K., y J. P. Martínez S. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology* 48:1062-1068.

- Liefting L. W., M. Shaw, y B. C. Kirkpatrick. 2004. Sequence analysis of two plasmids from the phytoplasma beet leafhopper transmitted virescence agent. *Microbiology* 150: 1809-1817.
- López T. R., R. V. Camacho, y M. A. Gutiérrez M.A. 1998. Aplicación de ácido salicílico para incrementar el rendimiento agronómico en tres variedades de trigo. *Terra* 16 (1): 43-48
- López-Delgado H. e I. Scot. 1997 Induction of *in vitro* tuberization of potato microplants by acetylsalicylic acid. *Journal of Plant Physiology* 151: 74-78.
- López-Delgado H., J. F. Dat, C. H. Foyer e I. Scot. 1998. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany* 49(321): 713-720.
- Madriz-Ordeñana K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* 63: 22-32.
- Maramorosch K. 1998. Current status of potato purple top wilt. *International Journal of Tropic Plant Diseases* 16:61-72.
- Martinez C., J-C. Baccou, E. Bresson, Y. Baissac, J-F. Daniel, A. Jalloul, J-L. Montillet, J-P. Geiger, K. Assigbetsé, y M. Nicole. 2000. Salicylic Acid Mediated by the Oxidative Burst Is a Key Molecule in Local and Systemic Responses of Cotton Challenged by an Avirulent Race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiology* 122: 757-766.
- Martínez-Soriano J. P., N. E. Leyva-López, K. Aviña-Padilla, y J. C. Ochoa-Sánchez. 2007. La punta morada de la papa en México. *Claridades agropecuarias* Febrero: 27-33.
- Martínez-Soriano J. P., N. E. Leyva-López, M. E. Zavala-Soto, M. Berés y D. S. Leal-Klevezas. 1999. Detección molecular del agente causal del síndrome “bola de hilo” de la papa en semillas infectadas y asintomáticas. *Biotecnología aplicada* 16 93-96.
- McCoy, R. E., A. Caudwell, C. J. Chang, T. A. Chen, L. N. Chiykowski, M. T. Cousin, J. L. Dale, G. T. De Leeuw, D. A. Golino, K. J. Hackett, B. C. Kirkpatrick, R. Marwitz, H. Petzold, R. C. Sinha, M. Suguira, R. F. Whitcomb, I. L. Yang, B. M. Zhu, y E. Seemüller. 1989. *The mycoplasmas*, 5o vol. Academic Press, San Diego, California.
- Medvedev S. S. y I. V. Markova. 1991. Participation of salicylic acid in gravitropism in plants. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 316 1014-1016.
- Mou Z., W. H. Fan, y X. N Dong. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935-944.

- Murashige T., y F. Scoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Murphy A. M., A. Gilliland, C. E. Wong, J. West, D. P. Singh, y J. P Carr. 2001. Signal transduction in resistance to plant viruses. *European Journal of Plant Pathology* 107: 121-128.
- Musetti R., L. Sanita` di Toppi, M. Martini, F. Ferrini, A. Loschi, M. A. Favali, y R. Osler. 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology* 112:53–61.
- Musetti R., L. Sanita` di Toppi, P. Ermacora, y M. A. Favali. 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology* 94: 203–208.
- Neuenschwander, U., B. Vernooij, L. Friedrich, S. Uknes, H. Kessmann, y J. Ryals. 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant Journal* 8:227-233.
- Nicholson R. L., y R. Hammerschmidt. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Niederl S., T. Kirsch, M. Riederer, y L. Schreiber. 1998. Co-permeability of <sup>3</sup>H- labeled water and <sup>14</sup>C-labeled organic acids across isolated plant cuticles. *Plant Physiology* 116: 117–123.
- Park S.W., P. P. Liu, F. Forouhar, A. C. Vlot, L. Tong, K. Tietjen, y D. F. Klessig. 2009. Use of a synthetic salicylic acid analog to investigate the roles of methyl salicylate and its esterases in plant disease resistance. *Journal of Biology and Chemistry*. 284 (11): 7307–7317.
- Paxton J. D. 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology* 101:106-109.
- Poghosyan A., y V. Lebsky. 2009. Microscopía electrónica de barrido: una herramienta esencial para el diagnóstico de fitoplasmas. Congreso internacional de ciencias agrícolas. Baja California, México.
- Popova L., T. Pancheva y A. Uzunova. 1997. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. *Bulgary Journal of Plant Physiology* 23 85–93.

- Raffaele S., S. Rivas, y D. Roby. 2006. An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in *Arabidopsis*. FEBS letters 58: 3498-3504.
- Romero-Romero M.T., H. A. López-Delgado. 2009. Ameliorative Effects of Hydrogen Peroxide, Ascorbate and Dehydroascorbate in *Solanum Tuberosum* Infected by Phytoplasma. American Journal of potato reseatch. 86:218–226.
- Ros Barceló A. 1997. Lignification in plant cell walls. International Review of Cytology 176: 87-132.
- Ross J. R., K. H. Nam, C. John, D. Auria, y E. Pichersky. 1999. S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. Archives of Biochemistry and Biophysics 367: 9–16.
- Ryals J., A., U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H. Y. Steiner, y M. D. Hunt. 1996. Systemic acquired resistance. The Plant Cell 8:1009-1819.
- Salazar M.F. 1996. Los virus de la papa y su control. Centro internacional de la papa (CIP). Lima, Perú. 226p.
- Seemüller E., C. Marcone, U. Lauer, A. Ragozzino y M. Goschl. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. Journal of plant pathology 80: 805-810.
- Shakirova F.M. 2007. Role of hormonal system in the manifestation of growth promoting and antistress action of salicylic acid. En: Hayat S., y A. Ahmad (eds.), Salicylic acid: a plant hormone. Springer, AA Dordrecht, The Netherlands. pp: 69-89.
- Shen W., C., C. P, Lin. 1993. Production of monoclonal-antibodies against a mycoplasma-like organism associated with sweet-potato witches-broom. Phytopathology 83:671-675.
- Skalamera D., S. Jibodh; M. C. Heath. 1997. Callose deposition during the interaction between cowpea (*Vigna unguiculata*) and the monokaryotic stage of the cowpea rust fungus (*Uromyces vignae*). New Phytologist 136:511-524.
- Smart C., D., B. Schneider, C. L. Blomquist, L. J. Guerra, N. A. Harrison, U. Ahrens, K. H. Lorenz, E. Seemüller y B. C. Kirkpatrick. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16s-23s rRNA spacer region. Applied and Environmental Microbiology 62:2988-2993.

- Smart C.D., y B. C. Kirkpatrick. 1996. Identification of host plant genes whose expression is altered upon aster yellows phytoplasma infection. *IOM Letters* 4:274.
- Srivastava M.K. y U. N. Dwivedi. 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid, *Plant Science* 158: 87–96.
- Suzuki S., K. Oshima, S. Kakizawa, R. Arashida, H. Jung, Y. Yamaji, H. Nishigawa, Ugaki M., y S. Namba. 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(11): 4253-4257.
- Suzuki S., W. Wei. 2002. Minimal set of metabolic pathways suggested from the genome of onion yellows phytoplasma. *Journal of General Plant Pathology* 68:225–236.
- Tekalign T., y P. S. Hammes. 2005. Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth II. Growth analysis, tuber yield and quality. *Scientia Horticulturae* 105: 29–44
- Tran-Nguyen L.T.T. y K.S. Gibb. 2007. Optimizing Phytoplasma DNA Purification for Genome Analysis. *Journal of Biomolecular Techniques* 18:104-112.
- Uzunova A.N. y L.P. Popova. 2000. Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica* 38 243–250.
- Warm E., G. G. Laties. 1982. Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry* 21: 827-831.
- Yu Y.-L., Yeh K.-W., Lin C.-P. An antigenic protein gene of phytoplasma associated with sweet potato witch's broom. 1998. *Microbiology* 144:1257–1262.