

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

INDUCTORES DE RESISTENCIA A TuMV EN

Arabidopsis thaliana (L). Heynh

MARTHA LIDYA SALGADO SICLÁN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada: **Inductores de resistencia a TuMV en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh** realizada por la alumna **Martha Lidya Salgado Siclán** bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez

ASESOR



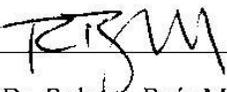
Dr. Juan Burgueño Ferreira

ASESOR



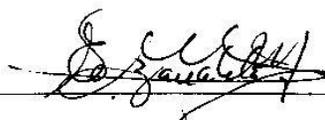
Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez

ASESOR



Dr. Roberto Ruíz Medrano

ASESORA



Dra. Emma Zavaleta Mejía

Montecillo, Texcoco, Edo. De México, 2012

INDUCTORES DE RESISTENCIA A TuMV EN *Arabidopsis thaliana* (L). Heynh

Martha Lidya Salgado Siclán Dra.

Colegio de Postgraduados, 2012

Las respuestas de la planta contra patógenos implican grandes cambios en la expresión de los mecanismos de defensa. Una de las primeras manifestaciones es la reacción de hipersensibilidad (HR) que deriva en muerte celular localizada en el lugar de la infección dando lugar a lesiones necróticas, a nivel celular se observa la producción de especies reactivas de oxígeno, fuga de electrolitos, peroxidación de lípidos, refuerzo de pared celular y presencia de fitoalexinas. La rápida activación transcripcional de genes relacionados con patogénesis (genes PR) se ve relacionada con la activación de la respuesta sistémica adquirida (SAR). Dicha resistencia actúa en toda la planta y es alimentada por rutas de señalización que sensibilizan a la planta contra una gama de patógenos y en sitios que no han estado en contacto con el patógeno. Varios compuestos implicados en la inducción de defensa son conocidos, incluyendo compuestos endógenos o derivados del patógeno tales como la membrana, fragmentos de pared celular y metabolitos secundarios. El ácido salicílico, el peróxido de hidrógeno y algunos compuestos sintéticos análogos a algunos de éstos son conocidos como inductores de la respuesta de defensa al ataque por patógenos. Efectos similares han sido observados con ciertos fertilizantes o mezclas a base de oligosacarinas y bioestimulantes al limitar las infecciones de algunos patógenos, sin embargo, su modo de acción en estos casos son poco conocidos.

Con el fin de conocer que respuestas de defensa induce el ácido salicílico (SA), peróxido de hidrógeno y el Kendal® (fertilizante foliar a base de NPK-oligosacarinas) se evaluó la acumulación de transcritos de genes relacionados con la defensa en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con el *Turnip mosaic virus* (TuMV) y los cambios en algunas de sus características fenotípicas.

Las aplicaciones de los productos sobre las plantas infectadas con el virus indujeron la acumulación de transcritos *PRI*, *MPK1* y *TGAI* más eficientemente que en las plantas

tratadas con los productos pero sin inocular, siendo el SA más eficiente en la producción de transcritos de *PRI*, el peróxido para *MPKI* y Kendal® para *TGAI*. El tratamiento con peróxido disminuyó los niveles de virus, en contraste los niveles más altos del virus se observaron en las plantas tratadas con Kendal®. Las imágenes con microscopia confocal con TuMV-GFP confirmaron estas observaciones y los resultados sugieren que el tratamiento con fertilizantes foliares puede no ser del todo eficaz contra el virus.

En general los valores más altos en diámetro de roseta, altura de inflorescencia, número de hojas, peso de roseta y peso de inflorescencia fueron registrados en plantas tratadas con los productos, mientras que en las plantas del testigo positivo (inoculadas con el virus y sin la aplicación de productos) fueron los más bajos, por lo que dichos productos muestran un efecto positivo en el control de la infección por TuMV en arabidopsis. El peróxido de hidrógeno fue el que mostró los valores más altos en las variables mencionadas, superando incluso al testigo negativo (plantas no inoculadas con el virus y sin tratamiento de productos).

Palabras clave: SAR, *PRI*, *MPKI*, *TGAI*, TuMV, inductores, resistencia.

TuMV RESISTANCE INDUCERS IN *Arabidopsis thaliana* (L). Heynh

Martha Lidya Salgado Siclán Dra.

Colegio de Postgraduados, 2012

The responses of plants against pathogens imply great changes in the expression of defense mechanisms. One of the first manifestations is the hypersensitivity reaction (HR) which derives into cellular death located at the site of infection, giving place to necrotic lesions. At a cellular level, the production of oxygen reactive species, loss of electrolytes, peroxidation of lipids, reinforcement of the cell wall, and the presence of phytoalexins can be observed. The quick transcriptional activation of genes related with pathogenesis (PR genes) is related with the activation of the systemic acquired response (SAR). Said resistance acts upon the whole plant and is fed by signal routes that sensitize the plant against a range of pathogens in places that have not come into contact with the pathogen. Several compounds implied in the defense induction are known, including endogenous compounds or those derived from the pathogen, such as the membrane, fragments of cell wall, and secondary metabolites. Salicylic acid, hydrogen peroxide, and some synthetic compounds analog to these are known to be inducers of the defense response to attack by pathogens. Similar effects have been observed with certain fertilizers or mixtures based on oligosaccharides and biostimulators by limiting infections from some pathogens. However, little is known about the way that they act in these cases.

In order to learn what defense response salicylic acid (SA), hydrogen peroxide, and Kendal® (NPK-oligosaccharide based foliar fertilizer) induce, the accumulation of gene transcripts related with the defense of *Arabidopsis* plants inoculated with *Turnip mosaic virus* (TuMV) was evaluated, as well as changes in some of their phenotypic characteristics.

The application of the products on plants infected with the virus induced the accumulation of *PRI*, *MPKI*, and *TGAI* transcripts more efficiently than did plants treated with the products but without inoculation, being SA the most efficient in the production of *PRI* transcripts, hydrogen peroxide for *MPKI*, and Kendal® for *TGAI*. The treatment with hydrogen peroxide decreased virus levels, contrastingly, the highest virus levels were observed in plants treated with Kendal®. The images using confocal microscopy with TuMV-GFP confirmed these observations and the results suggest that treatment with foliar fertilizers might not be effective against the virus.

In general, the greater values in rosette diameter, height of inflorescence, number of leaves, rosette weight, and weight of inflorescence were registered by plants treated with the

products, while the positive control plants (inoculated with the virus but without product application) had the lowest. Therefore, these products show a positive effect in controlling TuMV infection in Arabidopsis. Hydrogen peroxide showed the highest values in the mentioned variables, even outscoring the negative control (uninoculated plants and without product application).

Key words: SAR, *PRI*, *MPK1*, *TGAI*, TuMV, inductors, resistance.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México, país sufrido, origen de mi existencia y motivo de mis inquietudes.

Al CONACYT, por ser la vía de oportunidad de superación profesional.

A la UAEM, pilar de la educación mexiquense que me dio el impulso de crecer profesionalmente.

Al CINVESTAV (Biotecnología), institución que me abrigó de conocimientos y oportunidades de desarrollo intelectual.

Al Colegio de Postgraduados (Fitopatología), fuente de conocimiento, que me hizo amar mi profesión desde joven.

A la Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez, por la guía y amistad brindada, más allá de lo que es un consejero.

Al Dr. Roberto Ruiz Medrano, por creer en mí, apoyar mis inquietudes y formación de investigadora, por permitirme trabajar en su equipo. A su esposa Dra. Bety, que siempre me motivo a seguir adelante y ver todo con optimismo.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía, mujer que admiro por su tenacidad en el trabajo académico y sabias sugerencias.

Al Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, por sus atinadas observaciones y compartir su conocimientos.

Al Dr. Juan Burgueño Ferreira, por su puntual y finas sugerencias de mejora en este trabajo, por su confianza y amistad.

A mis amigos del lab 24, por llenar en mi, largos espacios de conocimiento, trabajo, juventud y travesuras.

A mis amigos del lab 209, por compartir momentos de trabajo, experiencia, conocimiento, compromisos y recreos.

A mis amigos, Yola, Angelita, Anita, Leo, Lidia, que siempre me han alentado a un en la distancia.

DEDICADO

A *Dios Jah*, por permitirme admirar y conocer de su creación.

A *mis padres: Roberto[†] y Estela*, por su fortaleza, amor y ejemplo de vida. Pilares de mi bonita familia!. Por formar en mi una mujer de lucha, con convicciones y un poquito rebelde.

A *mis hermanitos: Rosy, Male, Yola, (mis mujercitas) y Robe*, por los juegos de niños y las vivencias de adultos. Por su amor.

A *mis hijos: Carlos, Gely, Nadia, Isrra, Lili, Jeny, Daniel, David, Migue, Andy, Robertita y Romy*, por sus risas y bellos momentos en familia. Que ahora que se abren paso en la vida este trabajo sea ejemplo de que los sueños se alcanzan a pesar de las circunstancias!!

A *Lola[†]*, por haber sido la mujer fuerte y sufrida, que me dio sabios consejos, descansa en paz!!.

A *ROMÁN*, en especial a ti, por ser esposo, amigo y economista!! Por apoyarme a pesar de las diferencias. Por compartir conmigo mis sueños, alegrías y tristezas. Por aguantar mis ausencias que ahora son fruto de triunfo. Por forjar juntos un destino azul. Porque la vida nos unió para ser juntos cosas mejores, fuertes y felices. Te amo!!

CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL	iii
GENERAL ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE CUADROS	xv
ÍNDICE DE TABLA	xv
CAPÍTULO I	1
RESUMEN	1
ABSTRCT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Defensa de las plantas a patógenos	5
2.1.2 Defensas preformadas	5
2.1.3 Defensas inducidas	6
2.2 Inducción de resistencia sistémica	8
2.3 Proteínas relacionadas con patogénesis (PR)	12
2.4 Moléculas de señalización en defensa	17
2.4.1 Señalización dependiente de SA	18
2.4.2 Señalización dependiente de ácido jasmónico	20
2.4.3 Señalización por etileno	21
2.4.4 Interacción entre rutas de señalización	22
2.4.5 Transporte vía floema de moléculas de señalización	23
2.6. Genes de defensa involucrados en SAR dependientes de SA	26
2.7 Moléculas inductoras de defensa en agricultura	29

2.7 <i>Turnip mosaic virus</i> (virus mosaico del nabo, TuMV)	32
2.7.1 Genoma	32
2.7.2 Síntomas	34
2.7.3 Transmisión	35
2.7.4 Importancia económica	35
3. LITERATURA CITADA	37
CAPÍTULO II	
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE DEFENSA POR INDUCTORES DE RESISTENCIA EN ARABIDOPSIS INFECTADAS CON TuMV.	49
RESUMEN	49
ABSTRACT	50
1. INTRODUCCIÓN	51
2. OBJETIVO	53
3. HIPÓTESIS	53
4. MATERIALES Y MÉTODOS	54
4.1 Material vegetal y tratamientos	54
4.2 Extracción de RNA	54
4.3 RT-PCR punto final	55
4.4 RT PCR en tiempo real cuantitativo (qRT PCR)	56
4.5 Microscopía confocal	56
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
5.1 RT-PCR punto final	57
5.2 RT PCR en tiempo real cuantitativo (qRT PCR)	58
5.3 Microscopía confocal	61
6. CONCLUSIONES	64
7. LITERATURA CITADA	64

CAPÍTULO III	
EFFECTO DE COMPUESTOS INDUCTORES DE RESISTENCIA EN ALGUNAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE <i>A. thaliana</i> INFECTADA CON TuMV	67
RESUMEN	67
ABSTRACT	68
1. INTRODUCCIÓN	69
2. OBJETIVO	70
3. HIPÓTESIS	70
4. MATERIALES Y MÉTODOS	70
4.1 Material vegetal y tratamientos	70
4.2 Variables evaluadas y análisis estadístico	70
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
5.1 Características fenotípicas de las plantas tratadas con inductores	72
6. CONCLUSIONES	80
7. LITERATURA CITADA	81

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I		Pag.
Figura 1	Comparación de SAR e ISR. Tomado de Vallad y Goodman, 2004.	10
Figura 2	Síntesis de SA en plantas y sus derivados. Tomado de Vlot <i>et al.</i> , 2009.	19
Figura 3	Modelo de rutas de señalización de defensa. Modificado de Glazebrook, 2001.	28
Figura 4	Genoma de TuMV. UTR, región no traducible; P1, proteína 1; HC-Pro, componente auxiliar proteasa; P3, proteína 3; 6K1, proteína 1 6KDa; CI, proteína de inclusión citoplasmática cilíndrica; 6K2, proteína 2 6KDa; VPg, proteína de unión al genoma; NIa, proteína a de inclusión nuclear; Nib, proteína b de inclusión nuclear; CP, cubierta proteica. Tomado de: Walsh y Jenner, 2002.	33
CAPÍTULO II		
Figura 1	Análisis por qRT-PCR (método de $2^{-\Delta\Delta CT}$) de la acumulación de transcritos de los genes <i>PRI</i> , <i>MPK1</i> y <i>TGA1</i> en hojas de arabidopsis tratados con productos inductores de respuesta de defensa e infectadas con TuMV-GFP. SA= ácido salicílico (0.5 mM) + TuMV; PE= peróxido de hidrógeno (3 mM) + TuMV; K= Kendal® (450 μ L/200 ml) + TuMV; T+ = testigo positivo (TuMV solo); y T- = agua. A) <i>PRI</i> , B) <i>MPK1</i> , C) <i>TGA1</i> , D) TuMV-CP (método de curva standar). La barra vertical corresponde al error estándar de dos réplicas.	60
Figura 2	Análisis por qRT-PCR (método de $2^{-\Delta\Delta CT}$) de la acumulación de transcritos de los genes <i>PRI</i> , <i>MPK1</i> y <i>TGA1</i> en las hojas de arabidopsis tratadas solo con	61

productos inductores de defensa. A) *PRI*, SA= 0.5 mM; SA+V= SA 0.5mM + TuMV; T+ = TuMV; T- = agua. B) *PRI*; C) *MPKI*; D) *TGAI*. SA= ácido salicílico 0.5 mM; PE= peróxido de hidrógeno, 3 mM; K= Kendal® 450 µL / mL 200; T+= planta infectada con TuMV, T- = testigo negativo/agua. La barra vertical corresponde al error estándar de dos réplicas.

- Figura 3 Imágenes de microscopía confocal de hojas de plantas infectadas con TuMV-GFP y tratadas con diferentes productos inductores de defensa. A, TuMV-GFP + SA; B, TuMV-GFP + peróxido de hidrógeno; C, TuMV-GFP + Kendal®; D, TuMV-GFP; E, agua. A', B', C', D' y E muestran la autofluorescencia en rojo correspondiente a la clorofila. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Leica SP5 multifotónico confocal, objetivo 20X, zoom 2X, pinhole: 600 µm. **63**

CAPÍTULO III

- Figura 1 Síntomas inducidos por TuMV en plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas. A) roseta con síntomas de clorosis, amarillamiento y necrosis, B) roseta de planta sana, C) altura y vigor de planta infectada con el virus, D) altura y vigor de planta sana, E) hojas infectadas con diferentes síntomas. **72**
- Figura 2 Aspectos fenotípicos de la roseta de *A. thaliana* tratadas con productos inductores de resistencia e infectadas con TuMV-GFP a los 50 días posteriores a la inoculación. A) ácido salicílico (SA, 0.5mM) + TuMV; B) peróxido de hidrógeno (PE, 3mM) + TuMV; C) Kendal® (K, 450 µL/200mL) + TuMV; D) testigo positivo (T+, solo con TuMV); E) testigo negativo (T- = agua). **73**
- Figura 3 Comparación de medias con la prueba t de Student (Diferencias mínimas significativas, $p < 0.05$) de las características fenotípicas de las plantas tratadas con productos inductores de resistencia e infectadas con TuMV- **77**

GFP. Media de los tratamientos de la diferencia al día 10 – del día 3 posteriores a la inoculación (dpi). A) Diámetro de roseta, B) Altura de inflorescencia, C) Número de hojas de roseta. SA= ácido salicílico (0.5mM) + TuMV; PE= peróxido de hidrógeno (3mM) + TuMV; K= Kendal® (450 µL / 200mL) + TuMV; T+ = testigo positivo (solo TuMV); T- = testigo negativo (agua). Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). La I, indica que la media es estadísticamente distinta de la media del T+. La S, indica que la media es estadísticamente distinta de la media del T-. El *, indica que la media del T- es estadísticamente distinta de las medias del T+.

Figura 4

Comparación de medias con la prueba t de Student **78** (Diferencias mínimas significativas, $p < 0.05$) de las características fenotípicas de las plantas tratadas con productos inductores de resistencia e infectadas con TuMV-GFP. Media de los tratamientos de la diferencia al día 10 – del día 3 posteriores a la inoculación (dpi). A) Peso de roseta, B) Peso de inflorescencia. SA= ácido salicílico (0.5mM) + TuMV; PE= peróxido de hidrógeno (3mM) + TuMV; K= Kendal® (450 µL / 200mL) + TuMV; T+ = testigo positivo (solo TuMV); T- = testigo negativo (agua). Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Figura 5

Representación gráfica en dos planos de las cinco variables **80** con los dos principales componentes.

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I		Pag.
Cuadro 1	Similitudes y disimilitudes de SAR e ISR.	11
Cuadro 2	Familias reconocidas de Proteínas Relacionadas con Patogénesis (PRs).	13
Cuadro 3	Compuestos (potenciales) asociados con resistencia o señalización de defensa detectados en savia de floema.	25
 CAPÍTULO III		
Cuadro 1	Matriz de correlación de los parámetro evaluados con productos inductores de resistencia e infectadas con TuMV.	79
Cuadro 2	Significado y porcentaje de los dos primeros componentes principales de los parámetros evaluados con productos inductores de resistencia e inoculados con TuMV.	79

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II		
Tabla 1	Oligonucleótidos empleados para el análisis de expresión de genes de defensa.	55

CAPÍTULO I

RESUMEN

Las plantas emplean una elevada cantidad de señales originadas por los patógenos y el ambiente que les permiten reconocer al agresor y activar sus mecanismos de defensa. La detección de la presencia de un patógeno por parte de la planta da como resultado una cascada de eventos como reacción de hipersensibilidad, estallamiento oxidativo, síntesis de metabolitos secundarios, enzimas con actividad de degradación, fitoalexinas con actividad antimicrobiana, activación de rutas de señalización que conducen a la resistencia sistémica adquirida (SAR) así como en la expresión local y sistémica de genes de defensa. Una característica distintiva de la respuesta SAR es la capacidad de la planta de sintetizar SA, que activa la expresión de genes relacionados con defensa. Aunque SA es un metabolito producido en SAR, éste no es una señal que se mueve a larga distancia. Otros compuestos que sirven como señales de defensa son los derivados de SA, el ácido jasmónico (JA) y el (E) etileno. La resistencia inducida por patógenos es regulada por una red de interconexiones de rutas de defensa en donde el SA y JA/ET son moléculas claves de señalización.

En la naturaleza existe una diversidad de moléculas que participan en la resistencia a enfermedades que son promovidas con la aplicación exógena de elicitores como ácido salicílico, etileno, acibenzolar S-metil y oligosacáridos que se han empleado en diversos cultivos en campo e invernadero. En los últimos años se han desarrollado una serie de compuestos químicos cuya finalidad es promover o activar múltiples rutas de señalización de defensa intracelular que puedan proteger a los cultivos del ataque de patógenos. Estos compuestos inductores conocidos como elicitores desencadenan en las plantas una serie de mecanismos de defensa que dan como resultado una resistencia sistémica adquirida más allá del sitio de infección. La utilización de moléculas promotoras de los mecanismos de defensa en plantas, particularmente aquellas que promueven la expresión génica asociada a SAR, resultan ser una alternativa en el manejo de enfermedades en cultivos de importancia agrícola.

CHAPTER I

ABSTRACT

Plants use a great amount of signals originated by pathogens and the environment and which allow them to recognize the aggressor and activate their defense mechanisms. The detection of the presence of a pathogen by the plant results in a cascade of events like hypersensitivity reaction, oxidizing onset, synthesis of secondary metabolites, enzymes with degradation activity, phytoalexins with antimicrobial activity, activation of signaling routes that lead to systemic acquired resistance (SAR), as well as in the local and systemic expression of defense genes. A distinctive characteristic of the SAR response is the plant's capability to synthesize SA, which activates the expression of genes related with the defense. Although SA is a metabolite produced in SAR, it is not a long distance signal. Other compounds that serve as defense signals are those derived from SA, jasmonic acid (JA) and (E) ethylene. The resistance induced by pathogens is regulated by a network of interconnections of defense routes where SA and JA/E are key signaling molecules.

In nature there are a wide diversity of molecules that participate in disease resistance which are promoted with the exogenous application of elicitors like salicylic acid, acibenzolar S-methyl, and oligosaccharides that have been used on several crops both in the field and in greenhouses. In the last few years, a series of chemical compounds has been developed whose objective is to promote or activate multiple signaling intracellular defense routes that can protect crops from pathogen attack. These inducing compounds, known as elicitors, set off a series of defense mechanisms in plants that result in a systemic acquired defense beyond the site of infection. The use of molecules that promote defense mechanisms in plants, particularly those that promote the genic expression associated with SAR, turn out to be an alternative in disease control in agriculturally important crops.

1 INTRODUCCIÓN

Las plantas emplean una elevada cantidad de señales originadas por los patógenos y el ambiente que les permiten reconocer al agresor y activar sus mecanismos de defensa. La detección temprana de la presencia de un patógeno por parte de la planta da como resultado una cascada de eventos que puede culminar en una muerte celular en el sitio de la infección conocida como reacción de hipersensibilidad (Durrant y Dong, 2004).

Tras la detección temprana del patógeno la planta induce una serie de mecanismos entre los que se encuentran las rutas de señalización que conducen a la resistencia sistémica adquirida (SAR) la cual está involucrada en el estallamiento oxidativo, así como en la expresión local y sistémica de genes de defensa tales como PR1 (Neill *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2010). La inducción de estos genes considerados como marcadores de SAR, hacen pensar que dichas proteínas defensivas son las responsables de la resistencia inducida a un gran número de patógenos.

Existen una diversidad de moléculas que participan en la resistencia a enfermedades que son promovidas con la aplicación exógena de elicitores como ácido salicílico (AS), etileno (E), acibenzolar S-metil y oligosacáridos que se han empleado en diversos cultivos en campo e invernadero (Schreiber y Desveaux, 2008). Se ha observado que la aplicación exógena de ácido acetil salicílico (aspirina) en tabaco induce resistencia a las infecciones del *Tobacco mosaic virus* (TMV) (White, 1979). La tiamina puede activar la expresión de genes *PR-1* en tabaco y estimular la resistencia sistémica inducida local al TMV de una manera muy semejante al ácido salicílico (SA) (Malamy *et al.*, 1996). Plantas tratadas con poliaminas inducen la expresión de genes de proteínas relacionadas con patogénesis y proveen una significativa reducción en el tamaño de lesiones en hojas inoculadas con CMV en *Arabidopsis thaliana* (Mitsuya *et al.*, 2009). El ácido poliacrílico es capaz de inducir algunas proteínas que proveen resistencia a infecciones de TMV en plantas de tabaco (Gianinazzi y Kassanis, 1974). Algunos oligosacáridos como galactoglucomanona reducen significativamente los síntomas producidos por el *Tobacco necrosis virus* (TNV) en

calabaza (Slováková *et al.*, 2000). La aplicación del PS3, un glucano sulfatado en plantas de tabaco disminuye el tamaño y número de lesiones producidas por TMV (Ménard *et al.*, 2005). La aplicación del antibiótico peptabiol con actividad antiviral y extraído de hongos forestales, inhibe las lesiones locales de TMV en tabaco (Kim *et al.*, 2000). Las aplicaciones exógenas de SA o bien sus análogos (INA y BTH) resultan en un decreciente tamaño de lesión después de la infección viral en algunas especies de plantas (Uquillas *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Vasyukova y Ozeretskovskaya, 2007; Schreiber y Desveaux 2008; Loebenstein 2009; Carr *et al.*, 2010). Resultados similares se han obtenido usando otros inductores de resistencia tales como el metil jasmonato y oligosacáridos contra diversos virus y bacterias fitopatógenas (Schreiber y Desveaux, 2008).

En los últimos años se han desarrollado una serie de compuestos químicos cuya finalidad es promover o activar múltiples rutas de señalización de defensa intracelular que puedan proteger a los cultivos del ataque de patógenos (Schreiber y Desveaux, 2008). Estos compuestos inductores conocidos como elicitores desencadenan en las plantas una serie de mecanismos de defensa que dan como resultado una resistencia sistémica adquirida más allá del sitio de infección (Schneider *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997). Entre éstos se encuentran una mezcla de extractos vegetales, glutatión y oligosacarinas, estos últimos son fragmentos derivados de pared celular de plantas (Romanazzi *et al.*, 2009; Schreiber y Desveaux 2008).

La utilización de moléculas promotoras de los mecanismos de defensa en plantas, particularmente aquellas que promueven la expresión génica asociada a SAR, resultan ser una alternativa en el manejo de enfermedades en cultivos de importancia agrícola.

Con base en los antecedentes arriba mencionados el objetivo de la presente investigación fue: Estudiar el efecto de algunos productos comerciales como SA, Peróxido de Hidrógeno y Kendal® en la inducción de genes asociados a SAR en plantas de arabis infectadas con TuMV así como su efecto en algunas características fenotípicas de la planta.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Defensa de las plantas a patógenos

En la naturaleza, las plantas están constantemente desafiando a los patógenos mediante un amplio repertorio de respuestas que les permite de manera temprana reconocer, detener y contrarrestar la infección. Las plantas han desarrollado una gran cantidad de mecanismos de defensa para resistir la colonización por patógenos, estos mecanismos físicos y bioquímicos se clasifican en defensas pasivas (preformadas) e inducibles (Durrant y Dong, 2004).

2.1.2 Defensas preformadas

Este tipo de defensa incluye barreras físicas y químicas preformadas también llamadas constitutivas que son estructuras o sustancias químicas presentes en la planta antes de la infección del patógeno. Ejemplo de defensas morfológicas constitutivas son las ceras de la cutícula; el espesor y firmeza de las células de la epidermis; el tamaño, localización y forma de estomas y lenticelas que actúan como barreras que dificultan la penetración de algunos patógenos. La abundancia de tricomas en la superficie de la planta puede ejercer un efecto repelente al agua y por lo tanto reducir la posibilidad de colonización de la superficie por parte del patógeno (Madriz, 2002; Hematy *et al.*, 2009). Algunas características morfológicas de las plantas como color, forma, tipo de cutícula, ceras y vellosoidad de tallos y hojas pueden interferir o modificar el comportamiento del patógeno (Cuartero *et al.*, 2002).

Por otro lado, las defensas químicas presentes en la planta antes de que se lleve a cabo el reconocimiento, son de origen diverso con alta actividad biológica. Las plantas secretan una amplia variedad de sustancias con propiedades tóxicas o inhibitorias como fenoles, lignina, taninos, saponinas, antocianinas, flavonoides, glucocinatos, lectinas, glucanasas y quitinasas, entre otros (Kliebeinstein, 2004). En plantas resistentes a insectos se han identificado metabolitos como alcaloides, flavonoides y terpenos que pueden contrarrestar el crecimiento, desarrollo y fertilidad de insectos (Cuartero *et al.*, 2002).

2.1.3 Defensas inducidas

Los mecanismos de defensa inducidos se activan solamente como respuesta al ataque de patógenos durante el proceso de infección. La resistencia inducida por agentes bióticos es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios en el metabolismo de la planta (Madriz, 2002).

La respuesta hipersensible (RH) se produce en las interacciones incompatibles y consiste en una muerte celular localizada en el sitio de infección. Se caracteriza por un colapso de las células infectadas dentro de las primeras 24 h de la interacción debido a la variación de flujo iónico, fosforilación y desfosforilación. La RH es provocada por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) o también llamado estallamiento oxidativo, como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical súper óxido (O_2^-) así como la variación del flujo iónico y el incremento del óxido nítrico (NO) como moléculas químicas inducidas en este temprano proceso de defensa. Estas respuestas afectan al patógeno limitándolo al acceso de nutrimentos, o bien, por la liberación de sustancias inhibitoras para el patógeno (Laloi *et al.*, 2004; Asai y Yoshioka, 2009).

Frente a estas condiciones la planta estimula la síntesis de antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, la glutatión reductasa y la catalasa. El peróxido de hidrógeno como producto de ROS por sí mismo produce reforzamiento de la pared celular, lo que permite a la célula vegetal ser menos vulnerable a la acción de enzimas líticas de patógenos, además de su función como molécula señalizadora en defensa (Laloi *et al.*, 2004).

Como respuesta a estas señales se activan diversas rutas metabólicas que dejan a la planta en estado de alarma promoviendo de manera coordinada la producción de otras moléculas que activan la síntesis de metabolitos secundarios como polifenoles, fenilalanina amino liasa, enzimas con actividad de degradación como la β - 1,3 glucanasa, peroxidasa, quitinasas, quitosanasas y expresión de genes de defensa (Laloi *et al.*, 2004; Vidhyasekaran, 2008; Hernández, *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003; Smith y Boyko, 2007).

Los metabolitos secundarios de defensa son compuestos orgánicos importantes en el sistema defensivo de las plantas. Considerando la ruta biosintética que les da origen han sido agrupados en terpenos, alcaloides y fenilpropanoides. Los terpenos son unidades de isopreno como el ácido crisantemo-carboxílico, gomas, resinas que son liberados por la planta como un mecanismo de defensa que tienen actividad quimiosmótica (Buchanan *et al.*, 2000). Los alcaloides son compuestos nitrogenados a base de aminoácidos que pueden ser inducidos como respuesta al ataque de patógenos, o bien, ser parte constitutiva de las plantas. Algunos de estos compuestos son la nicotina, cafeína y α -solanina con actividad insecticida (Buchanan *et al.*, 2000). Los fenilpropanoides o también llamados compuestos fenólicos son un grupo muy variado química y funcionalmente y derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Se ha relacionado este grupo en las actividades de defensa como el endurecimiento de la pared celular (ligninas), actividad antimicrobiana (furanocumarinas, isoflavonoides y estilbenos), repelentes (taninos) y en procesos de señalización (ácido salicílico y ácido genticónico) (Taiz y Zeiger, 2006).

Las fitoalexinas son metabolitos de bajo peso molecular antimicrobianos de diversa naturaleza que se acumulan alrededor del sitio de infección, provienen de la ruta metabólica de fenilpropanoides, terpenoides o poliacetilenos y se sintetizan en respuesta a determinados patógenos y agentes abióticos. Algunas de las fitoalexinas conocidas son: resveratrol, giceolina I, pisantina, faseolina, medicarpina, risitina, falcarinol y capsidiol, entre muchas más (Mert- Türk, 2002; García y Pérez, 2003).

Las proteínas relacionadas con patogenicidad (PR) son inducidas en respuesta a la infección por patógenos y muestran alto grado de especificidad a éstos. La localización y distribución de las PR está relacionado directamente con la naturaleza de la infección. Se han clasificado en varias familias considerando la homología de secuencias, reacción con antisueros específicos, sondas de RNAm y actividad biológica. Debido a que las proteínas PR se acumulan en el punto de infección como en los tejidos distales al sitio primario, se denominan proteínas SAR. Varias PR como PR-1, -2, -3, -4 y -5 inhiben el crecimiento de hongos e infecciones por virus (Van Loon *et al.*, 2006; Vidhyasekaran, 2008).

Otro de los mecanismos de defensa inducidos es silenciamiento génico postranscripcional, que actúa tras la invasión de la planta por distintos virus. La planta es capaz de reconocer la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA) producto de la replicación viral (Mlotshwa *et al.*, 2002). Como respuesta a la invasión, la planta inicia la degradación del RNA viral mediante el complejo DICER, una enzima encargada de identificar y degradar el RNA de doble cadena en pequeños fragmentos de nucleótidos de 21 a 27, llamados siRNA, los cuales se vuelven el blanco del complejo enzimático RISC y los degrada. Los siRNA se convierten en una señal móvil encargada de amplificar el silenciamiento al resto de la planta (Mlotshwa *et al.*, 2008). Por lo tanto el silenciamiento génico postranscripcional logra limitar el número de células infectadas al degradar al virus en su etapa replicativa, así como la activación de señal de alarma tras la presencia de los siRNA en toda la planta.

2.2 Inducción de resistencia sistémica

En la literatura se indica que existen dos formas de resistencia inducida: la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y la Resistencia Sistémica Inducida (ISR), las cuales se distinguen considerando la naturaleza del elicitador y las rutas de activación que las envuelven (Vallad y Goodman, 2004).

Los conceptos de SAR e ISR se han usado de manera indistinta creando confusión en su terminología y significado. En el 1^{er} Congreso Internacional sobre Inducción de Resistencia a Enfermedades en Plantas celebrado en Grecia en 1999, se discutió ampliamente este asunto aceptando ambos términos como sinónimos lo cual ha creado confusión en la comunidad científica ya que se trata de distintos fenómenos y diferentes rutas de señalización (Tuzun, 2006). Para algunos investigadores los dos términos no deben ser sinónimos por generar grandes confusiones, mientras que unos investigadores aceptan mantener esta sinonimia otros proponen el uso de las siglas PGPR al referirse a la ISR (Tuzun, 2006). Actualmente, el término de resistencia inducida en plantas, solamente se emplea para identificar el fenómeno en su forma general, sin ahondar en un tipo específico de expresión o regulación de defensa en las plantas (Tuzun, 2006).

En 1960, Ross demostró que las plantas de tabaco inoculadas con el virus causante del mosaico del tabaco (TMV) desarrollaban resistencia a una infección secundaria en tejidos distantes del punto de infección. A la diseminación de la resistencia a través de los tejidos de la planta se le llamó “Resistencia Sistémica Adquirida” (SAR), misma que brinda protección a la planta contra la variante o especie de virus, además de hongos, bacterias y oomicetos (Sticher *et al.*, 1997; Durrant y Dong, 2004), es decir contra un amplio espectro de microorganismos fitopatógenos. Dicha resistencia puede ser activada en muchas especies de plantas por algunos patógenos así como activadores sintéticos donde se presume que se genera una señal móvil a larga distancia. La resistencia conferida puede ser de larga duración y algunas veces por toda la vida de la planta, dependiendo de las condiciones nutrimentales y ambientales. Además de desarrollarse de manera local como en sitios alejados al punto inicial de infección (Sticher *et al.*, 1997; Durrant y Dong, 2004). Vallad y Goodman (2004) mencionan puntualmente algunas características en las que se pueden diferenciar SAR e ISR: SAR es inducida por un amplio de elicitors bióticos o abióticos, induce proteínas PR, utiliza rutas de señalización que pueden involucrar al SA y su señal viaja sistémicamente a sitios distales de donde ocurrió la infección. ISR es potencializada por bacterias rizógenas promotoras del crecimiento (PGPR), no involucra la síntesis de proteínas PR y la ruta de señalización la realiza a través de jasmonatos y etileno (Fig. 1).

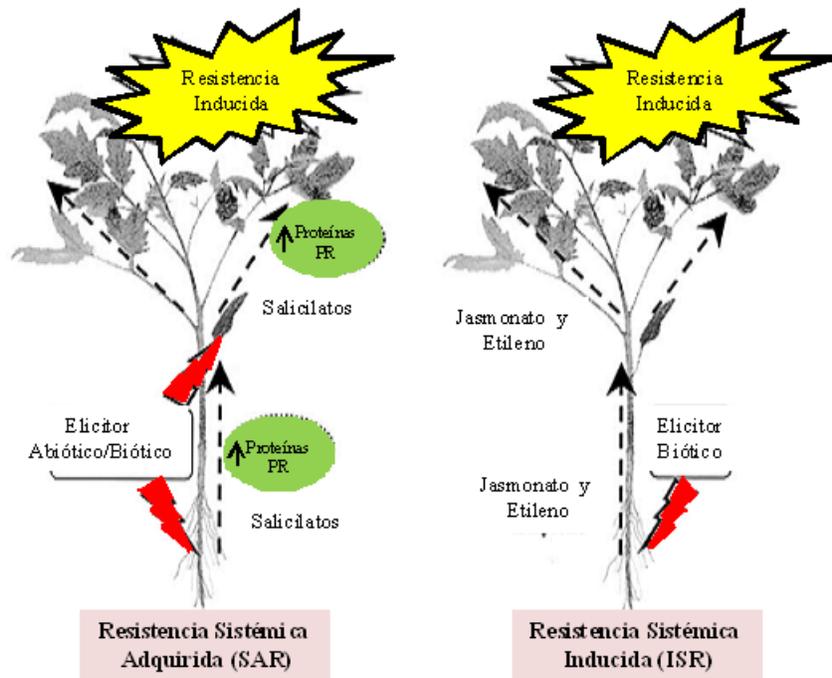


Figura1. Comparación de SAR e ISR. (Tomado de Vallad y Goodman, 2004).

Para entender SAR es necesario reconocer varios procesos durante su desarrollo: a) percepción de elicitors en el sitio de la infección; b) respuesta de hipersensibilidad por parte de la planta como reconocimiento a la invasión; c) generación de señales metabólicas transmisibles; d) movimiento de la señal a través del sistema vascular; e) percepción y amplificación de la señal a distancia con un mayor estado de resistencia; f) reprogramación transcripcional que promueve la síntesis *de novo* de SA y g) expresión de genes de SAR (Attaran *et al.*, 2009). Con base en la literatura se pueden encontrar grandes similitudes y diferencias en estos dos mecanismos de resistencia inducida como se señalan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Similitudes y diferencias entre SAR e ISR.

SIMILITUDES		
SAR	ISR	FUENTE
Protección local y sistémica	Protección local y sistémica	Sticher <i>et al.</i> , 1997; Durrant y Dong,2004
Protección no específica	Protección no específica	Durrant y Dong,2004; Sticher <i>et al.</i> , 1997
Protege a la planta por largo tiempo	Protege a la planta por largo tiempo	Durrant y Dong,2004
Efectivo en una amplia gama de especies de plantas	Actúa sobre ciertas especies y genotipos de plantas.	Vallad y Goodman, 2004
Elicitor biótico o abiótico en raíz o parte aérea de la planta.	Elicitor biótico en raíz por bacterias <i>P. fluorescens</i> (promotoras del crecimiento)	Durrant y Dong,2004; Glazebrook,2001 Vallad y Goodman, 2004
NPR1 interviene en la ruta de señalización de SAR	NPR1 interviene en la ruta de señalización de ISR	Vallad y Goodman, 2004; Durrant y Dong, 2004 Hammond y Rosack, 2003
DIFERENCIAS		
Activación de un juego de genes que inducen la producción de PR, incluyendo PR-1 que sirve como marcador molecular	No hay activación de PR	Vallad y Goodman 2004; Durrant y Dong, 2004; Glazebrook, 2001
El incremento en los niveles de SA está asociado en SAR como señal endógena	El incremento en los niveles de JA y E están asociados en ISR como señal	Vallad y Goodman, 2004 Glazebrook,2001
La inducción de la infección primaria está siempre asociada con tejido necrótico	-----	Kiraly <i>et al.</i> , 2007
Respuesta hipersensitiva (HR) es requisito para disparar SAR.	No se observa RH en la planta	Kiraly <i>et al.</i> , 2007; Glazebrook,2001; Durrant y Dong, 2004
-----	Las PGR estimula el desarrollo de la planta	Kiraly <i>et al.</i> ,2007
Genes involucrados en la ruta de señalización SAR: <i>EDS5</i> , <i>EDS12</i> , <i>PAD4</i> , <i>SID2</i> , <i>DTH9</i> y factores de transcripción TGA/ WRKYs	Genes involucrados en la ruta de señalización ISR: <i>ED8</i> , <i>JAR1</i> , <i>CO11</i> , <i>ISR1</i> , <i>EDS4</i> , <i>EDS10</i> .	Hammond y Rosack, 2003
-----	Ausencia de efectos tóxicos del agente inductor	Van Loon <i>et al.</i> , 1998
-----	Supresión de la resistencia inducida por una aplicación previa de inhibidores específicos, tales como el actinomicin D, el cual afecta la expresión de genes de la planta.	Van Loon <i>et al.</i> , 1998
-----	Determinantes bacterianos inductores de ISR: lipopolisacáridos, sideróforos, factores reguladores de hierro	Van Loon <i>et al.</i> , 1998

2.3 Proteínas relacionadas con patogénesis (PR)

Las proteínas relacionadas con patogénesis (PR), se les ha definido como proteínas que son inducidas en respuesta a la infección por omicetos, hongos, bacterias, virus o ataque de insecto (Van Loon *et al.*, 2006) en una gran cantidad de cultivos. Debido a que las PR's se acumulan en el punto de infección como en los tejidos distales al sitio primario, se denominan proteínas SAR.

Aunque las PR's son expresadas en plantas enfermas, su síntesis puede ser inducida por reguladores de crecimiento como etileno, ácido absícico, ácido indol acético; varios productos biológicos como toxinas y enzimas; factores ambientales tales como: temperatura, luz y ozono, así como daño mecánico como heridas (Vidhyasekaran, 2008).

En algunos casos, las PR's han sido detectadas en tejido sano sin ningún estrés. Varias PR's aparecen en la madurez en plantas como papa y tabaco, durante la floración en órganos como raíz, semilla y flores y de manera constitutiva en hojas de frijol. La expresión constitutiva de PR-1, PR-2 y PR-5 han sido reportadas en algunas variedades de *Solanum spp.* (Vidhyasekaran, 2008).

Se han clasificado en 17 familias de PR's y su localización se ha determinado en espacios intra y extracelulares. Las PR's poseen actividad antimicrobiana y están involucradas en la señalización de defensa. Algunas PR's son reconocidas con actividad de glucanasas, quitinasas, peroxidasas, ribonucleasas, oxalato-oxidadasas, inhibidoras de proteínas, así como en la transferencia de lípidos (Van Loon *et al.*, 2006; Vidhyasekaran, 2008). En el cuadro 2 se indican algunas funciones generales de las PR's.

Cuadro 2. Familias reconocidas de Proteínas Relacionadas con Patogénesis

Familia PR	Miembro tipo	Planta en la que fue aislada	Propiedades	gen
PR-1	Tabaco PR-1a	Arroz, cebada, maíz, perejil, tabaco, tomate	Antifungal	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tabaco PR-2	Arroz, cebada, frijol, garbanzo, maíz, papa, pepino, remolacha, repollo, soya, tabaco, tomate trigo	Beta-glucanasa 1,3-	<i>Ypr2</i>
PR-3	Tabaco P, Q	Arroz, colza, maíz, pimienta, remolacha, tomate	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI y VII	<i>Ypr3, Chia</i>
PR-4	Tabaco R	Caucho, tabaco, tomate	Quitinasa tipo I y II	<i>Ypr4, Chid</i>
PR-5	Tabaco S	Arroz, avena, cebada, papa, sorgo, tabaco, tomate, trigo	Semejante a taumatina	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomate inhibidor I	Cebada, papa, tabaco, tomate	Inhibidor de proteinasas	<i>Ypr6, Pis ('Pin')</i>
PR-7	Tomate P69	Tomate	Endoproteinasa	<i>Ypr7</i>
PR-8	Quitinasa calabaza	Pepino cohombro	Quitinasas tipo III	<i>Ypr8, Chib</i>
PR-9	Peroxidasa formada de lignina tabaco	Arroz, tabaco, tomate, trigo	Peroxidasa	<i>Ypr9, Prx</i>
PR-10	Semejante a PR1	Arroz, arveja, espárrago, frijol, papa, perejil, soya	Ribonucleasa	<i>YPr10</i>
PR-11	Quitinasa Clase V tabaco	Tabaco	Quitinasas tipo I	<i>Ypr11, Chic</i>
PR-12	Rábano Rs-AFP3	Arabidopsis thaliana, arveja, rábano	Defensina	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Cebada	Tionina	<i>Ypr13, thi</i>
PR-14	Cebada LTP4	Arroz, cebada, pimienta	Proteína de transferencia de lípidos	<i>Ypr14, Ltp</i>
PR-15	OxOa (germin) cebada	Cebada	Oxalato-oxidasa	<i>Ypr15</i>
PR-16	OxOLP cebada	Cebada, trigo	Semejante a oxalato - oxidasa	<i>Ypr16</i>
PR-17	PRp27 tabaco	Cebada, tabaco, trigo	Peptidasa	<i>Ypr17</i>

Fuente: Modificado de Vidhyasekaran, 2008; Van Loon *et al.*, 2006

PR-1 han sido detectadas en un gran número de especies, se reportan dos isoformas debido a su origen químico denominadas ácidas y básicas detectadas en plantas infectadas por patógenos. Poseen un peso molecular entre 14 a 16 kDa. Se han encontrado en la pared celular y en la capa externa de ésta. La detección de la proteína reforzando la pared celular, sugiere su papel en la prevención de la dispersión del patógeno (Santén *et al.*, 2005). **PR-2** tienen actividad β – 1,3-glucanasa. Se presentan en forma constitutiva en las plantas; sin embargo su sobreexpresión se ha observado en plantas afectadas por patógenos. Existen tres clases: clase I localizada en vacuola por lo que la hace básica y las II y III son ácidas encontrándose en espacios extracelulares. La alta expresión del gen1 que sintetiza la básica β – 1,3-glucanasa está envuelta en mecanismos de defensa contra *Penicillium digitatum* en cítricos (Porat *et al.*, 2002). **PR-3**, tiene actividad de quitinasa. Las quitinasas son endo β -1, 4-gluocosaminidasa, las cuales hidrolizan los enlaces β -glicósidos reduciendo la glucosaminidina a quitina o peptidoglucan. Se conocen 7 clases de quitinasas, algunas ácidas y otras básicas. La PR-3 es inducida por patógenos como el *Alfalfa mosaic virus* (AMV) en hojas de frijol (Margis-Pincheiro *et al.*, 1993). **PR-4**, están clasificadas en 2 tipos, la clase I que es inducida por heridas y la clase II muestra similar actividad con las quitinasas ácidas. La infección de semillas de maíz con *Fusarium moniliforme* induce la producción de proteínas PR-4, asociando la presencia de estas PR's en respuesta de defensa contra patógenos (Bravo *et al.*, 2003). **PR-5** proteínas parecidas a la taumatina (TLPs), la cual se encuentran presentes en la fruta del árbol *Thaumatococcus danielli*. Se reconocen 3 subclases de PR-5, basado en su punto isoeléctrico, básicas, ácidas y neutras. Las TLPs son inducidas rápidamente por estrés biótico y abiótico. La funcionalidad de las PR-5 no se conoce del todo, sin embargo se conoce que alteran la permeabilidad de la membrana de hongos, aunque también se reconoce su actividad de β – 1,3-glucanasa y quitinasa (Hernández *et al.*, 2005). **PR-6** son potentes inhibidores de proteínas (PIs) y se clasifican de acuerdo al tipo de proteína que inhiben en: Proteinasas-serina, proteinasas- cisteínas, proteinasas-aspárticas y metaloproteínas. El elicitor glucano aislado de la pared celular de *Phytophthora sojae* es capaz de inducir PR-6 en soya (Graham *et al.*, 2003). **PR-7** muestran actividad de endoproteinasa. Se reconocen la Pr-69 ó P70 inducida después de la inoculación en hojas de tomate por *Cladosporium fulvum*. Otras proteínas de esta familia se han aislado como P69B inducida por *Phytophthora*

infestans, *Pseudomona syringae* y el viroide causante de la exocortis de los cítricos (Zhao *et al.*, 2003). **PR-8** incluye proteinasas quitinasas clase III. Estas quitinasas se distinguen de otras por su secuencia y la preferencia del sustrato así como por su naturaleza básica o ácida. Las quitinas PR-8 de tabaco, calabaza y remolacha proporcionan resistencia contra el hongo *Rhizoctonia solani*. Su efectividad depende de la especie de planta y la sensibilidad del patógeno (Van Loon *et al.*, 2006). Algunas **PR-9** se expresan durante la patogénesis, sin embargo muchas de ellas son de carácter constitutivo en las plantas con actividad de peroxidasas. Las PR-9 inducidas tienen naturaleza ácida y básica son un tipo específico de peroxidasas que pueden actuar en el reforzamiento de la pared celular y aumentan la resistencia contra un gran número de patógenos. Las infecciones por *Heterodera avenae* en plantas de trigo inducen 20 genes que expresan diferentes peroxidasas. Las peroxidasas de localización apoplástica desempeñan funciones diferente en cantidad y velocidad de respuesta en las plantas infectadas (Simonetti *et al.*, 2009). **PR-10** son proteínas que se pueden encontrar en los sitios intracelulares. Estas proteínas son inducidas por patógenos y algunas han mostrado actividad de ribonucleasa. La proteína CaPR-10 con actividad ribonucleasa, es capaz de pegarse al RNA viral de TMV y actuar como una proteína antiviral que puede inhibir la penetración y replicación del virus (Park *et al.*, 2004). **PR-11** han sido detectadas en tabaco y muestran ser inducidas por varios tipos de estrés inclusive por una infección viral. No muestran semejanza con proteínas de tipo quitinasa de plantas, pero tienen cierta similaridad con exoquitinasas de algunas bacterias. Las PR-11 con actividad de quitinasa específica en tabaco son codificadas por una pequeña familia multigénica. **PR-12** conocidas como defensinas son una familia de pequeña proteínas, usualmente básicas que son ricas en residuos de cisteína con enlaces disulfuro, son también llamadas γ -tioninas. Todas las defensinas (γ -tioninas) contienen menos de 50 aminoácidos de longitud y contienen 8 residuos de cisteína. Algunas defensinas son constitutivas, sin embargo otras se expresan exclusivamente en patogénesis. La defensina inhibe el desarrollo de hifas de *Phytohthora infestans* en papa (Solis *et al.*, 2007). **PR-13** es un grupo de proteínas básicas, ricas en cisteínas, comúnmente expresadas constitutivamente e inducidas en patogénesis, denominadas tioninas con actividad antimicrobiana, se ha demostrado su actividad contra hongos como *Fusaiurm oxyporum*. El gen de *Arabidopsis* *THI 2.1* relacionado con estas proteínas es expresado por la

infección de hongos fitopatógenos (Epple *et al.*, 1997). **PR-14** son pequeñas proteínas involucradas en transferencia de lípidos en la membrana celular. Son solubles de carácter básico que actúan como acarreadores de proteínas con los ácidos grasos y la coenzima A. Son importantes en la respuesta de defensa contra patógenos, salinidad, baja temperatura y resistencia a sequía. Los transcritos de los genes *CALTP*, un grupo de genes que sintetizan las proteínas de transferencia de lípidos, se acumulan diferencialmente en las células del floema de hojas, tallo y frutos en Chile cuando son infectadas por *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Phytophthora capsici* y *Coletotrichum gloeosporoides* (Jung *et al.*, 2003). **PR-15**, conocida como proteína germin, es un enzima oxalato-oxidasa (OXO) que degrada el ácido oxálico, producido por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, en dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno. La actividad OXO limita la extensión de la lesión causada por el hongo. El desarrollo de plantas transgénicas que expresan OXO ha permitido la generación de plantas resistentes de soja a la enfermedad (Donaldson *et al.*, 2001). **PR-16**, proteína parecida a oxalato oxidasa (GLP, Germin-like protein) son glicoproteínas asociadas a la matriz extracelular. Su función no es del todo clara pero algunas poseen actividad enzimática (oxalato oxidasa o superóxido dismutasa), otras parecen ser proteínas estructurales, mientras que otras actúan como receptores, sin embargo todas se asocian a alguna condición de estrés (Bernier y Berna, 2001). **Pr-17** esta familia ha sido recientemente adicionada al grupo de proteínas PR. Su síntesis es inducida por el hongo *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* seis horas después de la inoculación. Las proteínas codificadas como HvPR-17a y HvPR-17b pertenecen a una nueva familia de proteínas relacionadas con patogénesis. Estas proteínas se acumulan en el apoplasto del mesófilo después de la infección del hongo, así como en la epidermis de las hojas que son invadidas por éste. La familia también incluye a dos proteínas aisladas de tabaco y trigo que son afectadas por virus y hongos, respectivamente (Christensen *et al.*, 2002). **PR-18**, es una nueva proteína inducida por SA y patógenos. Esta familia se propone como un carbohidrato oxidasa aislada de *Helianthus annuus* (Ha-CHOX) y *Lactuca sativa* (Ls-CHOX) que libera peróxido de hidrógeno como producto de reacción. Los transcritos de esta enzima en girasol son inducidos por la adición de SA y la inoculación de patógenos pero no por etileno ni ácido jasmónico. La inoculación de *Pectobacterium carotovorum* pv.

carotovorum en plantas transgénicas de tabaco sobreexpresaron Ha-CHOX tornándose resistentes a la infección por esta bacteria (Custers *et al.*, 2004).

2.4 Moléculas de señalización en defensa

La señalización de defensa está conducida por diversas moléculas que le permiten a la planta responder a un amplio rango de estímulos que involucran, entre otros, proteínas activadas por mitogénicos (MAP cinasas), fosfolípidos transmembranales, canales aniónicos de Cl^- y NO_3^- , moléculas de alcalinización extracelular/acidificación-citoplásmica, especies reactivas de oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot), radicales de NO y sistemas de señalización por SA, JA, ET, ácido absísico (ABA) y ácidos grasos (Vidhyasekaran, 2008). La principal función de estas moléculas de señalización consiste en transducir los estímulos extracelulares reconocidos por receptores de la célula a un gran número de moléculas blanco, que en completa coordinación integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo externo agresor (Vidhyasekaran, 2008).

Las moléculas de señalización como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) son las más reconocidas en defensa (Hammond-Kosack y Parker, 2003). Estas rutas de defensa antagonicas no funcionan independientemente y forman parte de una red de señalización compleja que determina la respuesta de defensa de la planta (Glazebrook, 2005). Sin embargo existen otras hormonas como ABA, ácido giberélico (GA) y citoquininas (CK) así como brasinoesteroides (BR) que están implicados en la señalización de defensa en plantas (Bari y Jones, 2009).

El SA y JA/ET son importantes moléculas de señalización en respuestas de defensa a patógenos. La activación de estas respuestas difiere del tipo de patógeno invasor del que se trata. Por ejemplo la señalización mediada por SA provee protección contra patógenos biótropos como hongos, oomicetos, bacterias y virus tales como *Pseudomonas syringae*, *Peronospora parasítica*, *Turnip crinkle virus* (TCV) y *Cucumber mosaic virus* (CMV). En contraste, la señalización por JA/ET activa la respuesta de defensa contra hongos necrótrofos tales como *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola* (Glazebrook, 2005).

Por otro lado, el JA/ET actúan sinérgicamente para inducir la expresión de ciertos genes de defensa tales como *PDF1.2*, *PR-3* y *PR-4*. Mientras que SA y JA pueden actuar sinérgicamente o antagónicamente durante la activación de genes de defensa ante un patógeno específico (Devadas *et al.*, 2002). Por lo tanto la resistencia inducida por patógenos es regulada por una red de interconexiones de rutas de defensa en donde el SA y JA/ET son moléculas claves de señalización (Glazebrook, 2005).

2.4.1 Señalización dependiente de SA

Una característica distintiva de la respuesta SAR es la capacidad de la planta de sintetizar SA, que activa la expresión de genes relacionados con defensa (Loake y Grant, 2007). Aunque SA es un metabolito producido en SAR, éste no es una señal que se mueve a larga distancia. Otros compuestos que sirven como señales de defensa son los derivados de SA y el ácido jasmónico (JA); sin embargo sigue siendo controvertida su función (Attaran *et al.*, 2009).

El SA es un compuesto que interviene en distintos procesos biológicos además de ser sintetizado por la planta cuando es atacada por patógenos biótrosos. Participa además en la germinación de la semilla, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés biótico y nodulación en leguminosas (Vlot *et al.*, 2008). El SA puede ser generado por dos vías enzimáticas distintas dependientes del corismato. En la primera ruta, el corismato es transformado a fenilalanina que a su vez es convertido a ácido cinámico mediante la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). Seguido a esta reacción, se forma el ácido benzoico para terminar en SA. En la segunda ruta, el corismato es convertido a isocorismato mediante la participación enzimática de isocorismato sintasa (ICS) y este último a SA mediante la enzima isocorismato piruvato liasa (IPL) (Fig.2). La mayoría del SA inducido por patógenos es sintetizado por la ruta del isocorismato que se localiza en el cloroplasto (Wildermuth *et al.*, 2001).

El SA y sus derivados biológicos activos como el 0-β- Glucósido de SA (SAG), el éster de saliciloil glucosa (SGE), el metil salicilato (MeSA) y el 2,5 dihidróxido benzóico (ácido

gentísico) son sintetizados por la infección de patógenos o son capaces de inducir la expresión de proteínas PR así como también actuar como señal móvil a larga distancia en SAR (Sang-Wook *et al.*, 2007; Vlot *et al.*, 2008).

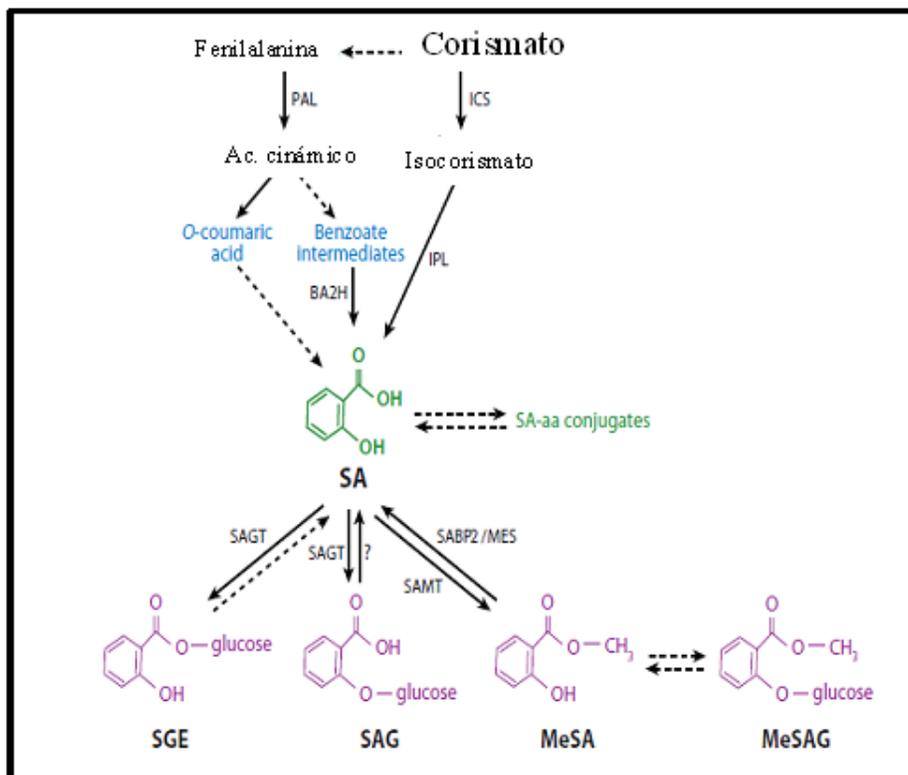


Figura 2. Síntesis de SA en plantas y sus derivados. Tomado de Vlot *et al.*, (2009).

El SA es una molécula importante en la señalización de defensa a virus, bacterias y hongos fitopatógenos (Vlot, *et al.*, 2008). Tras la infección viral se encuentran altos niveles de SA y/o su compuesto volátil MeSA, se incrementa la expresión de genes y SAR (Shulaev, *et al.*, 1997). El SA es esencial en la ruta de transducción de señales que conducen a la activación de genes que codifican PR's (Vlot *et al.*, 2008). Por el contrario, la inhibición de su síntesis o acumulación mediante mutantes, resulta en el bloqueo de la respuesta de defensa. De esta manera se constató que la acumulación de SA sirve como una señal natural que media diferente respuesta de defensa en las plantas.

Uno de los principales componentes que regulan la vía de señalización de SA es el gen *NPR1* que codifica la proteína NPR1 cuya función modula SAR. NPR1 se trasloca al núcleo donde interacciona con los factores de transcripción (TGA) de la familia bZip, que a su vez se unen específicamente a los sitios promotores de genes de respuesta al SA como PR-1 (Mou *et al.*, 2003; Pieterse y Van Loon, 2004).

2.4.2 Señalización dependiente de ácido jasmónico

El ácido jasmónico (JA) es un importante regulador en defensa a patógenos necrótrofos e insectos herbívoros (Bari y Jones 2009) ampliamente estudiado (Glazebrook, 2005). Así aplicaciones exógenas de metil jasmonato incrementan la resistencia a hongos necrótrofos (Makandar *et al.*, 2010).

La señalización dependiente de JA se debe al incremento de su síntesis en respuesta al ataque de patógenos y consecuentemente a la alta expresión de genes de defensa como *PDF1.2*. El gen *PDF1.2* de arábidopsis es comúnmente usado como marcador para caracterizar la respuesta de defensa dependiente de JA. En algunos casos el incremento de JA puede ser acompañada por el incremento de etileno (ET) (Glazebrook *et al.*, 2005; Bari y Jones, 2009)

El JA es un metabolito lipídico derivado del ácido linoleico, altamente distribuido en el reino vegetal que interviene en una gran cantidad de procesos como el crecimiento de la raíz, maduración de frutos, desarrollo del polen, enrollamiento de zarcillos, respuesta a estrés abiótico y heridas, así como defensa a insectos y patógenos (Turner *et al.*, 2002).

La evidencia de que el JA actúa en la señalización de defensa fue demostrada en tomate tras el ataque de herbívoros en donde se observó acumulación de inhibidores de proteasa y un aumento de su concentración. La función del JA en las rutas de señalización de defensa es muy limitado, sin embargo existe información que apoya este hecho (Turner *et al.*, 2002).

La activación de genes de defensa dependientes de la ruta JA como *COI1* y *JARD-1* fue probada con los patógenos *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicota* y el pulgón *Myzus persicae* (Ellis *et al.*, 2002).

La disponibilidad de mutantes insensibles a JA en *Arabidopsis thaliana* como *coil* (coronatine insensitive 1) y *cevl* (expresión constitutiva de genes inducibles por JA) y *jard-1* son de gran utilidad para el estudio molecular de la vía de la señalización del JA y su implicación en la expresión de genes inducidos por patógenos, así como sus interrelaciones con otras rutas (Staswick *et al.*, 1998).

Los genes de defensa *PDF1.2* y *THI2.1* aumentan la defensa contra patógenos y proveen resistencia a plagas. Mediante el uso de mutantes y estudios de expresión de genes se ha demostrado que las rutas de SA y JA son antagonicas y ambas pueden conferir resistencia a patógenos y plagas (Ellis *et al.*, 2002; Koornneef y Pieterse, 2008).

2.4.3 Señalización por etileno

El etileno es una hormona gaseosa sintetizada como consecuencia del ataque de patógenos en interacciones compatibles e incompatibles. Es una hormona que se sintetiza a partir de la metionina, que es convertida en S-adenosil-metionina por la enzima S-Ado Met- sintasa (ADS). El S-adenosil-metionina se convierte en ácido aminociclopropanol 1-carboxílico (ACC), catalizado por la enzima ACC sintasa (ACS). El ACC es finalmente oxidado por la enzima ACC oxidasa (ACO) y lo convierte a etileno (ET). El etileno en las plantas activa genes como *EIN2* que codifica una proteína integral de membrana que interacciona con la proteína CTR1 cuya función es de regulación negativa. La desrepresión de EIN2 por parte de CTR1 induce la activación a su vez de factores de transcripción presentes en el núcleo que inducen la expresión de genes dependientes de ET como *PDF1.2* (Zhu y Guo, 2008; Glazebrook, 2001).

El análisis de microarreglos de genes de defensa han revelado el solapamiento de genes inducidos tanto por JA y ET. Mediante el uso de mutantes se sabe que *CEVI* actúa como un regulador negativo de JA y ET en la señalización en *Arabidopsis*, mientras que el factor de transcripción ERF1 funciona como un regulador positivo en la señalización de JA y ET

en esta misma especie. El factor de transcripción MYC2 también regula las interacciones entre JA y ET en las respuestas de defensa a heridas y no a patógenos mostrando una respuesta diferencial según el tipo de daño (Bari y Jones, 2009).

2.4.4 Interacción entre rutas de señalización

Es imposible entender SAR sin la interacción con otros procesos biológicos. Las rutas de señalización de defensa interactúan sinérgicamente o antagonicamente de acuerdo al tipo de interacción patogénica, de igual manera tampoco son lineales y estáticas, sino más bien entrecruzadas en una red de señalización activa que falta mucho por conocer (Durrant y Dong, 2004).

Una prueba de entrecruzamientos de rutas de defensa es NPR1, un gen que interacciona en la ruta de señalización de SAR como de ISR (Hammond-Kosack y Parker, 2003). NPR1 es un importante regulador que induce respuesta de defensa con patógenos biótrofos en la ruta de SA pero no en la ruta JA/ET inducida por patógenos necrótrofos (Hammond-Kosack y Parker, 2003). NPR1 es un regulador central en respuesta de defensa en el entrecruzamiento de las rutas SAR, ISR y SA/ JA (Durrant y Dong, 2004; Bari y Jones, 2009).

La correulación entre SA y JA es apoyada por los perfiles de expresión de genes que son inducidos por SA / JA (Durrant y Dong, 2004). La acumulación de SA ha sido asociada con la inhibición de la síntesis de JA y el decrecimiento de la expresión de genes dependientes de JA. Por otro lado, la señalización de JA/ET puede muchas veces inhibir la señalización de SA, sin embargo la represión de la ruta de JA por la de SA es más frecuente, como lo apoyan los estudios realizados en la aplicación exógena simultánea de SA y JA en arabisopsis que impidió la expresión de genes dependientes de JA (Koornneef y Pieterse 2008).

Aplicaciones exógenas de JA (0.06mM) y SA (0.1mM) en hojas de arabisopsis inoculadas con el *Cucumber mosaic virus* (virus mosaico del pepino, CMV) mostraron una expresión génica diferencial. Los tratamientos donde se aplicó JA seguido de SA mostraron mayor eficiencia inhibidora en la replicación del CMV por encima de las aplicaciones simultáneas

o solo con una hormona. La expresión de los genes involucrados en la ruta de señalización del JA fue más rápida que la de SA, lo cual sugiere que el primero puede ser más importante que SA en estas interacciones con fitohormonas (Luo *et al.*, 2011).

Por otro lado, la proteína cinasa con actividad mitogénica (MAPK4) implicada en la señalización de defensa en plantas, actúa como un regulador negativo en la ruta de señalización dependiente de SA y como regulador positivo en la señalización por JA en *Arabidopsis*. La MAPK4 activa la ruta JA/ET dando como respuesta la expresión de los genes PDF1.2 y THI2.1, con lo que permite a la planta priorizar la respuesta defensiva de una u otra ruta de señalización (Turner *et al.*, 2002; Koornneef y Pieterse, 2008).

El factor de transcripción WRKY70 es un importante regulador en la respuesta de defensa dependiente de SA. La sobreexpresión de WRKY70 causa un aumento en la expresión de genes PR y concomitantemente suprime la expresión del gen PDF1.2 que es marcador en la ruta de señalización dependiente de JA. Además de WRKY70, los factores de transcripción WRKY11 y WRKY17 han sido relacionados con la ruta dependiente de SA, mientras que WRKY62 es sinérgicamente inducido por SA/ JA (Koornneef y Pieterse, 2008).

Otro ejemplo de diafonía entre SA/JA es la enzima glutaredoxina tiol GRX480 que cataliza reacciones redox de algunos factores de transcripción TGA. La expresión de GRX480 fue determinada al ser inducida por SA y dependiente de NPR1. Sorprendentemente la sobreexpresión de GRX480 abolió la expresión de PDF1.2 inducida por MeJA (Koornneef y Pieterse, 2008).

Por todo lo anterior entender este entrecruzamiento, sinergismo y antagonismo de rutas de señalización en defensa será un reto en el futuro (Durrant y Dong, 2004).

2.4.5 Transporte vía floema de moléculas de señalización

El transporte de nutrientes en plantas se lleva a cabo por el tejido vascular constituido por xilema que conduce agua y minerales de la raíz al resto de la planta y el floema que distribuye productos de la fotosíntesis como azúcares y otras moléculas. Esta

comunicación intercelular a distancia a través del floema permite la respuesta de la planta a factores ambientales, defensa contra patógenos e inducción floral. Durante la respuesta SAR, se activan diversos genes cuyos productos pueden viajar a través del floema, esta inducción génica de defensa no ocurre solo en el tejido inicialmente infectado, sino en tejidos distales (Ruíz-Medrano *et al.*, 2001; Vlot *et al.*, 2008). En estudios recientes se ha revisado la composición proteica del floema de pepino y calabaza, encontrando algunas proteínas involucradas en defensa y estrés, como lipoxigenasa y malatodeshidrogenasa, (proteína inducida por sequía), entre otras (Walz *et al.*, 2004).

La conducción de la señalización por haces vasculares se ha comprobado en *arabidopsis* donde el movimiento de sacarosa marcada correspondió con la acumulación de SA así como con la expresión de PR-1, aunque también pueden existir otras rutas de movimiento de señales (Durrant y Dong, 2004).

El transporte y movimiento a larga distancia por floema de diversos RNAs es clave en la coordinación de importantes procesos fisiológicos, incluyendo defensa contra virus, silenciamiento de genes, regulación en el desarrollo y distribución de nutrientes. Algunos RNAs genómico de virus, RNA mensajeros endógenos y pequeños RNAs reguladores como miRNAs y siRNAs son transportados sistémicamente (Kehr y Buhtz, 2008).

Ruíz-Medrano *et al.*, (2007), identificaron 91 especies de mRNAs presentes en la savia de calabaza infectada con *Cucumber mosaic virus* (virus mosaico del pepino, CMV), entre ellos los que codifican enzimas implicadas en el metabolismo general, factores de transcripción y agentes de señalización. El patrón de acumulación de mRNAs varió cuando las plantas fueron infectadas con el virus que en plantas sanas. Por otro lado, el perfil de transcritos de mRNA en savia del floema de melón mostraron que la mayoría de ellos están asociados con estímulos bióticos, respuesta al estrés, defensa y señalización (Omid, *et al.*, 2007).

La señalización a larga distancia de SAR se cree es posible por moléculas como el metil salicilato, JA, proteína de transferencia de lípidos, péptidos pequeños y la cascada de MAP cinasas que actúan en el reconocimiento y amplificación de señales (Vlot *et al.*, 2008).

La participación de sustancias móviles de SAR en el floema, como el ácido salicílico, moléculas derivadas de lípidos, especies reactivas de oxígeno y antioxidantes no son concluyentes, sin embargo las macromoléculas móviles del floema son utilizadas como herramientas potenciales en SAR, dado su intervención fundamental en la expresión génica a distancia en condiciones de estrés (Van Bel y Gaupels, 2004) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Compuestos (potenciales) asociados con resistencia o señalización de defensa detectados en savia de floema.

Compuesto de señalización	Función en resistencia o defensa	Especie de la savia de floema detectada
Ácido salicílico	Esencial para SAR Rol de SA como señal sistémica	<i>Cucumis sativus</i> <i>Nicotiana tabacum</i>
Ácido jasmónico	Señal de resistencia de defensa de patógenos	<i>Glycine maxima</i>
Sistema de defensa antioxidante	Producción ROS/degradación de enzimas y antioxidantes involucrados en HR y SAR	<i>Cucurbita máxima</i> <i>Cucurbita pepo</i> <i>Cucumis sativus</i> <i>Cucurbita moschata</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Brassica napus</i>
Tioredoxin/glutaredoxin	Regulación Redox Activación de proteínas	<i>Cucurbita maxima</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Ricinus communis</i>
Calcio	Estallamiento oxidativo y HR	<i>Vicia faba</i>
Oligosacáridos	Regulación de genes PR y síntesis de SA	<i>Glycine maxima</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Nicotiana tabacum</i>
mRNA: WRKY	Codifica para un factor de transcripción de genes PR	<i>Cucurbita maxima</i>
Péptidos: -DIR1 -Kinasas -Lipoxigenasas -Sistemin	Proteína de transporte de lípidos esencial para SAR (Ca ²⁺ dependiente) proteína kinasa Relacionado en la señalización de ácido jasmónico Inducción de genes de defensa por heridas	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Cucurbita Maxima</i> <i>Cucumis sativus</i> <i>Lycopersicum esculentum</i>

Fuente: Van Bel y Gaupels, 2004.

Existen cada vez más pruebas de que diferentes clases de RNAs son transportados a través del floema, tejido que constituye una vía esencial de comunicación de la planta. La ocurrencia de distintos mRNA como miRNA y siRNA, algunos de ellos relacionados con

respuesta de defensa, regulación transcripcional, inhibición de proteasas, así como pequeñas moléculas de señalización, pudieran estar implicados en una compleja red que transmite información en toda la planta. Esta comunicación celular a larga distancia permite que las plantas reaccionen de manera eficiente a condiciones de crecimiento, estrés abiótico y ataque viral (Kehr y Buhtz, 2008).

2.5 Genes de defensa involucrados en SAR dependientes de SA

El uso de mutantes para la identificación de genes relacionados en defensa inducida es una herramienta muy importante. Uno de los primeros trabajos en el reconocimiento de estos genes fue el uso del transgen *NahG*. Plantas transgénicas de tabaco y *Arabidopsis* que expresaban el gen *NahG* mostraron ser más susceptibles a virus, hongos y bacterias. El gen *NahG* codifica la enzima salicilato hidroxilasa que utiliza el SA y lo convierte a catecol, lo que provoca una baja acumulación de SA y de PR's. Por lo tanto la acumulación de SA es esencial en la expresión de múltiples modos de resistencia en plantas (Delaney *et al.*, 1994; Tiriyaki y Tunaz, 2004).

El estudio de genes que controlan la respuesta defensiva en *Arabidopsis thaliana* ha permitido establecer la existencia de dos rutas de señalización en SAR, una dependiente de SA y la otra del JA y ET. La activación de la ruta dependiente de SA actúa confiriendo protección a las plantas frente a patógenos biótrofos como *Pseudomonas syringae*, *Hyaloperonospora spp.* y *Peronospora parasitica*. Mientras que la señalización regulada por JA/ET está involucrada en la defensa contra patógenos necrótrofos como *Botrytis cinerea*, *Erwinia spp.*, *Alternaria brassicicola*, *Erysiphe spp.* y *Leptosphaeria maculans* (Glazebrook, 2005).

Existen algunos modelos que describen la posición de algunos genes de *Arabidopsis* en la transducción de señales que controlan la activación en la respuesta de defensa, destacando la ruta dependiente de SA (Fig. 3). Entre los genes reportados se encuentran *PAD4*, *EDS1*, *SID2*, *EDS5*, *NPR1*, *DTH9*, factores de transcripción TGA y WRKYs y los genes *PRs*,

siendo el primero inductor de resistencia de una manera independiente de SA, pero relacionado con esta ruta (Glazebrook, 2001).

PAD4 (*Phytoalexin deficient 4*) es un gen que regula la producción de fitoalexinas ampliamente estudiado. Promueve la expresión de la respuesta de resistencia independiente a la ruta de señalización dependiente de SA. Codifica una proteína con similitud a lipasa (Jirage *et al.*, 1999). La fitoalexina camalexina de *Arabidopsis* es regulada por *PAD4* y protege a la planta de patógenos como *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* cepa ES4326. Se identificó a *PAD4* como un gen implicado en el control de expresión de mecanismos de defensa y puso en evidencia la síntesis de la camalexina en respuesta a diferentes patógenos (Glazebrook *et al.*, 1997).

EDS1 (Enhanced disease susceptibility1), codifica una proteína con similitud a lipasa que junto a *PAD4* actúan río arriba en la activación de ruta de señalización de SA en *Arabidopsis* y son reguladores positivos de esta hormona (Wiermer *et al.*, 2005). Estas proteínas son importantes activadores en la señalización de SA y median antagonicamente entre la ruta de señalización de JA/ET.

SID2 (*Salicylic-Acid-Induction Deficiency 2*) codifica una isocorismato sintasa (ICS) localizada en el cloroplasto, cataliza la síntesis de isocorismato a partir de corismato. El isocorismato es transformado a ácido salicílico por la acción de la enzima isocorismato piruvato liasa. Este gen es activado en tejido infectado (Wildermuth *et al.*, 2001).

EDS5 codifica una proteína de membrana (Nawrath *et al.*, 2002) aunque también se localiza en cloroplasto, se ha sugerido que *EDS5* está implicado en el transporte de SA. La expresión del gen *EDS5* es fácilmente inducida por patógenos, rayos ultravioleta y SA (Nawrath *et al.*, 2002). Así mismo, la sobre expresión del gen *EDS5* y la acumulación de SA son inducidos en respuesta a la infección por CMV, restringiendo su propagación y el tamaño de lesiones necróticas en *A. thaliana* ecotipo C24 (Ishihara *et al.*, 2008).

El gen *NPR1* es un importante regulador de la ruta de señalización de SA. *NPR1* (*Non-expressor of PRI*) es una proteína que se transporta al núcleo durante la respuesta SAR, donde actúa como modulador de la expresión de genes PR. NPR1 interactúa con miembros de la familia bZip de factores de transcripción TGAs, que a su vez se unen específicamente a los sitios promotores de genes de respuesta al SA como PR-1 (Mou *et al.*, 2003; Pieterse y Van Loon, 2004).

TGA son factores de transcripción que se unen específicamente a los elementos cis presentes en los promotores de los genes *PRI* (Després *et al.*, 2000). *WRKY* expresan proteínas que son factores de transcripción que se activan transcripcionalmente durante algunas respuestas de defensa (Navarro *et al.*, 2004).

SFD1 codifica una dihidroxiacetona fosfato reductasa (DHAP), la cual está involucrada en el metabolismo de lípidos así como su relación en la activación SAR. El mutante *sfd1* disminuyó la acumulación de SA y transcritos de genes *PRI* en hojas distales expuestas a *Pseudomonas syringae* pv *maculicola*. La aplicación de su análogo de SA (benzotiadiazol), mejoró la resistencia en las plantas mutantes *sfd1*. Lo anterior confirma la participación de moléculas de naturaleza lipídica en la señalización a larga distancia en la respuesta defensiva de la planta (Nandi *et al.*, 2004; Vlot *et al.*, 2008).

DIR1 codifica una proteína apoplástica de transferencia de lípidos y magnifica la señalización a larga distancia de SAR (Maldonado *et al.*, 2002).

Por otro lado, *DTH9* (detachment9) es necesario para SAR en una ruta paralela e independiente a la ruta de señalización de SA, sin embargo es capaz de inducir la expresión de genes relacionados en patogénesis después del ataque de patógenos (Mayda *et al.*, 2000).

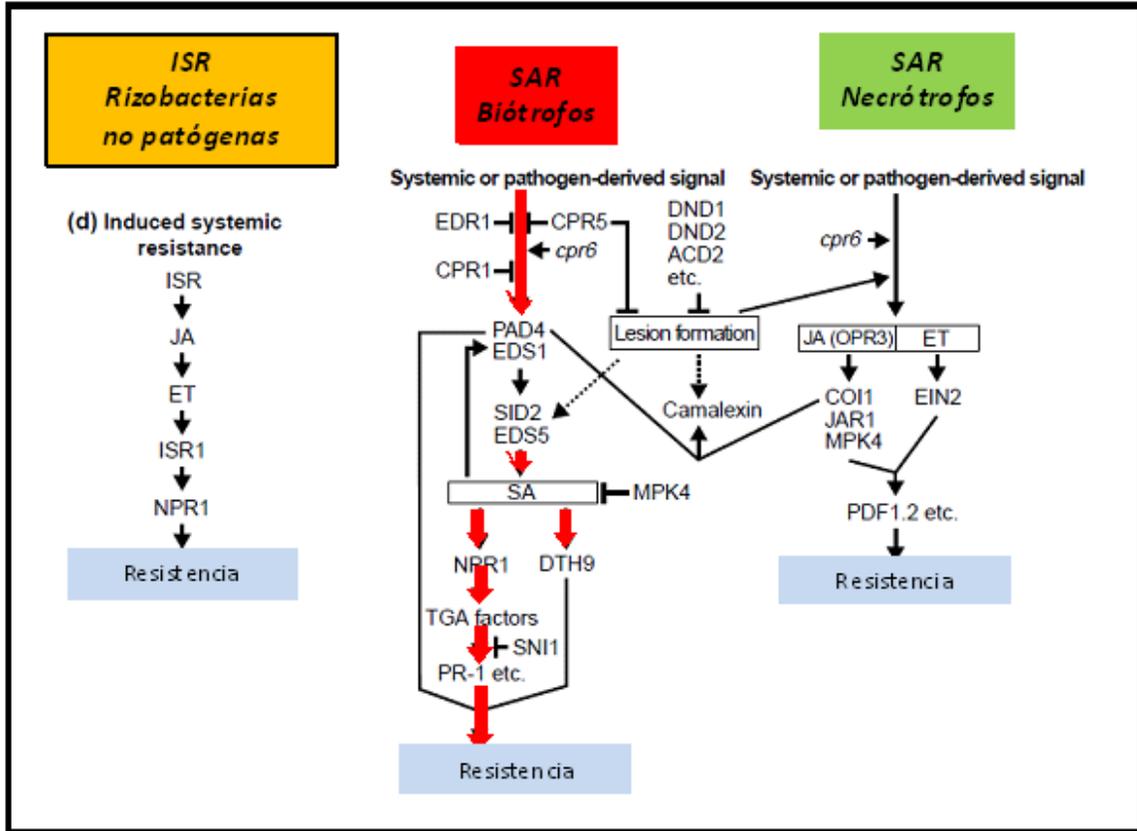


Figura 3. Modelo de rutas de señalización de defensa. Modificado de Glazebrook, 2001.

2.6 Moléculas inductoras de defensa en la agricultura

Las plantas tratadas con inductores o también llamados elicitors generalmente desarrollan resistencia al hospedante, por lo que la aplicación de elicitors exógenos en la superficie de la planta activa múltiples rutas de señalización de defensa intracelular (Holopainen *et al.*, 2009).

Los elicitors exógenos probados en el manejo de plagas y enfermedades son usualmente moléculas sintéticas producidas de compuestos químicos, los cuales normalmente tienen una función hormonal endógena en la defensa de las plantas. La estructura química de los elicitors comprende glicoproteínas, polipéptidos, oligosacáridos, polisacáridos, compuestos que contienen lípidos u otras sustancias. Algunos inductores de resistencia

como SA, quitosano, metil jasmonato, acibenzolar S- metil (ASM) están asociados con la acumulación de SA y proteínas PR (Mejía-Teniente *et al.*, 2010; Durrant y Dong, 2004).

Actualmente existen una gran cantidad de moléculas que se emplean como activadoras de inducción de resistencia sistémica en la agricultura moderna. Estas moléculas han sido evaluadas en laboratorio, invernadero y campo y algunas de ellas se comercializan con la leyenda de inductoras de SAR como a continuación se mencionan.

Coronalon (6 metil-etil inonoil isoleucina), un producto sintético comercial similar al MeJA, es capaz de regular los niveles de transcritos y metabolitos secundarios de defensa en plantas que son comunes por los provocados por MeJA (Pluskota *et al.*, 2007).

Quitosano es un polímero no tóxico y biodegradable de los β -1-4-glucosamina. Es una forma desacetilada de la quitina derivado de la concha de crustáceos como cangrejos y camarones. El quitosano tiene un efecto directo de fungicida sobre los microorganismos que afectan en poscosecha a muchos cultivos, además induce una serie de reacciones de defensa en la planta (Bautista-Bolaños *et al.*, 2006).

Oryzemato, cuyo ingrediente activo es el PBZ (3 alilcil-1,2 benzisotiazol-1,1-dióxido) ampliamente usado en Asia en el control de *Magnaporthe grisea*, induce la expresión de genes de defensa contra *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC 3000 y el oomiceto *Peronospora parasitica*, ha mostraron ser una nueva clase de activador de defensa que estimulan la ruta de señalización SA/ NPR1 e incrementa los niveles de SA (Yoshioka, *et al.*, 2001).

Fosfonato de potasio, fosfito, una sustancia química sistémica que induce diferentes tipos de respuestas de defensa a *Phytophthora cinnamomi*. Las aplicaciones del fosfito dieron una respuesta rápida en la expresión del gen *PRI* y fue acompañada por el aumento de deposiciones de calosa y alta producción de peróxido de hidrógeno en las hojas así como una disminución en el tamaño de lesión en las plantas tratadas con el fosfito (Eshraghi *et al.*, 2011).

Kendal ®, producto comercializado por Bioamérica S.A, es un fertilizante foliar, con acción antioxidante, detoxificante e inductor de SAR. Su formulación en mezcla esta

constituido de nitrógeno (2%)+ fósforo (P_2O_5 , 24%)+ potasio (K_2O , 17 %) + extractos de plantas+oligosacarinas-vitaminas-glutación (8%). Su actividad antioxidante y detoxificante se debe al glutación que remueve toxinas producidas por patógenos, mientras que la estimulación de defensa lo hace a través de las oligosacarinas que activan un gran número de genes de defensa de las plantas, provocando la síntesis de compuestos antibióticos, fenoles, proteínas estructurales de pared celular y enzimas líticas (Anónimo, s/f. a.)

Messenger®, es un producto de nueva tecnología de producción de cultivos y protección vegetal. Messenger estimula los mecanismos de defensa natural de las plantas, genera resistencia en las plantas mediante la proteína harpin, ingrediente activo extraído de bacterias, que induce SAR y activa la ruta de señalización dependiente de JA/ET (Anónimo, s/f. b).

Biorend® es un producto a base de quitosano, fortalece el vigor y grado de lignificación de las raíces, induce la elicitation de SAR previniendo el ataque de enfermedades aéreas y favorece el establecimiento y acción de hongos de control biológico como tricotoderma (Anónimo s/f. c).

Fosfimax 40-20® es un fertilizante foliar con alto contenido en fósforo y potasio, concentra iones fosfito en los tejidos vegetales activando las defensas de las plantas y estimulando la síntesis de fitoalexinas principalmente en aquellas afectadas por oomicetos (Anónimo s/f. d).

Etefon® (ácido 2- cloroetilfosfónico) es un fitorregulador con propiedades sistémicas que actúa sobre la maduración y coloración de los frutos. Su transformación en la planta genera etileno, el cual modifica el metabolismo de las auxinas y estimula la síntesis de fenoles y lignina que actúan sobre la coloración y maduración de los frutos (Anónimo, 2011). Su uso se ha extendido para el control de hongos de la vid e induce la producción de proteínas PR, fitoalexinas y estilbenos (Belhadj *et al.*, 2008).

Actigard® 50 GS, su ingrediente activo es acibenzolar S metil: S-metil benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotioato o benzotidiazol (BTH), conocido elicitor de SAR. Estimula las defensas de la planta protegiéndolas contra el ataque de enfermedades causadas por hongos

y bacterias, se transporta acropétala y basipétalmente permitiendo que los crecimientos nuevos se activen. No mata a los patógenos, pero activa la protección de la planta por sí misma (Anónimo, 2011).

Rezist®, es un bioestimulante que hace a las plantas más resistentes al estrés biótico y abiótico. Rezist disminuye el etileno producto del ataque de patógenos, provocando la estimulación de poliaminas, las cuales son proteínas que inducen la resistencia sistémica adquirida (Anónimo, 2007).

Por todo lo anterior, el uso de este tipo de elicitors muestran ventajas como lo es la seguridad ecológica, prolongado efecto sistémico, participación en múltiples sistemas de defensa e inducción de resistencia no específica a varios patógenos (Mejía-Teniente *et al.*, 2010).

2.7 Turnip mosaic virus (virus mosaico del nabo, TuMV)

El virus mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) pertenece al género *Potyvirus*, familia *Potyviridae* (Berger *et al.*, 2000) que afecta a las crucíferas en todo el mundo (Walsh y Jenner, 2002). El virus es una varilla flexible de 720 x 15-20 nm, el 95% comprende la cubierta proteica y el 5% el RNA (Walsh y Jenner, 2002). Actualmente se reconocen 12 variantes colectadas en diferentes partes del mundo con base en su patrón de resistencia en *Brassica napus* (Pallett *et al.*, 2008).

2.7.1 Genoma

El genoma de TuMV consiste en una cadena sencilla de RNA de sentido positivo con 9830 nucleótidos conteniendo un único marco de lectura abierto (open reading frame, ORF) de 9489 bases que codifican una poliproteína grande de 3863 aminoácidos. El ORF se encuentra flanqueado por dos regiones no traducibles (non translated terminal regions, UTR) en los extremos 5' y 3'. La región no codificante que precede al marco de lectura abierto está formado de 129 nucleótidos con un alto contenido de UA (70%). Mientras que

el codón de terminación es seguido por la región no codificante de 209 bases ricas en AU excluyendo la cola poli A (Nicolas y Laliberté, 1992; Walsh y Jenner, 2002).

La poliproteína generada es autoprosesada proteolíticamente generando 10 proteínas maduras. Estas proteínas se han denominado: **P1** (40 kDa), relacionada con la multiplicación viral (Verchot y Carrington, 1995); **HC-Pro** (52 kDa) componente auxiliar de proteasa relacionada con la transmisión por pulgones, es una proteína multifuncional (Maia *et al.*, 1996) y supresor del silenciamiento génico post-transcripcional (Marathe *et al.*, 2000); **P3** (40 kDa) se considera determinante de patogenicidad, produciendo reacción de hipersensibilidad (Suehiro *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2010); **6K1** (6 kDa) determinante de patogenicidad (Waltermann y Maiss, 2006); **CI** (72 kDa), proteína de inclusión citoplasmática relacionada con replicación viral y movimiento (Gómez *et al.*, 2006); **6K2** (6 kDa) interviene en el movimiento a larga distancia y en la inducción de síntomas (Spetz y Valkonen, 2004); **VPg** (22kDa) proteína de unión al genoma viral (Viral Protein genome-binding) involucrada en movimiento viral de célula a célula y proceso de infección (Puustinen *et al.*, 2002); proteína de inclusión nuclear **NIa** (27 kDa), encargada del procesamiento proteolítico de la poliproteína viral (Mestre, *et al.*, 2003); **NIb** (60 kDa), RNA polimerasa dependiente de RNA (Fellers *et al.*, 1998); y la cubierta proteica **CP** (33 kDa) encapsida al ácido nucleico, participa en el movimiento célula a célula y a larga distancia, acumulación y transmisión viral (Andrejeva *et al.*, 1999; Kimalov *et al.*, 2004).

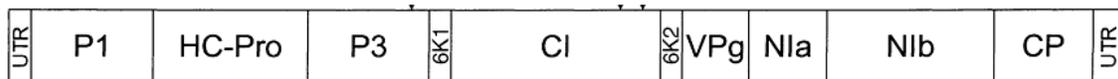


Figura 4. Genoma de TuMV. UTR, región no traducible; P1, proteína 1; HC-Pro, componente auxiliar proteasa; P3, proteína 3; 6K1, proteína 1 6KDa; CI, proteína de inclusión citoplasmática cilíndrica; 6K2, proteína 2 6KDa; VPg, proteína de unión al genoma; NIa, proteína a de inclusión nuclear; NIb, proteína b de inclusión nuclear; CP, cubierta proteica. Tomado de: Walsh y Jenner, 2002.

2.7.2 Síntomas

El TuMV puede causar síntomas muy variados, no solo debido a las variantes presentes sino también por las infecciones mixtas con otros virus; en nabo (*Brassica napus*) causa mosaico, distorsiones, raquitismo y reducción en el desarrollo de la raíz; en brócoli (*Brassica sp.*) provoca manchas cloróticas, malformaciones y raquitismo, mientras que en infecciones precoces causa enanismo y hojas malformadas. En rábano (*Raphanus sativus*), brócoli de raíz (*Brassica campestris* grupo *Ruvo*) y roqueta (*Eruca sativa*) también causa mosaico, malformaciones foliares y enanismo (Conti *et al.*, 2001).

En mostaza (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) causa amarillamiento y reducción en el tamaño del tallo. En plantas infectadas decrece el peso de la planta, el área foliar y altura de la planta. El contenido de clorofila es significativamente reducido (Guo *et al.*, 2005). En rábano (*Raphanus sativus* var. *Longipinnatus*) se observa retraso en el crecimiento, mosaico, clorosis, deformación de hojas, manchas, rizado de hojas así como malformaciones en flor, tallo y fruta. Además en raíz causa manchas marrones reducción del vigor de las plantas (Guo *et al.*, 2005b).

En rábano picante (*Armoracia rusticica*) ocasiona moteado, mosaico, manchas anulares, rayas oscuras en los peciolo y decoloración de la raíz, lo que resulta en un producto indeseable (Eiras *et al.*, 2006). En calabaza (*Cucurbita pepo*) las hojas muestran un moteado amarillo sin afectar frutos y el desarrollo de la planta (Conti *et al.*, 2001).

Cinco especies de *Pachycladon* endémica de Nueva Zelanda mostraron ser susceptibles al TuMV. Los síntomas reportados son bandas amarillas en las venas, mosaico y distorsión en las hojas (Fletcher *et al.*, 2010). En calla - lily (*Zantedeschia spp*) produce líneas y manchas amarillas en hojas y puede ser transmitido en bulbos durante su comercialización (Chen, 2003).

En *A. thaliana* los síntomas observados son disminución del desarrollo de la planta, mosaico, enchinamiento, hojas aserradas y aborto de flores (Martín *et al.*, 1999).

Asimismo ocasiona necrosis venal que inicia en la base del peciolo y se expande a lo largo de las venas de las hojas inoculadas, pero la propagación del virus del floema hacia el

mesófilo es impedido por una respuesta de defensa por parte de la planta que induce la reacción de hipersensibilidad (Kim *et al.*, 2008). La importancia económica de TuMV y la habilidad de infectar *Arabidopsis* hace de este virus un excelente modelo de estudio de la interacción planta- virus.

2.7.3 Transmisión

El TuMV es transmitido por áfidos de forma no persistente. Se conocen 89 especies de áfidos vectores. Entre los más activos se encuentran *Myzus persicae* y *Brevicoryne brassicae* (Walsh y Jenner, 2002). Todos los instares pueden transmitirlo. El virus puede ser adquirido en menos de un minuto e inoculado en un tiempo similar. No existe periodo de latencia. El virus es retenido por el vector al alimentarse por al menos 4 h. El TuMV no es transmisible por semilla ni por polen. El ciclo biológico del TuMV depende de la presencia del virus en las plantas fuente y en la actividad de los áfidos vectores (Conti *et al.*, 2001). En Italia los áfidos vectores son la principal fuente de diseminación del virus durante todo el año debido a la presencia constante de cultivos de crucíferas cultivadas, plantas ornamentales y plantas silvestres perenes o hibernantes (Conti *et al.*, 2001).

2.7.4 Importancia económica

El TuMV es reconocido como el segundo virus de importancia mundial después del *Cucumber mosaic virus* en infectar cultivos vegetales ocasionando enfermedades en 28 países (Tomlison, 1987). Se ha reportado su presencia en regiones templadas y subtropicales de África, Asia, América, Oceanía y Europa (Tomimura *et al.*, 2004). Es conocido por ocasionar daños en diferentes especies del género *Brassica* en Asia, Norteamérica y Europa. Causa severos daños en nabo (*Brassica napus*), col china (*B. rapa*) y coliflor (*B. oleracea*). Provoca pérdidas en cultivos ornamentales, rábano, lechuga, guisante, calabacín, limonium, roqueta y alcachofa (Walsh y Jenner, 2002). Ha sido aislado de un gran número de cultivos y malezas que suman alrededor de 318 especies de 43 familias de dicotiledóneas, incluyendo *Cruciferae*, *Compositae*, *Chenopodiaceae*,

Leguminosae y *Caryophyllaceae*, aunque también se conoce que infecta algunas monocotiledóneas (Walsh y Jenner, 2002).

En China, TuMV causa daños graves en mostaza (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) causando pérdidas en la producción de hasta 30% y en ocasiones hasta el 100% por la reducción del crecimiento de las plantas (Guo *et al.*, 2005).

Durante el invierno y primavera de 2004-2006, cultivos de *Brassica oleracea*, *Raphanus sativus* y *R. raphanistrum* mostraron síntomas de mosaico, moteado, manchas necróticas, malformaciones y clorosis asociado a la presencia de TuMV en tres municipios de Turquía (Korkmaz *et al.*, 2007)

En el Reino Unido el TuMV afecta negativamente la calidad comercial de la col al causar quemadura interna y necrosis externa en las cabezas almacenadas lo cual ha ocasionado pérdidas cuantiosas en esta especie (Pallett *et al.*, 2008).

TuMV es considerado como un peligro potencial debido a la alta presencia que tiene en plantas silvestres, actuando como una fuente de inóculo en malezas pertenecientes a diversas familias como *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae* y *Phytolacaceae* (Stobbs y Stirling, 1990).

3. LITERATURA CITADA

Anónimo, s/f. a. Kendal®. Bioamerica. Ficha técnica. WWW.biamerica.cl

Anónimo, s/f. b. Tecnología microbiana. Plant Health care. Messenger ®. Boletín técnico.

Anónimo, s/f. c. Biorend Berries®. Ficha técnica. www.biorend.cl.

Anónimo, s/f. d. Fosfimax 40-20®. Bioamerica S.A. Ficha técnica. www.bioamerica.cl

Anónimo, 2007. Rezist®. Stoller de Chile S.A. Ficha técnica.

Anónimo, 2011. Actigard® 50 GS. Boletín técnico. Syngenta Agro S.A. de C.V. www.syngenta.com

Andrejeva, J., U. Puurand, A. Meritis, F. Rabenstein, L. Jarvekulg and J.P.T. Valkonen. 1999. Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. *Journal of General Virology* 80: 1133-1139.

Asai, S., and Yoshioka, H. 2009. Nitric Oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 22: 619-629.

Attaran, E., Zeier, T. E., Griebel, T., and Zeier, J. 2009. Methyl salicylate production and Jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Advanced Online Publication*. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.108.063164.

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

Bautista-Bolaños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez, D. V. M. G., Hernández-López, M., Barka, A. E., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C. L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25: 108-118.

Belhadj, A., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M. F., and Mérillon, J. M., 2008. Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 56: 5781-5787.

Berger, P.H., Adams, M.J., Brunt A.A., Hammond J., Hill J.H., Jordan R.L., Kashiwazalci, S., Rybicki, E., Spence, N., and Stenger, D.C. 2005. Familiy Potyviridae.

In. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the international Committee on taxonomy of viruses. Pp 819-841. Edited by C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberg and L.A. Ball. San Diego, CA. Elsevier Academic Press.

Bernier, F., and Berna, A. 2001. Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 545-554.

Bravo, J. M., Ocampo, S., Murillo, I., Coca, M., and San, S.B. 2003. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. *Plant Molecular Biology* 52: 745-759.

Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of plants.* The American Society of Plant Physiologists. Rockville, USA.

Carr J. P., Lewsey, M. G., and Palukaitis P. 2010. Signaling in induced resistance. *Advances in Virus Research* 76:57-121.

Chen, C. C. 2003. Identification of Turnip mosaic virus isolates causing yellow stripe and spot on calla lily. *Plant Disease* 87: 901-905.

Christensen, A., Cho, H. B., Naesby, M., Gregersen, L. P., Brandt, J., Madriz-Ordeñana, K., Collinge, B. D., and Thordal-Christensen, H. 2002. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* 3: 135-144.

Conti, M. D., Galliteli, V., Lisa, O., Lovisolo, G.P., Martelli, A., Ragozzino, G, L., Rana y Vovlas, C. 2001. *Principales virus de las plantas hortícolas.* Mundi Prensa. Madrid España. 205p.

Cuartero, J., Laterrot, H., Van Lenteren, J. C. 2002. Host Plant resistance to pathogens and arthropods pest. In: *Integrated pest and disease management in greenhouse crops.* 124-138pp. Eds. Albajes R, Gullino M L, Van Lenteren J C and Elad Y. Kluwer. Academic Publishers. 545p.

Custers, H. H. V. J., Harrison, J. S., Sela-Burlage, B. M., Deventer, V. E., Lageweg, W., Howe, W. P., Meijs, D. V. J. P., Ponstein, S. A., Simons, H. B., Melchers, S. L., and Stuiver, H. M., 2004. Isolation and characterisation of class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defense. *Plant Journal* 39: 147-160.

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

Després, CH., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Forbert, R. P. 2003. The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1.

Devadas, S. K., Enyedi, A., and Raina, R. 2002. The *Arabidopsis hrII* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *The Plant Journal* 30: 467-480.

Donaldson, A. P., Anderson, T., Lane, G. B., Davidson, L. A., and Simmonds, H. D. 2001. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (*germin*) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 297-307.

Durrant, W. E., and Dong, X. 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review Phytopathology* 42: 185-209.

Eiras, M., Chaves A.L.R., Colariccio, A., and Chagas, C. M. 2006. First report of Turnip mosaic virus in horseradish in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 32: 165.

Ellis, C., Karafyllidis, L., and Turner, J.G. 2002. Constitutive activation of Jasmonate signaling in *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoreacearum*, *Pseudomonas syringae* and *Myzus persicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 1025- 1030.

Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H. 1997. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* 9: 509-520.

Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., Mc Comb, J, Hardy, S. E. G., and O'Brien, P.A. 2011. *Plant Pathology*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2011.02471.x/full>.

Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G. B., and Hunt, A. G. 1998. In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology* 79: 2043-2049.

Fletcher J.D., Lister, R.A., Bulman, S.R., and Heenan, P.B. 2010. First record of Turnip mosaic virus in *Pachycladon* spp. (Brassicaceae): an endangered native plant species in New Zeland. *Australasian Plant Disease Notes* 5: 9-10.

García, R. M y Pérez L.R. 2003. Fitoalexinas: Mecanismos de defensa de las plantas. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 9: 5-10.

Gianinazzi, S., and Kassinis B. 1974. Virus resistance induced in plants by polyacrylic acid. Journal of General Virology 23: 1-9.

Gianinazzi, S. 1975. Effects of virus infection and polyacrylic acid on leaf proteins. Journal General Virology 28: 155-158.

Glazebrook, J., 2001. Genes controlling expression of defenses responses in *Arabidopsis*-2001 status. Ocurrent Opinion in Plant Biology 4: 301-308.

Glazebrook, J., 2005. Constrating mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review Phytopathology 43: 205-227.

Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I. R., Holub, E. B., Hammerschmidt, R., and Ausubel, F.M. 1997. Phytoalexin-Deficient Mutants of *Arabidopsis* Reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. Genetic 146: 381-392

Gómez, C. M., Osalba, V., López, L. and García, J.A. 2006. Genetic analysis of the function of plum pox virus CI RNA helicase in virus movement. Virus Research 116: 136-145.

Graham, M. Y., Weidner, J., Wheeler, K., Pelow, M. J., and Graham, L. 2003. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sajae* cell wall glucan elicitor. Physiology and Molecular Plant Pathology. 63: 141-149.

Guo, D.P., Guo, Y.P., Zhao, J.P., Liu, H., Peng, Y. ., Wang, Q.M., Chen, J, S., and Rao, G.Z. 2005. Photosnthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. Plant Science 168: 57-63.

Guo, Y. P., Guo, D.P., Peng, Y., and Chen, J.S. 2005b. Photosynthetic responses of radish (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*) plants to infection by turnip mosaic virus. Photosynthetica 43: 457-462.

Hammond-Kosack, K., and Parker E. J. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Ocurrent Opinion in Biotechnology 14: 177-193.

Hématy, K., Cherk, C., and Somerville, S. 2009. Host-patogens warfare at the plant cell wall. Current Opinion in Plant Biology 12: 406-413.

Hernández, I., Portieles, R., Chacón, O., and Borrás-Hidalgo, O. 2005. Proteins and peptides for the control of phytopathogenic fungi. *Biotecnología Aplicada* 22: 256-260.

Hernández, S. E., Soto, H. M., Rodríguez, A. J., Colinas, L. T. 2002. Contenido de fenoles y actividad enzimática asociados con el daño provocado por cenicilla en hojas de durazno. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 153-159.

Holopainen, J.K., Heijari, J., Nerg, A-M., Vuorinen, M., and Kainulainen, P. 2009. Potential for the use of exogenous chemical elicitors in disease and insect pest management of conifer seedling production. *The Open Forest Science Journal* 2: 17-24.

Hu, X., Bidney, D. L., Yalpani, N., Duvick, J. P., Crasta, O., Folkerts, O., and Lu, G. 2003. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflowers. *Plant Physiology* 133: 170-181.

Huang, Z., Yeakley, M.J., Wickham- Garcia E., Holdridge J.D., Jian-Bing, F., and Whitham, S.A. 2005. Salicylic Acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. *Plant Physiology* 137: 1147-1159.

Ishihara, T., Sekine, K.T., Hase, S., Kanayama, Y., Seo, S., Ohashi, Y., Kusano, T., Shibata, D., Shah, J., and Takahashi, H. 2008. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* EDS5 gene enhances resistance to viruses. *Plant Biology* 10: 451-461.

Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J. E., Ausubel, F.M., and Glazebrook, J. 1999. *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Plant Biology* 96:13583-13588

Jung, H.W., Kim, W., and Hwang, B. K. 2003. Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic and environmental stresses. *Plant Cell and Environmental* 26:915-928.

Kehr, J., and Buhtz, A. 2008. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany* 59: 85-92.

Kim, B., Masuta, C., Matsuura, H., Takahashi, H., and Inukai, T. 2008. Venial necrosis induced by Turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis* is a form of defense response accompanying HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 260-268.

Kim, B.M., Suehiro, N., Natsuaki, T., Inukai, T., and Masuta, C. 2010. The P3 protein of *Turnip mosaic virus* can alone induce hypersensitive response-linked cell death in *Arabidopsis thaliana* carrying TuNI. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 144-152.

- Kim, Y. H., Yeo W.-H., Kim, Y.-S., Chae, S.-Y., Kim, K.-S. 2000.** Antiviral activity of antibiotic peptaibols, chrysospermins B and D, produced by *Apiocrea* sp. 14T against TMV infection. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 522-528.
- Kimalov, B., Gal-On, A., Stav, R., Belausov, E., and Arazi, T. 2004.** Maintenance of coat protein N-terminal net charge and not primary sequence is essential for zucchini yellow mosaic virus systemic infectivity. *Journal of General Virology* 85: 3421-3430.
- Kliebenstein, D. J. 2004.** Secondary metabolites and plant environmental interactions: A view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell Environmental* 27: 675-684.
- Király, L., Barna, B., and Király, Z. 2007.** Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. *Journal of Phytopathology* 155: 385-396.
- Koornneef, A., and Pieterse, C. M. J. 2008.** Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146: 839-844.
- Korkmaz, S., Onder, S., Tomitaka, Y., and Ohshima, K. 2007.** First report of turnip mosaic virus on Brassicaceae crops in Turkey. *Plant Pathology* 56: 719.
- Laloi, Ch., Apel, K., and Danon, A. 2004.** Reactive oxygen signaling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 323-328.
- Loake, G., and Grant, M. 2007.** Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 466-472.
- Loebenstein G. 2009.** Local lesions and induced resistance. *Advances in Virus Research* 75:73-117.
- Luo, Y., Shang, J., Zhao, P., Xi, D., Yuan, S., and Lin, H. 2011.** Application of jasmonic acid followed by Salicylic Acid inhibits *Cucumber mosaic virus* replication. *Plant Pathology Journal* 27: 53-58.
- Madriz, O. K. 2002.** Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plantas* 63:23-32.
- Maia, G. I., Haenni, A. L. and Bernardi, F. 1996.** Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *Journal of General Virology* 77: 1335-1341.
- Makandar, R., Nalam, V., Chaturvedi, R., Jeannotte, R., Sparks, A. A., and Shah, J. 2010.** Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in *Arabidopsis*

interaction with *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 861-870.

Malamy, J., Sánchez-Casas, P., Hennig, J., Guo, A., and Klessig, D. F. 1996. Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 474-482.

Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., and Camero, R. K. 2002. A putative transfer protein involved in systemic resistance signaling in Arabidopsis. *Nature* 419: 399-403.

Marathe, R., Anandalakshmi, R., Smith, T. H., Pruss, G. J., and Vance, V. B. 2000. RNA viruses as inducers suppressors and targets of post-transcriptions gene silencing. *Plant Molecular Biol.* 43: 295-306.

Margis-Pinheiro, M., Martín, Ch., Didierjean, L., and Burkard, G. 1993. Differential expression of bean chitinase genes by virus infection, chemical treatment and UV irradiation. *Plant Molecular Biology* 22: 659-668.

Martín, M. A., H.L.P Cabrera, D. H. Martínez and F. Ponz. 1999. Resistances to Turnip mosaic potyvirus in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 1016-1021.

Mayda, E., Mauch-Mani, B., and Vera, P. 2000. Arabidopsis dth9 mutation indentifies a gen involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid-dependent responses. *Plant Cell* 12: 2119-2128.

Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., Gonzales-Chavira, M. M., Ocampo-Velazquez, R. V., Herrera-Ruíz, G., Chapa-Oliver, A.M., and Guevara-González, R. G. 2010. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology* 9: 9155-9162.

Ménard, R., Ruffray, P., Fritig, B., Claude, J.C., and Kauffmann, S. 2005. Defense and Resistance-inducing Activities in Tobacco of the sulfated β -1, 3 glucan PS3 and its synergistic activities with unsulfated molecule. *Plant Cell Physiology* 46: 1964-1972.

Mert- Türk, F. 2002. Phytoalexins: Defence or just a response to stress? *Journal of Cell and Molecular Biology* 1: 1-6.

Mestre, P., Brigneti, G., Durrant, M., and Baulcombe, D.C. 2003. Potato virus Y NIa protease activity is not sufficient for elicitation of Ry-mediated diseases resistance in potato. *The Plant Journal* 36: 755-761.

Mitsuya, Y., Y. Takahashi, T. Berberich, A. Miyazaky, H. Matsumura, H. Takahashi, R. Terauchi, T. Kusano. 2009. Spermine signaling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. *Journal of Plant Physiology* 166: 626-643.

Mlotshwa, S., Pruss, J. G., and Vance, V. 2008. Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends in Plant Science* 13:375-382.

Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, F.M., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, W. S., Pruss, G., and Vance, V. 2002. RNA silencing end the mobile silencing signal. *The Plant Cell. Supplement* S289-S301.

Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic Acquired Resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935-944.

Nanda, A.K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., Dunand, C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 52:195-204.

Nandi, A., Welti, R., and Shah, J. 2004. The *Arabidopsis thaliana* Dihydroxyacetone Phosphate Reductase Gene suppressor of acid desaturase deficiency is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 16: 465-477.

Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. and Jones, J. D.G. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* 135: 1113-1128.

Nawrath, Ch., Heck, S., Parinthewrong, N., and Métraux J. P. 2002. EDS5, an essential component of salicylic acid dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *The Plant Cell* 14: 275-286.

Neill, S., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R., and Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1237-1247.

Nicolas, O and Laliberté, J-F. 1992. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology* 73: 2785-2793.

Omid, A., Keilin, T., Glass, A., Leshkowitz, D., and Wolf, S. 2007. Characterization of phloem-sap transcription profile in melon plants. *Journal of Experimental Botany* 58: 3645-3656

- Pallett, D.W., Cooper, J.I., Wang, H., Reeves, J., Luo, Z., Machado, R. Obermeier, V., Walsh, J. A., and Kearsley, M. J.. 2008.** Variation in the pathogenicity of two *Turnip mosaic virus* isolates in wild UK *Brassica rapa* provenances. *Plant Pathology* 57: 401-407.
- Park, C. J., Kim, K. J., Park, J.M., Shin, Y.C., and Paek, K.H. 2004.** Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal* 37: 186-198.
- Pieterse, C. M. J., and Van Loon, L.C. 2004.** NPR1: The spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 7:456-464.
- Pluskota, W.E., Qu, N., Maitrejean, M., Boland, W., and Baldwin, I. T. 2007.** Jasmonates and its mimics differentially elicit systemic defence responses in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Experimental Botany* 58: 4071-4082.
- Porat, R., Mccollum, T. G., Vinokur, V., and Droby, S. 2002.** Effects of various elicitors on the transcription of a β -1,3-endoglucanase gen in citrus fruit. *Journal of Phytopathology* 150: 70-75.
- Puustinen, P., Rajamaki, M.-L., Ivanov, K.I., Valkonen, J.P.T., and Mäkinen, K.. 2002.** Detection of the potyviral genome-linked protein VPg in virions and its phosphorylation by host kinases. *Journal of Virology* 76: 12703-12711.
- Romanazzi, G., Ascenzo, D. D., and Murolo, S. 2009.** Field treatment with resistance inducers for the control of grapevine Bois noir. *Journal of Plant Pathology* 91: 677-682.
- Ruiz-Medrano, R., Hinojosa, M. J., Xoconostle-Cázares, B., and Lucas, W.J. 2007.** Influence of cucumber mosaic virus infection on the mRNA population present in the phloem translocation stream of pumpkin plants. *Functional Plant Biology* 34: 292-301.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., and Lucas, W.J. 2001.** The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 202-209.
- Sang-Wook, P., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D. 2007.** Methyl Salicylate is a critical mobile signal for plant Systemic Acquired Resistance. *Science* 318: 113-116
- Santén, K., Marttila, S., Lijijeroth, E., and Bryngelsson, T. 2005.** Immunocytochemical localization of the pathogenesis-related PR-1 protein in barley leaves after infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66: 45-54.
- Schneider, M., Schweizer, P., Meuwly, P., and Métraux, J. P. 1996.** Systemic acquired resistance in plants. *International Review of Cytology* 168:303-340.

Schreiber, K., and Desveaux, D. 2008. Message in a bottle: Chemical biology of induced disease resistance in plants. *Plant Pathology Journal* 24: 245-268.

Shulaev, V., Silverman, P., and Raskin, I. 1997. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385: 718-721.

Simonetti, E., Veronico, P., Melillo, M., Delibes, A., Andrés, F. M., and López-Braña, I. 2009. Analysis of class III peroxidase genes expressed in roots of resistant and susceptible wheat lines infected by *Heterodera avenae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 22: 1081-1092.

Slováková, L., Lisková, D., Capek, P., Kubacková, M., Kákoniová D., and Karácsonyi, S. 2000. Defense responses against TNV infection induced by gactoglucomannan-derived oligosaccharides in cucumber cells. *European Journal of Plant Pathology* 106: 543-553.

Smith, M.C., and Boyko, E. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: Current Status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 1-16.

Solis, J., Medrano, G and Ghislan, M. 2007. Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology* 164: 1071-1082.

Spetz, C., and Valkonen, J. P. 2004. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Molecular Plant-Interactions* 17: 502-510.

Staswick, P. E., Yuen, G. Y., and Lehman, C. C. 1998. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant Journal* 15: 747-754.

Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology* 35: 235-270.

Stobbs, L. W and Stirling, A. 1990. Susceptibility of Ontario weed species to turnip mosaic virus. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12: 255-262.

Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T. and Okuda, S.. 2004. An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *Journal of General Virology* 85: 2087-2098.

Taiz, L., and Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology*. Fifth edition. Sinauer Associates Sunderland. Inc.USA.

- Tiryaki, I., and Tunaz, H. 2004.** Systemic acquired resistance: Characterization of genes associated with plant defence response. *Journal of Cell and Molecular Biology* 3: 9-14.
- Tomimura, K., J. Spak, N. Katis, C.E. Jener, J.A. Walsh, A.J. Gibbs, K. Ohshima. 2004.** Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in west and east Eurasia. *Virology* 330: 408-423.
- Tomlison, J. A. 1987.** Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals Applied Biology* 110: 661-681.
- Turner, G. J., Ellis, C., Devoto, A. 2002.** The Jasmonate Signal Pathway. *The Plant Cell*. (supplement) 14: S153-S164.
- Tuzun, S. 2006.** Terminology related to induced systemic resistance: Incorrect use of synonyms may lead to a scientific dilemma by misleading interpretation of results. 1-8p. In: *Multigenic and induced systemic resistance in plants*. Edited by Sadik Tuzun and Elizabeth Bent. Springer. USA.
- Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordan, X., and Holuigue L. 2004.** *NPR1*-Independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 34-42.
- Vallad, G., and Goodman, R. 2004.** Induced resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934.
- Van Bel, A. J. E., and Gaupels, F. 2004.** Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. *Molecular Plant Pathology* 5: 495-504
- Van Loon L. C., Bakker P. A. H., and Pieterse, C. M J. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Phytopathology* 36:453-483.
- Van Loon, L.C. 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119: 243-254.
- Van Loon L. C., Rep, M., and Pieterse C. M. J. 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology* 44: 135-62.
- Vasyukova, N. I. and Ozeretskovskaya O L. 2007.** Induced Plant Resistance and Salicylic acid: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43: 367-373.

- Verchot, J., and Carrington, J. C. 1995.** Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology* 69: 3668-3674.
- Vidhyasekaran, P. 2008.** Fungal pathogenesis in plants and crops. *Molecular Biology and host defense mechanisms*. Second Edition. CRC Press. 509p.
- Vlot, C. A., Dempsey, A. D M. and Klessig, F. D. 2009.** Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206.
- Vlot, C. A., Klessig, F. D. and Sang-Wook, P. 2008.** Systemic acquired resistance: elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* 11: 436-442.
- Walsh, J. A., and Jenner, C. E. 2002.** Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology* 3: 289-300.
- Waltermann, A., and Maiss, E. 2006.** Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology* 87: 2381-2386.
- Walz, C., Giavalisco, P., Schad, M., Juenger, M., Klose, J., Kehr, J. 2004.** Proteomics of cucurbit phloem exudates reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* 65: 1795-1804.
- White R.F. 1979.** Acetylsalicylic (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-412.
- Wiermer, M., Feys, B. J., and Parker, J. E. 2005.** Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion Biology* 8: 383-389.
- Wildermuth, C. M., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, M. F. 2001.** Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-566.
- Yoshioka, K., Nakashita, H., Klessig, D. F., and Yamaguchi, I. 2001.** Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. *The Plant Journal* 25: 149-157.
- Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.L., Schaller, A., Yang, H. S. and Howe, A. G. 2003.** Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *The Plant Journal* 36: 485-499.
- Zhu, Z and Guo, H. 2008.** Genetic basis of ethylene perception and signal transduction in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 808-815.

CAPÍTULO II

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE DEFENSA POR INDUCTORES DE RESISTENCIA EN ARABIDOPSIS INFECTADAS CON TuMV

Salgado-Siclán, M. L., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Ochoa-Martínez D.L., Burgueño-Ferreira, J., Xoconostle-Cázares B., Ruiz-Medrano, R.

RESUMEN

La respuesta de defensa de la planta implica grandes cambios en la expresión génica. Varios compuestos inductores implicados en la inducción en defensa son conocidos, incluyendo compuestos endógenos de bajo peso molecular, derivados del patógeno como la membrana y fragmentos de pared celular y metabolitos secundarios. El ácido salicílico y peróxido de hidrógeno son bien conocidos como inductores de la respuesta al ataque de patógenos y algunos compuestos sintéticos análogos a algunos de éstos inductores de resistencia muestran efectos similares. Los fertilizantes foliares, además del efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas, han demostrado en algunos patosistemas limitar la infección por patógenos particularmente de fitoplasmas. Sin embargo, su modo de acción en estos casos es poco conocido. Con el fin de conocer qué transcritos relacionados con la defensa induce el ácido salicílico (SA), peróxido de hidrógeno y el fertilizante foliar a base de NPK-oligosacarinas (Kendal®) fueron analizadas plantas de arabisopsis inoculadas con el *Turnip mosaic virus*. Las aplicaciones de los productos sobre las plantas infectadas con el virus indujeron la síntesis de los transcritos *PRI*, *MPK1* y *TGAI* más eficientemente que en las plantas tratadas con los producto pero sin inocular. Solu una alta inducción de *PRI* fue observada en plantas tradas con SA. Sólo el tratamiento con peróxido disminuyó los niveles de virus mientras que los niveles más altos se observaron en plantas tratadas con Kendal®. Las imágenes con microscopia confocal con TuMV-GFP confirmaron estas observaciones. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con Kendal® no fue del todo eficaz contra TuMV.

CHAPTER II

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF DEFENSE-RELATED GENES BY INDUCERS OF RESISTANCE IN ARABIDOPSIS

Salgado-Siclán, M. L., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Ochoa-Martínez D.L., Burgueño-Ferreira, J., Xoconostle-Cázares B., Ruiz-Medrano, R.

ABSTRACT

The plant defense response involves large changes in gene expression. Several inducers involved in such induction are known, including endogenous low-molecular weight compounds as well as those derived from the pathogen, such as membrane and cell wall fragments and secondary metabolites. Salicylic acid and hydrogen peroxide are well-known inducers of the response to pathogen attack, and synthetic compounds analogous to some of these resistance inducers show similar effects. Foliar fertilizers, besides the beneficial effect on plant growth, have shown to limit pathogen infection in some pathosystems, particularly during phytoplasmoses. However, their mode of action in these cases is poorly understood. In order to know what defense-related transcripts induced by salicylic acid (SA), hydrogen peroxide, and Kendal® foliar fertilizer induced Arabidopsis plants inoculated with *Turnip mosaic virus* were analyzed. The applications of the products on plant infected with the virus induced the synthesis of *PRI*, *TGAI* and *MPKI* transcripts more efficiently than in plants treated with the product but without inoculation. Only a high induction was observed in the case of *PRI* for SA. Only the peroxide treatment decreased the levels of virus while the highest levels were observed in plants treated with Kendal®. Confocal microscopy images with TuMV-GFP labeled confirmed these observations. The results suggest that treatment with Kendal® was not completely effective against TuMV.

I. INTRODUCCIÓN

La defensa de las plantas contra patógenos es activada por moléculas procedentes del hospedante y del propio patógeno como fragmentos de pared celular, efectores microbianos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y metabolitos secundarios. Esto permite el establecimiento de una respuesta de defensa local, así como la generación de una señal (es) secundaria (s) implicada (s) en la activación de una respuesta de defensa sistémica denominada resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés). La detección temprana del patógeno desencadena una serie de eventos que conducen generalmente a limitar el sitio de la infección inicial a través de la muerte celular programada (Durrant y Dong, 2004; Jones y Dangl, 2006). Varias moléculas endógenas implicadas en la activación de la respuesta de defensa se han descrito, tal como ácido salicílico, jasmonato y fragmentos de la pared celular del hospedante y del patógeno. Además, diferentes factores abióticos activan las respuestas de resistencia, tales como calor, frío y otros factores físicos lo que sugiere que en algunos puntos estas rutas de señalización convergen (Durrant y Dong, 2004).

Recientemente, varios productos químicos han demostrado la capacidad de inducir resistencia a estrés biótico y abiótico. No sorprende que, algunos de ellos son en términos generales estructuralmente relacionados con el ácido salicílico y oligosacáridos, mientras que otros son de naturaleza muy diversa (por ejemplo, aminoácidos, vitaminas y ácidos grasos, entre muchos otros) (Vlot *et al.*, 2009; Svoboda y Boland, 2010). Es razonable suponer que los modos de acción son similares a sus homólogos endógenos, aunque en el caso de los aminoácidos o nutrimentos sus mecanismos de acción no son bien comprendidos. De hecho, algunos de ellos han demostrado inducir múltiples vías de transducción de señales que resultan en la defensa contra el ataque de patógenos y se han utilizado en los cultivos logrando cierta protección presumiblemente a través de la activación de SAR. Ejemplos de estos son quitosano, laminarina, oligosacarinas y varios análogos estructurales del ácido salicílico (Schreiber y Desveaux, 2008).

La aplicación exógena de SA así como de sus análogos estructurales (INA y BTH) resultan en la disminución de tamaño de la lesión después de la infección viral en especies modelo como *Arabidopsis thaliana* (Uquillas *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Vasyukova y Ozeretskoykaya, 2007; Schreiber y Desvaux, 2008; Loebenstein, 2009; Carr *et al.*, 2010). Resultados similares han sido obtenidos mediante otros inductores de resistencia, tales como tiamina, metil jasmonato, ácido poliacrílico, oligosacáridos y β -amino butírico a gran escala contra diversos virus y bacterias fitopatógenos (Schreiber y Desvaux, 2008). Curiosamente, incluso pequeñas cantidades de tales compuestos son capaces de inducir un nivel basal de respuesta de defensa a través de un proceso denominado “sensibilización”. Los mecanismos responsables de la sensibilización no son bien conocidos pero se ha sugerido que es un estado energéticamente más eficiente para la planta (Jung *et al.*, 2009).

Una de las primeras manifestaciones en la vía de transducción de señales que conducen a la resistencia sistémica adquirida implica el estallamiento oxidativo. Los iones superóxido son producidos por NADPH oxidasas transmembranal que a su vez son reducidos a peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa. Consecuentemente, se activa a nivel local y sistémico la síntesis de genes relacionados con defensa tales como el *PR1* (Neill *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2010). Por otro lado, los productos comerciales que consisten en mezclas complejas de extractos de hojas, oligosacáridos y glutatión, se han utilizado para inducir la respuesta de defensa frente a patógenos en algunos cultivos. Es probable que algunos de estos componentes desencadenen la resistencia sistémica adquirida, o bien, sensibilicen a la planta a respuestas de defensa como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, los mecanismos exactos a través del cual estas mezclas complejas activan la respuesta de defensa, son poco conocidos.

La inducción de genes *PR1* es un sello característico de SAR (Carr *et al.*, 2010). TGA1 es un factor de transcripción inducido por el gen *NPRI* responsable de la activación de varios genes relacionados con defensa (Carr *et al.*, 2010; Lindermayr *et al.*, 2010), mientras que *MPKI* cinasa es activado por *MKK3* que a su vez es inducido tras la percepción del patógeno (Dóczi *et al.*, 2007).

Se estudió el efecto de algunos de los productos comerciales en la inducción de genes asociados a SAR en un patosistema modelo. Así en el presente trabajo, la acumulación de transcritos de *PRI* (At2g14610), *TGAI* (At5g65210) y *MPKI* MAP cinasa (At1g10210) se monitoreó a través de RT-PCR tiempo real en plantas de arabidopsis tratadas con SA, peróxido de hidrógeno y una mezcla comercial NPK-oligosacarinas, conocida comercialmente como Kendal® (nitrógeno 2% + P₂O₅ 24% + K₂O 17 % + extractos de plantas + oligosacarinas-vitaminas-glutati6n, 8%) que se recomienda como un fertilizante foliar, aunque se ha utilizado como inductor en la sensibilizaci6n de la respuesta de defensa en algunos cultivos (Romanazzi *et al.*, 2009). Las oligosacarinas son fragmentos de pared celular capaces de inducir la respuesta de defensa (Schreiber y Desvaux, 2008), reacci6n a heridas y m1s recientemente se ha demostrado que median la tolerancia a heladas en trigo (Zabotin *et al.*, 2009). Por otro lado, la acumulaci6n del marcador GFP de la construcci6n del virus del mosaico del nabo (TuMV-GFP) se utiliz6 para monitorear el curso de la infecci6n en plantas de arabidopsis (Lellis *et al.*, 2002).

2. OBJETIVO

Evaluar la expresi6n de genes relacionados con defensa inducida por la aplicaci6n ex6gena de 1cido salic6lico, per6xido de hidr6geno y Kendal® en plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con TuMV.

3. HIP6TESIS

Las aplicaciones ex6genas de 1cido salic6lico, per6xido de hidr6geno y Kendal® promueven la s6ntesis de los transcritos de genes relacionados en defensa en plantas infectadas con TuMV.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal y tratamientos

Plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en invernadero con una temperatura media de 22 ° C y fotoperiodo de 12h luz/ 12h oscuridad, empleando peat moss como sustrato. Al inicio de la aparición de la inflorescencia se asperjaron sobre las hojas de roseta los siguientes productos: ácido salicílico (SA, 0.5 mM), peróxido de hidrógeno (PE, 3 mM) y Kendal® (K, 450 µL/200 ml). Al día siguiente de la aspersion, el vector binario que contiene TuMV-GFP (GFP-pCBTuMV) donado por el Dr. James Carrington (Universidad de Óregon, Corvallis), se inoculó mecánicamente en las mismas hojas asperjadas previamente con los productos. Cuatro plantas de cada tratamiento se seleccionaron para su posterior análisis del número de transcritos inducidos mediante PCR tiempo real. El testigo positivo consistió en la inoculación solo del virus (T +, TuMV solo) y testigo negativo aspersion de agua (T-, agua, planta-mock).

Se establecieron cuatro repeticiones por tratamiento en un arreglo completamente al azar. Las plantas fueron cubiertas con una bolsa de plástico transparente, para garantizar la infección y mantener la humedad. Otro grupo de plantas fueron tratadas solamente con los productos a fin de monitorear la expresión génica sin la infección por virus bajo las mismas condiciones.

4.2 Extracción de RNA

El RNA total se obtuvo a partir de 100 mg de tejido fresco de hojas caulinares usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Sorrento CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. El tejido se colectó 3 y 7 días posteriores a la inoculación. La concentración de RNA se midió con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific; Wilmington DE). La integridad de RNA se determinó mediante la electroforesis del gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. El RNA fue tratado con RQ1 RNasa libre de DNasa (Promega, Madison, WI) y se almacenó a -80 ° C hasta su uso.

4.3 RT-PCR punto final

RT-PCR de un solo paso se realizó con la Superscript™ III Platinum® One-Step RT-PCR System (Invitrogen), tal como lo especifica el fabricante. El programa para la RT-PCR fue el siguiente: en la primer etapa un ciclo a 15 min a 50 °C para la síntesis de la primera cadena, seguido por 30 ciclos de: 94 °C durante 40 s, la temperatura específica del alineamiento (Tabla 1) durante 40 s y 72 °C durante 40 s. Un paso de extensión final se realizó a 72 °C durante 7 min. Los cebadores fueron diseñados para amplificar productos de tamaño similar de los genes inducidos y detectar a GFP incluido en el virus, así como el gen de la proteína de la cápside, que se utilizó como control interno. Los productos fueron clonados en un vector de clonación (TOPO pCRII doble, Invitrogen) y el producto se verificó mediante secuenciación. El control utilizado para determinar la concentración de RNA de las muestras, fue el gen 18S del RNA ribosomal de arabidopsis.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para el análisis de expresión de genes de defensa.

Gene ID	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño esperado (bp)	Temperatura de alineamiento
PR1 At2g14610	Sentido: TCTCCGCCGTGAACATGTGGGTTAGCG Antisentido: GTATGGCTTCTCGTTCACATAATTCCC	200	67 °C
MPK1 At1g10210	Sentido: GATCCGTCAAAGAGGATTAGTGTCTCTG Antisentido: TCAGAGCTCAGTGTTAAGGTTGAAGC	200	58 °C
TGA1 At5g65210	Sentido: GGTGAATTCTGCTATGGATGAATTAGAAGC Antisentido: CTACGTTGGTTCACGATGTCGAGTTGC	200	65 °C
18S rRNA At1g49240	Sentido: GCCCCGGGTAATCTTTGAAATTCAT Antisentido: GTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTA	150	63 °C
TuMV-GFP	Sentido: CATGGCAAGTAAAGGAGAAGAACTTTT Antisentido: CTTCATATGATCTGGGTATCTTG	250	54 °C
TuMV-CP	Sentido: GGACGGCGACGATCAGGTGGAAATTCCTCG Antisentido: CAACCCCTGAACGCCAGTAAG	400	63 °C

4.4 RT PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR)

Los niveles de transcritos de los genes seleccionados se llevó cabo mediante análisis de RT-PCR cuantitativa utilizando el kit comercial, Express One-Step Sybr® Green ER™ qRT-PCR Super Mix (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 1µL de RNA (300 ng / µl) y 10 pmoles de cada cebador se utilizaron en una mezcla de reacción de 10 µl. Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Australia). Las condiciones para la amplificación fueron: 40 min a 42 °C para la síntesis de la primera cadena, seguido por 40 ciclos de: 40 s a 94 °C, 35 s a 62 °C y 30 s a 72 °C. Finalmente, con el fin de asegurar que no se amplificaron dímeros en la reacción, una curva de disociación se generó mediante calentamiento progresivo de las muestras (60-95 °C). El valor de Ct para cada producto se determinó por duplicado en cada tratamiento. TuMV con los oligos diseñados para GFP y la cápside (CP) fueron detectados en las hojas de plantas infectadas utilizando la misma metodología.

La cuantificación relativa para la acumulación de transcripción se realizó de acuerdo con el método descrito por Livak y Schmittgen (2001; $2^{-\Delta\Delta CT}$) el cual consta de una comparación relativa entre un gen endógeno y el blanco. Para esta prueba se analizaron dos repeticiones por tratamiento. Por otro lado, la concentración viral se midió a través del método de la curva estándar (Biorad, Hercules CA). La amplificación se confirmó mediante análisis de los productos por electroforesis en gel de agarosa.

4.5 Microscopía confocal

La infección de TuMV-GFP en arabis fue monitoreada en las hojas inoculadas y caulinares. El tejido se lavó con una solución que contiene etanol: glicerol: ácido láctico: agua en una proporción 5:2:2:1 durante 5 días a 4 °C y luego transferido a una solución de glicerol al 50% y montado sobre un portaobjetos de vidrio. Las preparaciones se observaron con un microscopio confocal de multifotónica modelo SP5 (Leica) a 20X. Las imágenes fueron procesadas utilizando el software LAS AF (Leica). Para cuantificar la

señal de fluorescencia se evaluaron 20 campos en un área de 1000 m μ ² cada uno y los píxeles se calcularon utilizando el software ya mencionado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PCR punto final

La PCR punto final reveló la acumulación de transcritos de *PRI*, *MPK1* y *TGA* a las 3 y 7 días posteriores a la infección (dpi) en todos los tratamientos (datos no mostrados). Si bien el aumento de transcritos de *PRI* y *TGA1* se había reportado después de la aplicación de SA y peróxido, no se conocía su efecto para *MPK1* a pesar de su implicación en la defensa como respuesta en la vía MKK3 (mitogen-activated protein kinase kinase), por lo que es de suponer que esta proteína actúa como un blanco para fosforilación dentro de esta vía (Doczi *et al.*, 2007). Además, el gen *MPK* se expresa de niveles moderados a bajos, de acuerdo con los datos de microarreglos, existiendo poca variación en los diferentes tejidos después del tratamiento con *Pseudomonas syringae*, *Phytophthora infestans* y diversos elicitors (<http://www.weigelworld.org/resources/microarrays/AtGenExpress/>).

El gen *PRI* es considerado como un gen cuya expresión es inducida por SA e infecciones por microorganismos (Laird *et al.*, 2004). Otros trabajos han demostrado que esta inducción es específica a tal tratamiento, ya que la aplicación de ácido ascórbico y paraquat (compuestos con propiedades antioxidantes) no promueven la expresión de dicho gen (Colville y Smirnoff, 2008).

El SA y el peróxido de hidrógeno han sido bien estudiados como inductores de SAR; de hecho, los modelos actuales indican que SA está implicado en la translocación del regulador de defensa NPR1 al núcleo, como respuesta a cambios en su estado redox (Pieterse y Van Loon, 2004). El peróxido de hidrógeno y en general los agentes oxidantes, actúan en conjunto con el SA para disparar las respuestas de defensa de la planta. Kendal® (mezcla NPK- oligosacarina) es utilizado como un fertilizante foliar recomendado para

disminuir la expresión de los síntomas causados por fitoplasmas (Romanazzi *et al.*, 2009) aunque su mecanismo de acción no está aún claro. En este trabajo se determinó que su aplicación induce la expresión de los genes de SAR en una etapa temprana de infección.

5.2 Tiempo real cuantitativo qRT-PCR

En el análisis de expresión de RNA de las plantas inoculadas con TuMV-GFP a 3 y 7 días posteriores al tratamiento con los productos evaluados se encontró que la acumulación de transcritos *PRI* fue mayor a los 3 días posteriores a la infección (dpi) con SA (Fig. 1A). A los 7 días después del tratamiento los niveles de *PRI* disminuyeron al igual que en las plantas no tratadas. En los tratamientos de testigo positivo y Kendal® también se detectaron transcritos de *PRI* aunque a niveles inferiores. Dicha inducción fue de corta duración ya que los transcritos de *PRI* no se detectaron a los 7 días posteriores a la inoculación. En el tratamiento con peróxido la expresión de los transcritos *PRI* fue baja a los 3 y 7 días posteriores a la inoculación (Fig.1A).

Los niveles de transcritos de *MPK1* se incrementaron con la aplicación del peróxido seguido por el tratamiento con Kendal®, el testigo positivo (plantas inoculadas con TuMV sin la aplicación de productos) y SA a los 3 y 7 dpi, mostrando, los niveles más altos de expresión a los 7 dpi (Fig. 1B). Por otro lado, los niveles de transcritos de *TGA1* fueron más altos con Kendal®, seguido por el peróxido, testigo positivo y SA a los 7 días posteriores a la inoculación (Fig. 1C).

De manera general la expresión del gen *PRI* fue mayor a los 3 días posteriores a la inoculación con respecto a los genes *MPK1* y *TGA1*, mientras que éstos últimos lo fueron a los 7 días posteriores a la inoculación, aunque con valores más bajos.

Con respecto a la replicación viral en plantas tratadas con los diferentes productos e infectadas con TuMV, el tratamiento Kendal® mostró niveles altos de transcritos de RNA a

los 7 dpi con respecto del testigo positivo. En el tratamiento con peróxido no se detectó al virus a los 3 y 7 dpi (Fig. 1D).

Los resultados obtenidos muestran que SA fue el inductor más eficiente de la expresión de *PRI* (y por lo tanto de SAR), mientras que el peróxido lo fue para *MPKI*, *TGAI*, en cambio el Kendal® facilitó la expresión de éstos mismos y además permitió la acumulación de virus.

Como se mencionó anteriormente, la función de *PRI* en limitar la infección por hongos patógenos está bien documentada, aunque su actividad bioquímica exacta sigue siendo poco conocida. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que al menos en el caso de TuMV, la inducción de este gen mediante SA está correlacionada con la limitación en la acumulación de virus y la alta expresión de *PRI* después de la inoculación de algún patógeno. Los resultados del tratamiento con el peróxido de hidrógeno mostraron los niveles más bajos de virus en comparación con los otros tratamientos (aparentemente no por la ruta de señalización del ácido salicílico) ya que en este tratamiento se expresaron más los genes *MPKI* y *TGAI* que *PRI*, lo que sugiere que los dos primeros pueden estar más directamente implicados en los mecanismos de defensa contra este virus. Por otro lado la aplicación del producto Kendal® (a base de NPK-oligosacarinas) promovió la inducción de genes aunque en menor proporción, esto podría en parte explicar su efecto en el control de enfermedades a largo plazo.

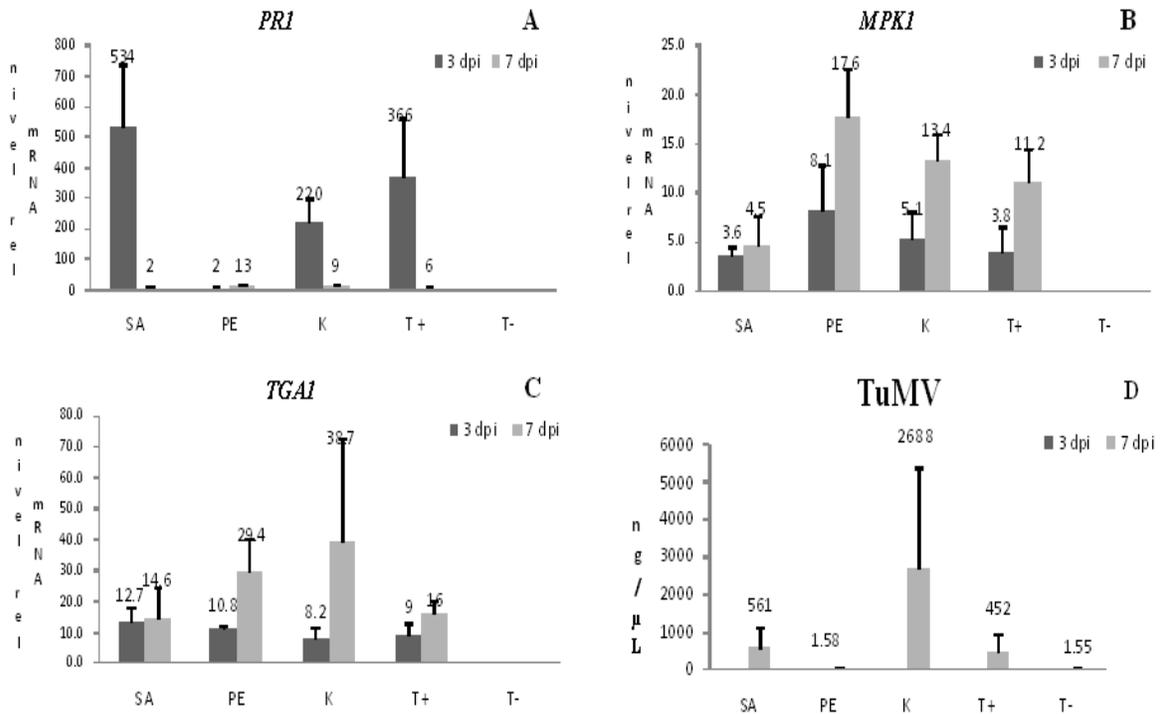


Figura 1. Análisis por qRT-PCR (método de $2^{-\Delta\Delta CT}$) de la acumulación de transcritos de los genes *PRI*, *MPK1* y *TGA1* en hojas de arabis tratadas con productos inductores de respuesta de defensa e infectadas con TuMV-GFP. SA= ácido salicílico (0.5 mM) + TuMV; PE= peróxido de hidrógeno (3 mM) + TuMV; K= Kendal® (450 μ L/200 ml) + TuMV; T+ = testigo positivo (TuMV solo); y T- = agua. A) *PRI*, B) *MPK1*, C) *TGA1*, D) TuMV-CP (método de curva standar). La barra vertical corresponde al error estándar de dos réplicas.

Por otro lado, cabe resaltar un sinergismo en el número de transcritos de *PRI* en la interacción SA+TuMV que cuando se aplica solo SA o el testigo positivo a los 3 días después aplicar o inocular según el tratamiento (Fig. 2A). A los 7 días el testigo positivo mostró el mayor número de transcritos de *PRI* pero no tan altos como en la interacción SA+TuMV a los 3 días posteriores a la inoculación.

También fue evaluado el número de transcritos de los mismos genes en plantas tratadas solo con los productos. La acumulación de transcritos de *PRI* fue mayor con respecto de *MPK1* y *TGA1* (Fig. 2B, 2C y 2D). SA fue el que mayor número de transcritos expresó para *PRI* (Fig. 2B), mientras que para el tratamiento con peróxido la expresión de los genes

MPK1 y *TGA1* fue mayor (Fig. 2C y 2D). Contrariamente, *Kendal*® mostró los valores más bajos de transcritos (Fig. 2B, 2C y 2D).

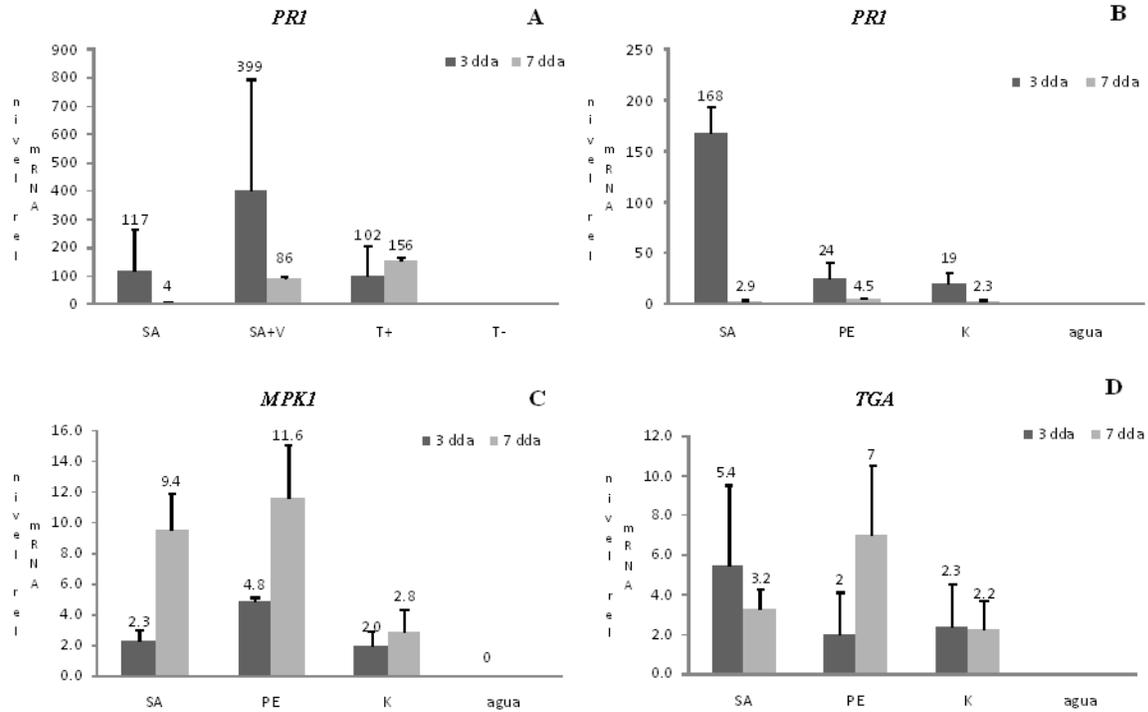


Figura 2. Análisis por qRT-PCR (método de $2^{-\Delta\Delta CT}$) de la acumulación de transcritos de los genes *PRI*, *MPK1* y *TGA1* en las hojas de arabidopsis tratadas solo con productos inductores de defensa. A) *PRI*, SA= 0.5 mM; SA+V= SA 0.5mM + TuMV; T+= TuMV; T- = agua. B) *PRI*; C) *MPK1*; D) *TGA1*. SA= ácido salicílico 0.5 mM; PE= peróxido de hidrógeno, 3 mM; K= *Kendal*® 450 μ L / 200 mL; T+= planta infectada con TuMV, T- = testigo negativo/agua. La barra vertical corresponde al error estándar de dos réplicas.

5.3 Microscopía confocal

Las plantas tratadas con los productos e infectadas con TuMV-GFP fueron analizadas mediante microscopía confocal (Fig. 3). Las plantas infectadas con TuMV mostraron amarillamiento en las hojas y necrosis en las nervaduras. Las hojas de roseta y caulinar con síntomas fueron separadas y tratadas para visualizar la fluorescencia asociada a GFP (Fig. 3A). Baja autofluorescencia de fondo se observó en este caso, correspondiente

principalmente a xilema. La fluorescencia por GFP se detectó en la misma intensidad en la mayoría de células. Por lo tanto, los tratamientos no afectaron sensiblemente los niveles de virus. Los niveles más bajos de la fluorescencia con GFP se observó consistentemente en las plantas tratadas con peróxido, lo que concuerda con los datos de RT-PCR cuantitativa. Los niveles más bajos de fluorescencia se detectaron en las plantas tratadas con peróxido en los tejidos vasculares y mesófilo de las hojas analizadas. Estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de los genes que regulan la respuesta de defensa (como *PRI*) es un mecanismo más eficiente para contrarrestar la infección de TuMV en arabidopsis. Sin embargo, se debe tener cuidado al interpretar estos resultados, ya que este análisis de fluorescencia se trata, evidentemente, de una prueba no cuantitativa.

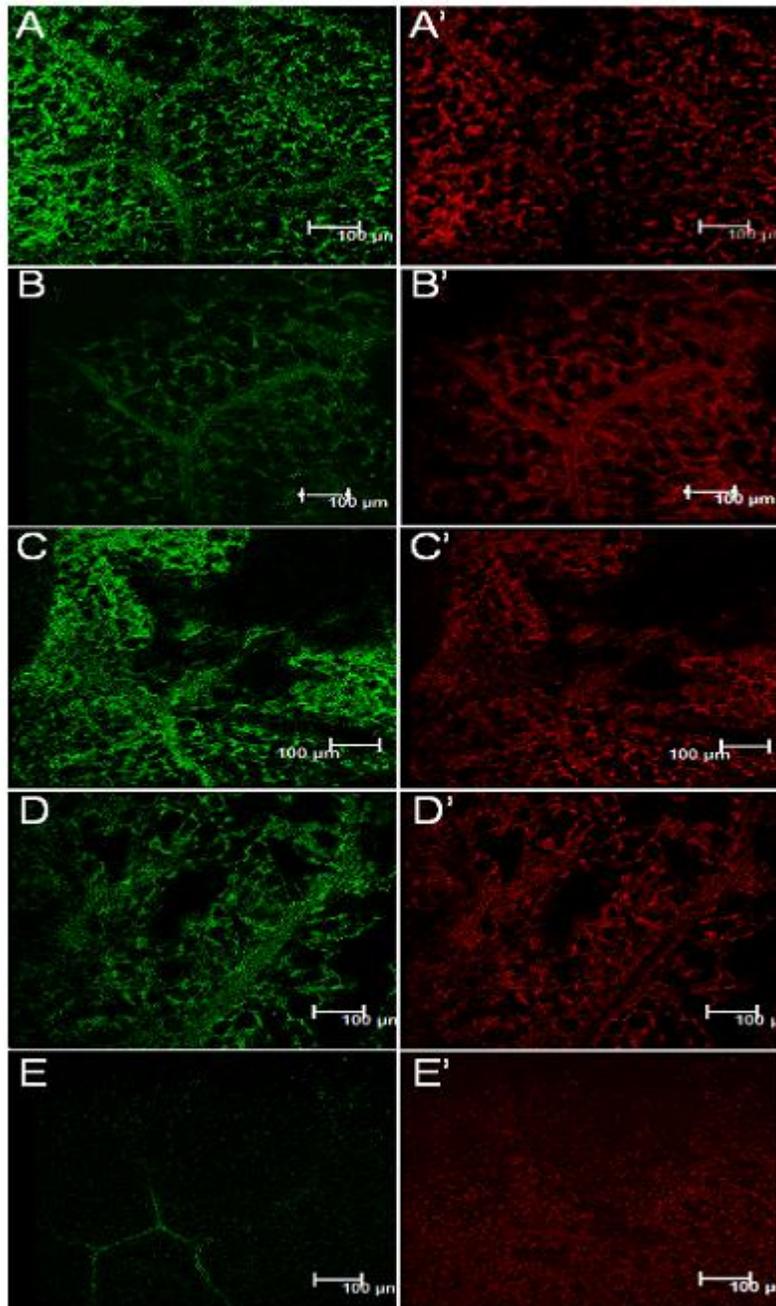


Figura 3. Imágenes de microscopía confocal de hojas de plantas infectadas con TuMV-GFP y tratadas con diferentes productos inductores de defensa. A, TuMV-GFP + SA; B, TuMV-GFP + peróxido de hidrógeno; C, TuMV-GFP + Kendal®; D, TuMV-GFP; E, agua. A', B', C', D' y 'E muestran la autofluorescencia en rojo correspondiente a la clorofila. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Leica SP5 multifotónico confocal, objetivo 20X, zoom 2X, pinhole: 600 µm.

6. CONCLUSIONES

El SA fue el mejor inductor de la expresión de *PR1*, sin embargo no fue efectivo en el control de la concentración del virus. El peróxido de hidrógeno indujo la acumulación de transcritos de *MPK1* y *TGAI* y además disminuyó los niveles del TuMV. Por otro lado, el Kendal® aumentó la concentración del virus e indujo la acumulación de los transcritos *PR1*, *MPK1* y *TGAI* en menor proporción.

7. LITERATURA CITADA

Carr J. P., Lewsey, M. G., and Palukaitis P. 2010. Signaling in induced resistance. *Advances in Virus Research* 76:57-121.

Colville, L., and Smirnov, N. 2008. Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient *Arabidopsis thaliana vtc* mutants. *Journal of Experimental Botany* 59: 3857-3868.

Dóczi, R., Brader, G., Pettkó-Szandtner, A., Rajh, I., Djamei, A., Pitzschke, A., Teige, M., and Hirt, H. 2007. The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell* 19: 3266-3279.

Durrant, W. E and Dong. X. 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209.

Huang, Z., Yeakley M.J., Wickham G. E., Holdrige J. D., Jian-Bing, F., and Whitham A.S. 2005. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible Arabidopsis-virus interactions. *Plant Physiology* 137: 1147-1159.

Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323–329.

Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J. T. 2009.

Priming in systemic plant immunity. *Science* 324:89–91.

Kesarwani, M., Yoo, J., and Dong, X. 2007. Genetic Interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and diseases resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 336-346.

Laird, J., Armengaud, P., Giutini, P., Laval, V., Milner, J. J. 2004. Inappropriate annotation of key defence marker in *Arabidopsis*: will the real *PR-1* please stand up? *Planta* 219: 1089-1092.

Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., Carrington, J.C. 2002. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection. *Current Biology* 12: 1046-1051.

Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., and Durner, J. 2010. Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* 22:2894-907.

Livak, K. J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.

Loebenstein, G. 2009. Local lesions and induced resistance. *Advances in Virus Research* 75: 73-117.

Murphy, A. M., and Carr, J. P. 2002. Salicylic acid has cell-specific effects on tobacco mosaic virus replication and cell-to cell movement. *Plant Physiology* 128: 552-563.

Nanda, A. K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., Dunand, C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 52:195-204.

Neill, J. S., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, D. R., and Hancock, T. J. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1237-1247.

Romanazzi, G., Ascenzo, D. D., and Murolo, S. 2009. Field treatment with resistance inducers for the control of grapevine Bois noir. *Journal of Plant Pathology* 91: 677-682.

Schreiber, K., and Desveaux, D. 2008. Message in a bottle: Chemical biology of induced disease resistance in plants. *Plant Pathology Journal* 24: 245-268.

Svoboda, J., and Boland, W. 2010 Plant defense elicitors: analogues of jasmonoyl-isoleucine conjugate. *Phytochemistry* 71: 1445-1449.

Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordan, X., and Holuigue L. 2004. *NPR1*-Independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 34-42.

Vasyukova, N. I., and Ozeretskoykaya O L. 2007. Induced Plant Resistance and Salicylic acid: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43: 367-373.

Vlot, A. C., Dempsey, D. A., Klessig, D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177–206

Zabotin, A.I., Barisheva, T.S., Trofimova, O.I., Toroschina, T.E., Larskaya, I.A., Zabolina, O. A. 2009. Oligosaccharin and ABA synergistically affect the acquisition of freezing tolerance in winter wheat. *Plant Physiology Biochemistry* 47: 854-858.

CAPÍTULO III

EFFECTO DE COMPUESTOS INDUCTORES DE RESISTENCIA EN ALGUNOS PARÁMETROS FENOTÍPICOS DE *A. thaliana* INFECTADA CON TuMV

RESUMEN

Se evaluó en plantas de arabis inoculadas con el *Turnip mosaic virus* (TuMV) la respuesta fenotípica a la aplicación de ácido salicílico, peróxido de hidrógeno y Kendal®. Los valores más altos en diámetro de roseta, altura de inflorescencia, número de hojas, peso de roseta y peso de inflorescencia se registraron en las plantas tratadas con los productos. Los valores más altos se obtuvieron en aquellas tratadas con peróxido de hidrógeno, superando al testigo negativo; contrariamente, el testigo positivo mostró los valores más bajos en todos los parámetros evaluados, por lo que dichas aplicaciones mostraron un efecto positivo en el desarrollo de plantas de arabis infectadas con TuMV.

CHAPTER III

EFFECT OF RESISTANCE INDUCING COMPOUNDS ON SOME PHENOTIPIC PARAMETERS OF *Arabidopsis thaliana* INFECTED WITH TuMV

ABSTRACT

The phenotypic response to the application of salicylic acid, hydrogen peroxide, and Kendal® was evaluated in *Arabidopsis* plants inoculated with *Turnip mosaic virus* (TuMV). The highest values in rosette diameter, height of inflorescence, number of leaves, rosette weight, and weight of inflorescence were registered in plants treated with the products. The highest values were obtained by plants treated with hydrogen peroxide, outscoring the negative control; contrarily, the positive control showed the lowest values in all the evaluated parameters. Therefore, these applications showed a positive effect on the development of *Arabidopsis* plants infected with TuMV.

I. INTRODUCCIÓN

Los elicitores son moléculas de diversa naturaleza que inducen la respuesta de defensa en la planta durante la infección por patógenos. Estos inductores de defensa disparan respuestas fisiológicas y morfológicas así como la acumulación de fitoalexinas (Mejía-Teniente *et al.*, 2010). Existen en el mercado varios productos químicos que han mostrado la capacidad de inducir resistencia a estrés biótico y abiótico. No sorprende que algunos de ellos estén estructuralmente relacionados con el ácido salicílico y oligosacáridos, productos conocidos como inductores de resistencia a patógenos. Diversas moléculas con efectos protectores son reportadas en varias investigaciones como por ejemplo aminoácidos, vitaminas y ácidos grasos (Vlot *et al.*, 2010; Svoboda y Boland, 2010), los cuales se han utilizado en diversos cultivos donde se ha observado protección al ataque de patógenos, particularmente el quitosano, laminarina, oligosacarinas y varios análogos estructurales del ácido salicílico, como el INA y BTH (Schreiber y Desveaux, 2008). Otros compuestos como tiamina, metil jasmonato, ácido poliacrílico, oligosacáridos y β -amino butírico se han empleado a gran escala (Schreiber y Desvaux, 2008; Uquillas *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Vasyukova y Ozeretskoykaya, 2007; Schreiber y Desvaux, 2008; Loebenstein, 2009; Carr *et al.*, 2010).

Algunos productos comerciales como Biorend®, Fosfimax®, Kendal®, Messenger® y ReziSt® formulados con mezclas complejas de extractos de hojas, nitrógeno, fósforo, potasio, oligosacáridos, poliaminas y glutatión se recomiendan como fertilizantes foliares pero se han utilizado para inducir la respuesta de defensa frente a patógenos en algunos cultivos. Kendal® que es una mezcla de nitrógeno (2%) + fósforo (P_2O_5 , 24%) + potasio (K_2O , 17 %) + extractos de plantas + oligosacarinas-vitaminas-glutatión (8%). Es probable que algunos de estos compuestos desencadenen la resistencia sistémica adquirida, o bien, sensibilicen a la planta para expresar respuestas de defensa (Mejía-Teniente, 2010; Schreiber y Desvaux, 2008; Romanazzi *et al.*, 2009).

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de ácido salicílico (SA), peróxido de hidrógeno (PE) y Kendal® en algunas características fenotípicas de plantas de *arabidopsis* infectadas con TuMV.

3. HIPÓTESIS

La aplicación de productos inductores de resistencia permite a la planta abatir el daño causado por TuMV.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal y tratamientos

El experimento se estableció en invernadero utilizando plantas de *A. thaliana* obtenidas de semilla y establecidas en macetas de 15 X 15 X 20 cm conteniendo suelo estéril, peat moss a las cuales se les proporcionó riego y fertilización con el producto Miracle-Gro® cada semana. Cuando las plantas tuvieron 40 días de edad (inicio de la formación de la inflorescencia) se asperjaron al follaje los siguientes productos: ácido salicílico (SA, 0.5 mM), peróxido de hidrógeno (PE, 3 mM) y Kendal® (K, 450 µL/200 ml). Al día siguiente después de la aspersión, el vector binario que contiene TuMV-GFP (GFP-pCBTuMV) donado por el Dr. James Carrington (Universidad de Óregon, Corvallis), se inoculó mecánicamente en las mismas hojas asperjadas previamente con los productos inductores de defensa. El testigo positivo consistió en planta infectada solo con el virus, mientras que el testigo negativo lo fue aspersión de agua. Las plantas se mantuvieron en invernadero durante su evaluación.

4.2 Variables evaluadas y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones y el experimento se realizó cuatro veces de manera independiente. A los 3, 7 y 10 días posteriores a la inoculación (dpi) se registró: la altura de inflorescencia (cm), el diámetro de roseta (cm) y

el número de hojas de roseta. Adicionalmente se cuantificó el peso fresco de roseta (gr) y la altura de inflorescencia (cm) a los 10 dpi debido a que fue una medición que involucraba la destrucción de las plantas.

El número de hojas correspondió solo aquellas donde al menos el 50% de la superficie foliar se mantenía de color verde claro y turgente. Debido a la variabilidad inherente de las plantas observada al inicio de los experimentos, se consideró la diferencia observada entre los 3 y 10 dpi de las variables altura de inflorescencia, diámetro de roseta y número de hojas de roseta.

Se analizaron cuatro experimentos de forma conjunta con un modelo lineal que incluyó el efecto de tratamiento, experimento y la interacción de ambos factores. El modelo estadístico fue el siguiente:

$Y_{ijk} = \mu + \alpha + \tau + \alpha\tau + \varepsilon_{ijk}$; con $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$ donde: μ = media general, α = efecto del experimento, τ = efecto de tratamiento, $\alpha\tau$ = interacción experimento /tratamiento y ε_{ijk} = efecto asociado al error experimental.

Cuando hubo efecto de tratamiento, las medias se compararon con la prueba t de Student y se consideraron diferencias significativas cuando el nivel de significancia fue inferior a 0.05.

Para conocer si las variables en estudio fueron afectadas por los tratamientos, se procedió a realizar un análisis de componentes principales (ACP) para explicar el comportamiento de un conjunto de variables relacionadas, a partir de un número menor de variables (componentes) y así reducir el número de variables en estudio al eliminar los atributos que aportan poca información se remueve la redundancia de variables y el efecto aleatorio entre variables correlacionadas y consecuentemente se logra una mejor comprensión de los resultados obtenidos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Características fenotípicas de las plantas tratadas con inductores

De manera general, las plantas de *Arabidopsis thaliana* mostraron síntomas asociados a la infección de TuMV consistentes en necrosis de venas y lámina foliar así como amarillamiento (Fig. 1). Así mismo se observó reducción en la altura de plantas y vigor de las plantas por la presencia del virus.

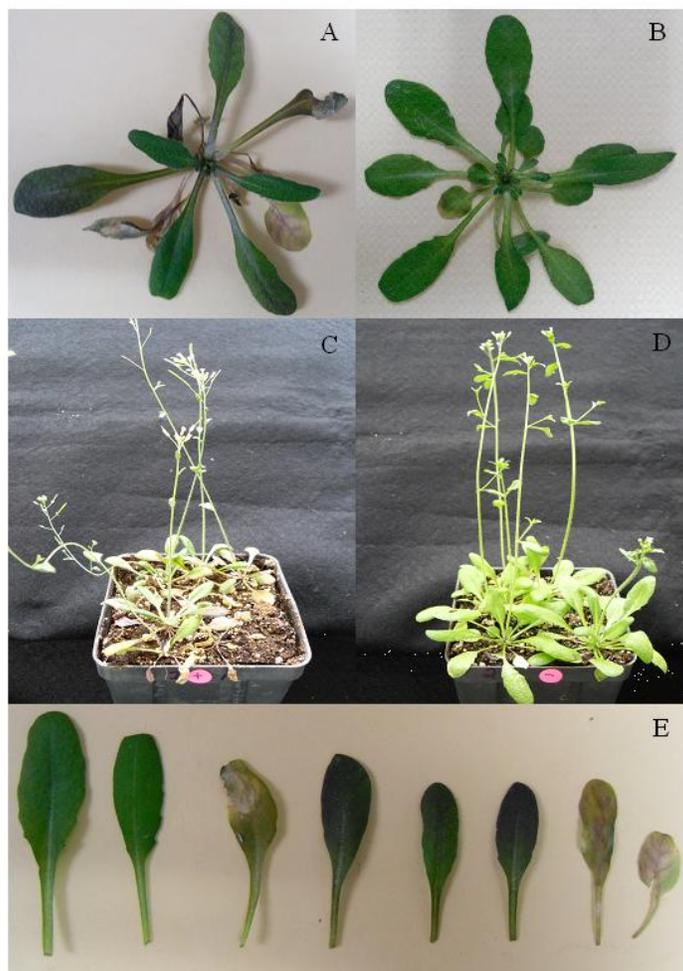


Figura 1. Síntomas inducidos por TuMV en plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas. A) roseta con síntomas de clorosis, amarillamiento y necrosis, B) roseta de planta sana, C) altura y vigor de planta infectada con el virus, D) altura y vigor de planta sana, E) hojas infectadas con diferentes síntomas.

No se tuvo interacción entre tratamientos y experimentos ($p > 0.05$), pero sí se observaron diferencias entre experimentos y entre tratamientos. La figura 2 muestra el desarrollo de la roseta de *A. thaliana* tratadas con los inductores a los 50 días posteriores a la inoculación (dpi) con TuMV y algunos de sus síntomas.

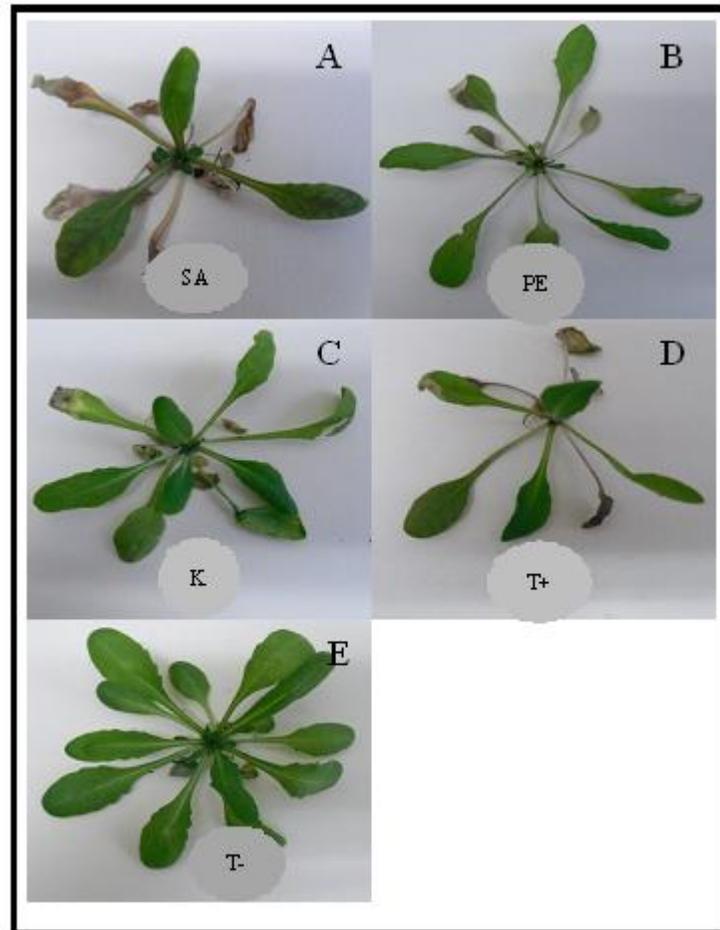


Figura 2. Aspectos fenotípicos de la roseta de *A. thaliana* tratadas con productos inductores de resistencia e infectadas con TuMV-GFP a los 50 días posteriores a la inoculación. A) ácido salicílico (SA, 0.5mM) + TuMV; B) peróxido de hidrógeno (PE, 3mM) + TuMV; C) Kendal® (K, 450 μ L/200mL) + TuMV; D) testigo positivo (T+, solo con TuMV); E) testigo negativo (T- = agua).

Las aplicaciones de peróxido y Kendal® aumentaron el diámetro de roseta (2.85 y 2.71, respectivamente) significativamente con respecto al testigo positivo (1.53) (Fig. 3A). El TuMV es un virus que retarda el desarrollo de planta, por lo que las plantas infectadas del

experimento no fueron la excepción. Guo *et al.*, (2005) mencionan que el TuMV puede reducir el desarrollo de plantas de rábano, lo cual puede estar asociado a la baja actividad de la enzima RUBISCO como respuesta a la infección viral.

El tratamiento con peróxido tuvo mayor altura de inflorescencia (20.58 cm) comportándose por arriba del testigo negativo (19.26) y Kendal® (18.58) de una manera significativa con respecto al tratamiento testigo positivo, que presentó el más bajo desarrollo de planta (16.6) (Fig. 3B). Guo *et al.*, (2005), mencionan que la infección por TuMV puede disminuir la altura de plantas de aunque no de manera significativa. En rábano, brócoli y roqueta el TuMV causa mosaico, malformaciones foliares y enanismo (Conti *et al.*, 2001). Con base en los resultados obtenidos, se establece que los productos aplicados protegen a la planta y aminoran los efectos dañinos del virus en su fisiología.

En relación al número de hojas de roseta, el testigo negativo presentó el menor número de hojas muertas seguido del tratamiento Kendal®. Los tratamientos que mayor número de hojas perdieron fueron testigo positivo y SA (Fig. 3C). De similar manera, una aparente disminución en el número de hojas sin ser significativo, se reportó en plantas de rábano infectadas con TuMV (Guo *et al.*, 2005).

Para las variables peso fresco de roseta, el peróxido mostró el mayor peso (0.249) seguido de testigo negativo (0.239) y Kendal® (0.222), contrariamente el SA y el testigo positivo mostraron los más bajos pesos (0.156 y 0.114, respectivamente) (Fig. 4A)

En el caso de la variable peso de la inflorescencia, el peróxido mostró los valores más altos (0.359) que los demás tratamientos, siendo el testigo positivo el que menor peso tuvo (0.169). Guo *et al.*, (2005) mencionan que la biomasa de las hojas y raíz es afectada por infecciones de este virus (Fig. 4B).

De manera general, la aspersión con los productos peróxido y Kendal® mostraron una tendencia a contrarrestar los daños causados por TuMV en diámetro de roseta, número de hojas de roseta, altura de inflorescencia, peso de roseta y peso de inflorescencia. De éstos, el peróxido fue el que mostró los valores más altos en las variables mencionadas, superando incluso al testigo negativo. Contrariamente, el testigo positivo mostró los valores más

bajos en todas las variables evaluadas, lo que enfatiza que infecciones sistémicas por TuMV merman la actividad fotosintética de la planta y con ello todas las variables fenotípicas importantes en el desarrollo de la misma (Guo *et al.*, 2005).

El SA no mostró el efecto esperado, ya que presentó un comportamiento parecido al testigo positivo. Lo anterior pudo deberse a la concentración empleada de SA en este estudio no fue significativa para suprimir los daños provocados por la infección viral. Rajjou *et al.*, (2006) recomiendan usar bajas dosis de SA, ya que niveles arriba de 1mM causan efectos nocivos en la planta. Se sabe también que la interacción de la replicasa de algunos virus con los factores de transcripción ATAF2 (factor involucrado en respuesta de defensa) de arabis puede ser alterada al tratar las plantas con SA en la acumulación viral de TMV y con ello los procesos de infección en los distintos tejidos (Wang *et al.*, 2009).

El tratamiento Kendal® no garantizó un eficiente control del virus, ya que su comportamiento fue siempre por debajo que el testigo negativo, sin embargo, siempre fue mejor que el testigo positivo. Romanazzi *et al.*, (2009), encontraron que la aplicación del Kendal® promueve la recuperación de plantas de vid infectadas por fitoplasmas tras la aplicación del producto durante dos años seguidos.

Por otro lado, el análisis de correlación del análisis multivariado mostró que todas las variables están correlacionadas significativamente, excepto diámetro de roseta con peso de inflorescencia y no hubo correlación del número de hojas de roseta con ninguna otra variable (Cuadro1). Al hacer el análisis de componentes principales se observó que los dos primeros componentes muestran el 95% de la variación. Siendo el primer componente (82.64 %) el promedio de todas las características fenotípicas, mostrando la varianza más alta y por lo tanto la mayor capacidad explicatoria de los datos. El segundo componente (12.78%), es la diferencia entre el diámetro de roseta y altura de inflorescencia contra el número de hojas de roseta. Estos dos componentes mostraron ser los factores determinantes en la respuesta al tratamiento con inductores e infectadas con el virus. Al graficar en dos planos los componentes principales se observó que el SA se comportó más relacionado con el tratamiento testigo positivo, mientras que las aplicaciones de peróxido y Kendal® se parecen más al testigo negativo (Fig. 5).

En general las aplicaciones con productos inductores de resistencia mostraron los valores más altos en diámetro de roseta, altura de inflorescencia, número de hojas, peso de roseta y peso de inflorescencia, destacando las aplicaciones con peróxido de hidrógeno, por lo que puede sugerirse que dichas aplicaciones muestran un efecto positivo en el control de infecciones virales por TuMV en arábido. Sin embargo es necesario conocer más de estas moléculas inductoras de resistencia en cultivos agrícolas que permitan ser más eficientes en el control, conocer sus mecanismos de acción y producir con calidad sin contaminar el medio ambiente.

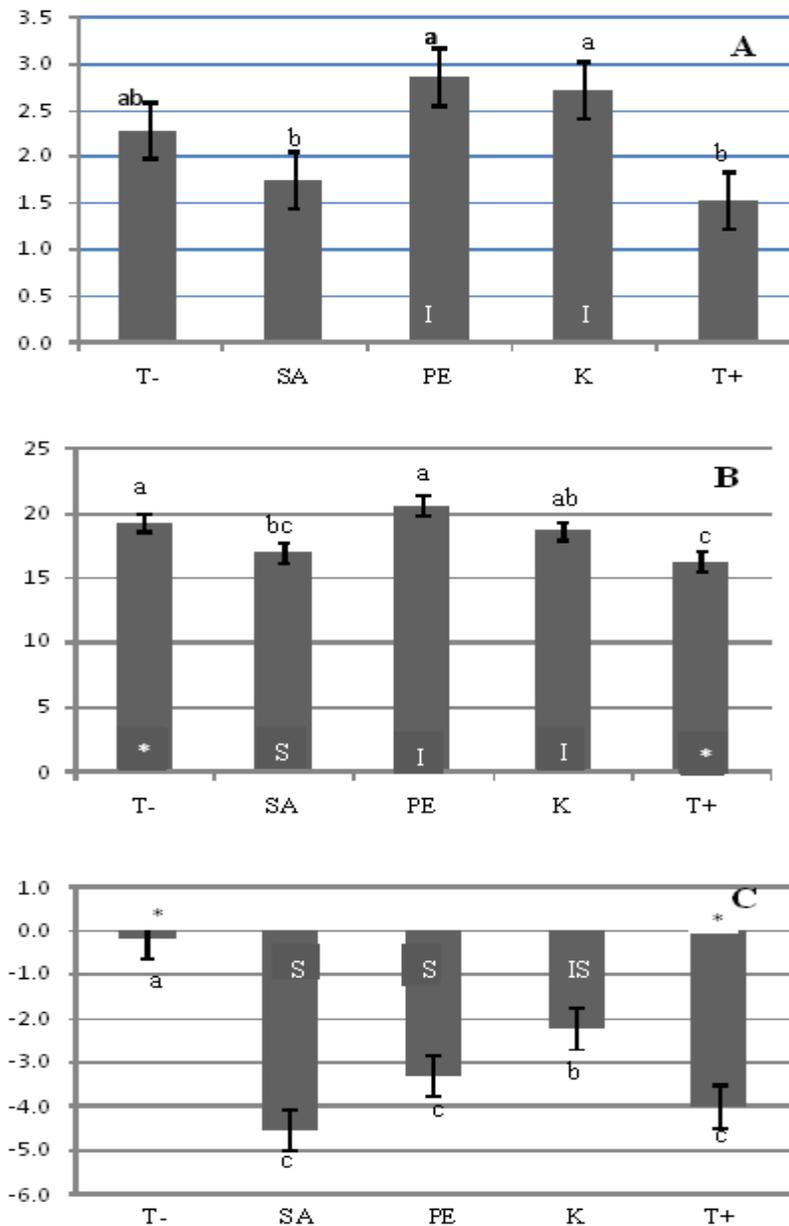


Figura 3. Comparación de medias con la prueba t de Student (Diferencias mínimas significativas, $p < 0.05$) de las características fenotípicas de las plantas tratadas con productos inductores de resistencia e infectadas con TuMV-GFP. Media de los tratamientos de la diferencia al día 10 – del día 3 posteriores a la inoculación (dpi). A) Diámetro de roseta, B) Altura de inflorescencia, C) Número de hojas de roseta. SA= ácido salicílico (0.5mM) + TuMV; PE= peróxido de hidrógeno (3mM) + TuMV; K= Kendal® (450 μ L / 200mL) + TuMV; T+ = testigo positivo (solo TuMV); T- = testigo negativo (agua). Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). La I, indica que la media es estadísticamente distinta de la media del T+. La S, indica que la media es estadísticamente distinta de la media del T-. El *, indica que la media del T- es estadísticamente distinta de las medias del T+.

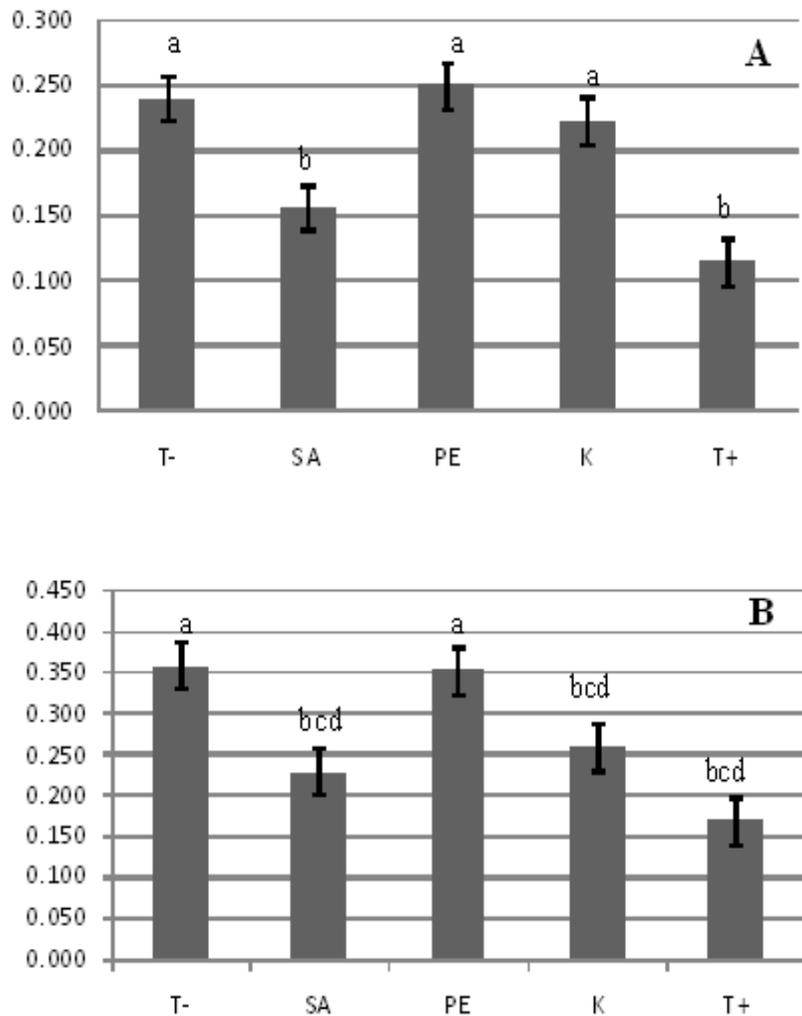


Figura 4. Comparación de medias con la prueba t de Student (Diferencias mínimas significativas, $p < 0.05$) de las características fenotípicas de las plantas tratadas con productos inductores de resistencia e infectadas con TuMV-GFP. Media de los tratamientos de la diferencia al día 10 – del día 3 posteriores a la inoculación (dpi). A) Peso de roseta, B) Peso de inflorescencia. SA= ácido salicílico (0.5mM) + TuMV; PE= peróxido de hidrógeno (3mM) + TuMV; K= Kendal® (450 μ L / 200mL) + TuMV; T+ = testigo positivo (solo TuMV); T- = testigo negativo (agua). Tratamientos con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

PARÁMETROS EVALUADOS					
Parámetros	Correlación/ significancia	Diámetro de roseta (cm)	Altura de inflorescencia (cm)	Número de hojas roseta	Peso de roseta (g)
Altura de inflorescencia	Correlación	0.912	1		
	Significancia	0.0309			
Número de hojas de roseta	Correlación	0.447	0.528	1	
	Significancia	0.4505	0.3605		
Peso de roseta	Correlación	0.917	0.961	0.666	1
	Significancia	0.0281	0.0091	0.2200	
Peso de inflorescencia	Correlación	0.745	0.935	0.667	0.933
	Significancia	0.1488	0.0196	0.2188	0.0204

Cuadro 1. Matriz de correlación de los parámetro evaluados con productos inductores de resistencia e infectadas con TuMV.

Componente principal	Porcentaje de explicación	Interpretación
Primero	82.64 %	peso de roseta, altura de inflorescencia, peso de inflorescencia, diámetro de roseta, número de hojas roseta
Segundo	12.78 %	(diámetro de roseta + altura de inflorescencia) – (número de hojas roseta)
TOTAL de varianza explicada	95.4 %	

Cuadro 2. Significado y porcentaje de los dos primeros componentes principales de los parámetros evaluados con productos inductores de resistencia e inoculados con TuMV.

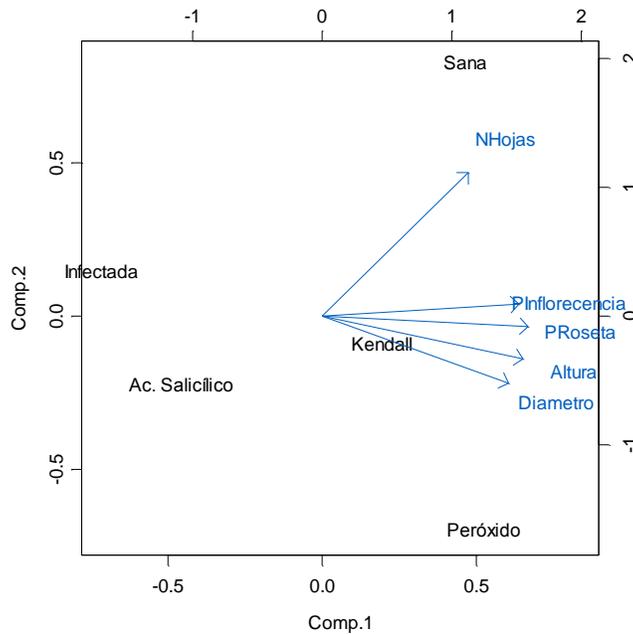


Figura 5. Representación gráfica en dos planos de las cinco variables con los dos principales componentes.

6. CONCLUSIONES

La aplicación de peróxido de hidrógeno promovió un mayor diámetro de roseta, altura de inflorescencia, peso de roseta y peso de inflorescencia. El Kendall y testigo negativo se mantuvieron por debajo de los valores del peróxido en el diámetro de roseta, peso de roseta y altura de inflorescencia. El SA y testigo positivo mostraron los valores más bajos en todas las variables estudiadas. La infección por TuMV en *A. thaliana* sin la aplicación de ningún producto provocó menor altura de inflorescencia, diámetro de roseta y peso fresco de roseta e inflorescencia.

7. LITERATURA CITADA

Carr J. P., Lewsey M. G., Palukaitis P. 2010. Signaling in induced resistance. *Advances in Virus Research* 76:57-121.

Conti, M. D. Galliteli, V.Lisa, O. Lovisolo, G.P. Martelli, A. Ragozzino, G, L. Rana y C. Vovlas. 2001. Principales virus de las plantas hortícolas. Mundi Prensa. Madrid España. 205p.

Guo, Y.-P., Guo, D.-P., Peng, Y., and Chen J.-S. 2005. Photosynthetic responses radish (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus*) plants to infection by turnip mosaic virus. *Photosynthetica* 43: 457-462.

Huang, Z., Yeakley M.J., Wickham G E., Holdrige J. D., Jian-Bing, F., and Whitham A.S. 2005. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. *Plant Physiology* 137: 1147-1159.

Loebenstein G. 2009. Local lesions and induced resistance. *Advances in Virus Research* 75:73-117.

Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., Gonzales-Chavira, M. M., Ocampo-Velazquez, R. V., Herrera-Ruíz, G., Chapa-Oliver, A.M., and Guevara-González, R. G. 2010. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology* 9: 9155-9162.

Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., and Job, D. 2006. Proteomic Investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology* 141: 910-923.

Romanazzi, G., Ascenzo, D.D., and Murolo S. 2009. Field treatment with resistance inducers for the control of grapevine bois noir. *Journal of Plant Pathology* 91: 677-682.

Schreiber, K., and Desveaux, D. 2008. Message in a bottle: Chemical biology of induced disease resistance in plants. *Plant Pathology Journal* 24: 245-268.

Svoboda, J., and Boland, W. 2010 Plant defense elicitors: analogues of jasmonoyl-isoleucine conjugate. *Phytochemistry* 71: 1445-1449.

Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordan, X., and Holuigue L. 2004. *NPR1*-Independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 34-42.

Vasyukova, N. I., and Ozeretskovskaya, O. L. 2007. Induced Plant Resistance and Salicylic acid: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43: 367-373.

Vlot, A .C., Dempsey, D.A., and Klessig D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177–206.

Wang, X., Goregaoker, S. P., and Culver, J. N. 2009. Interaction of the Tobacco Mosaic Virus replicase protein with a NAC domain transcription factor is associated with the suppression of systemic host defenses. *Journal of Virology* 83: 9720-9730.