UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales

TRABAJO EXPERIMENTAL:

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) UTILIZANDO EXTRACTO ETANÓLICO DE TORONJA (*Citrus paradisi* Macf.)

AUTOR:

ARIEL FERNANDO MORALES ARAUJO

TUTORA:

INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D.

CUENCA - ECUADOR

2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Ariel Fernando Morales Araujo con documento de identificación N° 0105782692, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana, la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación: **"EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) UTILIZANDO EXTRACTO ETANÓLICO DE TORONJA (*Citrus paradisi* Macf.)",** mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor, me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, septiembre de 2021.

Ariel Fernando Morales Araujo

C. I. 0105782692

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **"EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) UTILIZANDO EXTRACTO ETANÓLICO DE TORONJA (*Citrus paradisi* Macf.)"**, realizado por Ariel Fernando Morales Araujo, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, septiembre de 2021.

Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D.

C.I. 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Ariel Fernando Morales Araujo con documento de identificación N° 0105782692, autor del trabajo de titulación: **"EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) UTILIZANDO EXTRACTO ETANÓLICO DE TORONJA (*Citrus paradisi* Mcf.)"**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental,* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, septiembre de 2021.

Ariel Fernando Morales Araujo

C. I. 0105782692

DEDICATORIA:

A todos los que se les ha negado la educación.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES: 10

RESUMEN 12

ABSTRACT 13

ABREVIATURAS 14

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 15

ANTECEDENTES 16

JUSTIFICACIÓN 18

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 19

OBJETIVOS 19

1.1. Objetivo general: 19

1.2. Objetivos específicos: 19

HIPÓTESIS 20

MARCO TEÓRICO- 21

1. Tomate 21

1.1. Descripción 21

1.2. Cultivos de tomate en Ecuador 21

2. Toronja 22

2.1. Descripción 22

2.2. Propiedades antimicrobianas 23

2.3. Cultivos de Toronja en Ecuador 23

3. *Oidium* sp. 24

3.1. Descripción 24

3.2. Oidiopsis en tomate 24

3.3. Tratamientos con fungicidas sintéticos 25

4. Sistema inmunológico vegetal 25

4.1. Fisiología del estrés 25

4.2. Rutas de transmisión de la señal estresante 26

4.3. Proteínas PR 27

4.4. MAPKs 28

4.5. Priming SAR 29

5. Pruebas moleculares 29

5.1. qRT-PCR 29

5.2. Cuantificación Relativa 30

METODOLOGÍA 34

1. Preparación del extracto 34

1.1. Obtención del material vegetal 34

1.2. Deshidratación 34

1.3. Extracción 34

1.4. Caracterización fitoquímica de fenoles 35

2. Construcción de semilleros 35

3. Determinación de la capacidad inhibitoria 35

3.1. Purificación de una cepa de *Oidium* sp. 35

3.2. Caracterización 36

3.2.1. Macroscópica: 36

3.2.2. Microscópica 36

3.2.3. Molecular 37

3.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria 37

4. Evaluación de la capacidad del extracto de toronja para estimular la expresión de genes de defensa 38

4.1.1. Aplicación del tratamiento 38

4.1.2. qPCR 39

4.1.3. Cálculo de la eficiencia de PCR y concentración inicial de ADN molde 39

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39

1. Determinación de la capacidad inhibitoria 40

1.1. Purificación y caracterización de una sepa de *Oidium sp.* 40

1.1.1. Macroscópica 40

1.1.2. Microscópica 41

1.1.3. Molecular 42

1.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria 43

2. Cuantificación de la expresión de genes de defensa 47

2.1. Extracción de ARN 47

2.2. qRT-PCR 48

2.3. Niveles de inducción de los genes (Fold Change) 50

CONCLUSIONES 60

RECOMENDACIONES 62

REFERENCIAS 63

ANEXOS 71

Anexo 1: Protocolo de extracción de ARN (Promega, 2004): 71

Anexo 2: Protocolo de obtención de ADNc Roche (2017). 72

Anexo 3: Protocolo para rt-PCR 72

Anexo 4: Resultados del procesamiento de datos en LinRegPCR. 74

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES:

Ilustración 1 Fases de la cinética de una PCR. Fuente: Autor. 31

Ilustración 2 Estructura microscópica de *Oidium sp*. Fuente: (Barnett & Hunter, 1988, p. 69) 37

Ilustración 3 Cultivo *in vitro* de *Oidium sp*. en SDA. Fuente; El Autor. 40

Ilustración 4 Estructuras de *Oidium sp* vistas al microscopio con Azul de Lactofenol. Fuente: El Autor. 41

Ilustración 5 Estructuras y esporas de *Oidium sp*. Fuente: El Autor..... 42

Ilustración 6 Tamaño del producto de amplificación utilizando los primes ITS1 e ITS4. Las bandas tienen alrededor de 600pb. Fuente: El Autor. 43

Ilustración 7 Prueba colorimétrica de fenoles con cloruro férrico al 5%. Las pruebas se hicieron por duplicado, de izquierda a derecha: HD, HF, FD, HFF. Fuente: El Autor. .. 44

Ilustración 8 Revelado con Azul de Rezasurina de la placa de micropocillos. Las columnas 1-3 HD, 4-6 HF, 7-8 FD y 9-12 HFD. Fuente: El Autor..... 44

Ilustración 9 Columnas 1-6 de la microplaca. Fuente: El Autor. 46

Ilustración 10 Siembra de inóculo de Oidum sp. en Sabouraoud Dextrose Agar con extracto de Hojas Deshidratadas de Toronja al 80%. Fuente: El Autor. 47

Ilustración 11 Dispersión de los Ct obtenidos en las dos repeticiones de qPCR en el primer tratamiento. Fuente: El Autor. 48

Ilustración 12 Dispersión de los Ct obtenidos en las dos repeticiones de qPCR en el segundo tratamiento. Fuente: El Autor..... 49

Ilustración 13 Genes housekeeping en el primer tiempo en escala logarítmica base 10. Fuente: El Autor. 50

Ilustración 14 Genes housekeeping en el primer tiempo en escala logarítmica base 10. Fuente: El Autor. 51

Ilustración 15 Cambios de expresión de los genes de estudio en el primer tratamiento. Fuente; El Autor 52

Ilustración 16 Cambios de expresión de los genes de estudio en el primer tratamiento. Fuente: El Autor. 54

Ilustración 17 Media del Fold Change según el gen amplificado. Fuente: El Autor. 56

Ilustración 18 Media del Fold Change según el tiempo de aplicación del tratamiento. Fuente: El Autor. 56

Ilustración 19 Interacción de las variables en el Fold Change. En Tratamiento*Tiempo los valores de x correspondientes son: 1 C+, 2 T y 3 B; mientras que en Gen*Tiempo: 1 PR1, 2 PR2, 3 PR3, 4 M3 y 5 M6. Fuente: El Autor. 57

RESUMEN

Se evaluó la capacidad del extracto etanólico de toronja (*Citrus paradisi* Mcf.) como elicitor de genes de defensa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y la capacidad antifúngica del extracto para ser utilizado como una alternativa a los pesticidas sintéticos. Se determinó la concentración mínima inhibitoria por el método de micro dilución en placa con diferentes extractos de diferentes órganos vegetales de toronja, contra una cepa aislada de *Oidum neolycopersici*, agente causal de la cenicilla o mildiú polvoroso, enfermedad común en los invernaderos de tomate. El extracto que mayor eficacia tuvo fue una solución al 10% p/v de hojas deshidratadas de toronja y etanol al 60%, la CMI determinada para este tratamiento fue del 80%. Los genes de defensa estudiados fueron los que codifican las proteínas PR1, PR2, PR3 y las proteínas cinasas MAPK3 y MAPK6. Mediante qPCR se determinó el cambio de expresión con dos genes housekeeping: ACT y EF. Se realizaron dos corridas experimentales, a las 9 y 11 semanas de germinación de las plantas. El extracto de toronja fue el más eficaz en el primer tiempo de estudio, y en general es una buena alternativa como pesticida y es capaz de elicitar genes de defensa. Los cambios de expresión obtenidos en el primer tratamiento para el extracto de toronja (log2) fueron: 4.74 PR2, 2.5 PR3, 1.24 MAPK3 y -0.76 MAPK6; y en el segundo tratamiento: 0.26 PR1, 0.13 PR2, -0.55 PR3, 2.2 MAPK3 y 0.78 MAPK6.

Palabras clave: Resistencia Antimicrobiana, PCR Cuantitativa, Extracto, Natural, Toronja, Microdilución.

ABSTRACT

The capacity of an ethanolic extract of grapefruit (*Citrus paradisi* Mcf.) as a primer of natural defenses on tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) and its antifungal capacity as an alternative for synthetic pesticides was tested. The Minimal Inhibitory Concentration was determined with the microdilution test with extracts from different grapefruit organs against an *Oidium neolycopersici* strain, causal agent of powdery mildew in tomato greenhouses. The extract with more efficiency was a dried leaves solution 10% w/v with ethanol 60%, the MIC was at an 80% concentration. The defense genes studied were for proteins PR1, PR2, PR3, MAPK3 and MAPK6. With qPCR it was measured the fold change in the expression against two housekeeping genes: ACT and EF. Two assays were done at the ninth and eleventh week after sprouting. Grapefruit extract was more effective in the first treatment and overall, a good pesticide alternative, capable of priming defense. The Fold Change (log2) obtained for the grapefruit extract on the first treatment are 4.74 PR2, 2.5 PR3, 1.24 MAPK3 y -0.76 MAPK6; and on the second treatment: 0.26 PR1, 0.13 PR2, -0.55 PR3, 2.2 MAPK3 y 0.78 MAPK6.

Kew words: Microbial Resistance, qPCR, Natural, Extract, Grapefruit, Microdilution.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNc: ADN de cadena complementaria.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

B: Blanco

C+: Control Positivo

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PDC: Caldo Papa Dextrosa.

PR: Pathogenesis Related.

qPCR: PCR cuantitativa.

SDA: Sabouraud Dextrose Agar.

T: Toronja

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los desafíos más grandes de la sociedad actual es la producción limpia y sostenible de productos alimenticios. Entidades nacionales e internacionales proponen actualizaciones a las normativas y requerimientos de nuevos estándares de calidad y regulaciones al uso de agroquímicos. En el caso de Ecuador, los productores de tomate deben regirse a las Buenas Prácticas Agrícolas propuestas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) y la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (Agrocalidad) (Agrocalidad, 2015).

Varios de los gases y contaminantes nocivos que provocan la crisis climática actual tienen su origen en el agro. El uso de fungicidas en invernaderos y almacenes es una de las técnicas más comunes para controlar las enfermedades en las plantas. La mayoría de los fungicidas y nematicidas son sustancias potencialmente dañinas para el ambiente y extremadamente tóxicas para los consumidores (Zamanizadeh, Hatami, Aminaee, & Rakhshandehroo, 2011). Estos productos sintéticos, en su uso extendido provocan que los organismos generen resistencia y sea necesario utilizar productos cada vez más tóxicos. Al usar pesticidas naturales, o en el caso de este estudio un producto que estimule las defensas naturales de las plantas de tomate, las fuentes de contaminación se reducirían y la calidad de los alimentos producidos mejoraría.

ANTECEDENTES

El tomate es la segunda hortaliza de mayor consumo en el mundo, tanto en fresco como procesado (Blancard, 2011). Según datos de la FAO (2017), la producción mundial de tomate para el consumo fresco se eleva a más de 241 millones de toneladas con un aumento continuo en la producción. En Ecuador, el INEC (2017) reportó una producción nacional total de 62 675 Tm, siendo la Sierra la región con mayor aporte de producción. En 2018 hubo una pérdida de 59 hectáreas cultivadas de tomate, de éstas, el 76% (45 ha) se debió a plagas y enfermedades (INEC, 2018).

Los requerimientos ambientales de esta especie incluyen alta temperatura y humedad, creando el ambiente propicio para la proliferación de patógenos (Meza et al., 2013). En Ecuador, la mayoría de los cultivos se realiza en invernaderos. Uno de los patógenos que atacan a los cultivos de tomate en invernaderos el hongo *Oidium sp.* causante de la cenicilla u oidiopsis (Bernal, 2010). Este hongo, perteneciente a los mildiú polvoroso, provoca manchas cloróticas en las hojas de la planta que al avanzar la infección causa defoliación. Para su control se sugieren fungicidas químicos como Boscalid, Flutriafol, Pyraclostrobin, Tiabendazol, troforina, y preparados sulfurosos (Bernal, 2010; Blancard, 2011; Jones, Whipps, & Gurr, 2001; Meza et al., 2013).

Las plantas poseen mecanismos moleculares frente al estrés, ya sea causado por agentes bióticos o abióticos, proveyéndole de inmunidad. Los ataques de hongos y bacterias son los más comunes, las plantas producen fitoalexinas (terpenos o fenoles) o proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR). Cuando se producen respuestas de hipersensibilidad o resistencia sistémica adquirida se activan rutas metabólicas que incrementan la las defensas de la célula, reforzando la pared celular,

produciendo especies reactivas de oxígeno, fitoalexinas o proteínas de defensa (Azcón Jieto & Talón, 2013; Conrath, Beckers, Langenbach, & Jaskiewicz, 2015; Kong et al., 2012; Planello Carro, Carro, & Escaso Santos, 2010).

Un estudio similar fue realizado por Malo, De Bastiani, Arevalo, & Bernacchia (2017), en el cual se utilizaron extractos naturales de ají rocoto (*Capsicum annum*, var Rocoto), ruda (*Ruta graveolens*) y clavo (*Syzygium araomaticum*) obteniendo resultados positivos al aumentar el nivel de transcripción de los genes de defensa y regulación de las plantas de tomate.

JUSTIFICACIÓN

Las principales enfermedades que afectan al cultivo de tomate son el Oidio (*Oidium sp*.), Lancha (Phytophthora infestans) “Botrytis” (Botrytis cinerea) y Mancha negra (Erwinia sp. y Pseudomonas sp.). El costo para el control de plagas y enfermedades en muchos casos puede elevarse hasta el 20% del costo de la producción (Villavicencio & Vásquez, 2008). Este fruto es el cuarto cultivo de mayor importancia a nivel nacional, y entre las solanáceas, es el de mayor interés científico.

En Ecuador, la mayoría de los cultivos se realizan en invernaderos, susceptibles a enfermedades fúngicas por la alta humedad (65-75%) y temperatura (21-27 °C), las cuales proveen las condiciones adecuadas para el desarrollo de microorganismos mesófilos patógenos. Entre estos, uno de los más comunes es el hongo de la cenicilla (*Oidium sp*.). Este hongo es un parásito obligado que produce en primera instancia manchas blancas polvorosas que cubren la cara superior de las hojas de tomate. “Este fieltro blanco está en realidad constituido por una red miceliana que coloniza superficialmente el limbo” (Blancard, 2011). A medida que la infección avanza, los tejidos se vuelven cloróticos y en casos graves produce necrosis. Para su control se sugiere el uso de pesticidas químicos (Bernal, 2010), que pueden afectar la calidad del producto, agua y suelos.

Al igual que los humanos, las plantas poseen mecanismos inmunológicos que les proveen de resistencia a ciertos patógenos algunos de estos mecanismos son preexistentes y otros pueden ser inducidos (Malo, Bernacchia, & Arevalo, 2015). La tendencia actual busca reemplazar el uso de pesticidas químicos por sustancias orgánicas que sean inocuas tanto para el agricultor como para el consumidor y no afecte

la calidad del alimento. Las pruebas moleculares, proveen un alto grado de precisión de los resultados, es posible determinar la capacidad de un compuesto de estimular la síntesis de determinados ARNm que luego serán traducidos en proteínas y enzimas que servirán de defensa para la planta.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Puede el extracto etanólico de toronja blanca (*Citrus paradisi* Macf) estimular la expresión de genes de defensa en las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)?

OBJETIVOS

1.1. Objetivo general:

Evaluar la capacidad del extracto etanólico de toronja blanca (*Citrus paradisi* Macf.) de generación de estímulo para la expresión de genes de defensa en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) por qRT-PCR como sustituto a los pesticidas tradicionales y la capacidad antifúngica *in vitro* contra *Oidium* sp.

1.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar una cepa de *Oidium* sp. aislada de hojas infectadas de cultivos de tomate en invernaderos por medio de claves taxonómicas y técnicas moleculares, para su uso en técnicas microbiológicas.

- Determinar la sensibilidad del hongo *Oidium sp* frente al extracto etanólico de toronja blanca (*Citrus paradisi*) aplicando pruebas estandarizadas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.
- Determinar la expresión de los genes de defensa de las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) PR1, PR2, PR3, MAPK3, MAPK6 mediante qPCR aplicando métodos estadísticos luego del tratamiento con extracto etanólico de toronja blanca (*Citrus paradisi*).
- Elaborar una propuesta de artículo científico respetando los formatos internacionales para la posible divulgación de los resultados obtenidos.

HIPÓTESIS

El extracto etanólico de toronja blanca (*Citrus paradisi*. Macf.) tiene la capacidad de generar una respuesta en la expresión de genes de defensa de las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y podría servir como una alternativa al uso de pesticidas sintéticos.

MARCO TEÓRICO

1. Tomate

1.1. Descripción

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una solanácea originaria de América y distribuida por el mundo después de la conquista y colonización europea en el continente. Es una planta diploide que tiene 24 cromosomas (Blancard, 2011). Es una hierba de vida corta que puede alcanzar una altura de un metro. El tallo es erecto y flexible, busca estabilidad en plantas cercanas. Las hojas son alternas de tamaño grande, llegando a medir hasta 25cm, tienen divisiones en la base, el ápice es puntiagudo y el margen es aserrado. Tienen inflorescencias dispuestas en racimos que crecen en las bifurcaciones de los tallos, las flores individuales tienen cinco sépalos, la carola es amarillenta con forma de estrella de cinco pétalos, tiene cinco estambres y las anteras están unidas rodeando al estilo. Los frutos son bayas carnosas y tiernas de color, forma, tamaño y consistencia variable (Blancard, 2011; Hanan Alipi & Mondragón Pichardo, 2009).

1.2. Cultivos de tomate en Ecuador

El tomate es la segunda hortaliza de mayor consumo en el mundo, tanto en producto fresco como procesado (Blancard, 2011). Según datos de la FAO (2017), la producción mundial de tomate para el consumo fresco se eleva a más de 241 millones de toneladas con un aumento continuo en la producción. En Ecuador, el INEC (2017) reportó una producción nacional total de 62 675 Tm, siendo la Sierra la región con mayor aporte de producción. En 2018 hubo una pérdida de 59 hectáreas cultivadas de tomate, de éstas, el 76% (45 ha) se debió a plagas y enfermedades (INEC, 2018).

2. Toronja

2.1. Descripción

La toronja (*Citrus paradisi Macf*.) es un cítrico, probablemente originario de América. Se supone su origen a un posible híbrido natural producido entre pomelo y naranjas dulces. Las toronjas pueden clasificarse en dos grupos grandes por la capacidad de producir licopeno en la pulpa de sus frutos: blancas y rosas (Ballistreri et al., 2019; Khare, 2007). Es el segundo cultivo de cítricos más importante en el mundo debido a que su consumo produce múltiples beneficios a la salud. (de la Rosa-Hernández, Wong-Paz, Muñiz-Márquez, Carrillo-Inungaray, & Sánchez-González, 2016).

El árbol de toronja puede alcanzar una altura de 6m y el diámetro del tronco de un árbol joven puede ser de 15cm. Las ramas tienen pequeñas espinas flexibles cuando son jóvenes. Las hojas son ovaladas, simples y los bordes tienen denticulaciones sutiles, tienen abundantes tricomas que exudan aceite. Las flores son pequeñas, de color blanco y con cuatro pétales. Los frutos son casi esféricos, su corteza es suave, gruesa y con abundantes glándulas oleosas, es de color amarillo, o en algunas variedades con manchas rojizas y el interior tiene una capa blanca esponjosa y amarga. La pulpa puede ser de un color amarillo pálido, rosada o roja intensa según la variedad y la presencia o ausencia de la capacidad de producción de licopeno. Tiene entre 11 y 14 carpelos separados con una pared membranosa fina que en algunos casos es amarga. Las semillas son blancas, tienen forma elíptica puntiaguda. En el mercado nacional e internacional existen variedades que tienen numerosas semillas y otras que carecen de ellas (Morton, 1987).

2.2. Propiedades antimicrobianas

Existen extractos de toronja comerciales hechos a partir de las semillas y pulpa con un alto potencial antibacterial y antifúngico. Este extracto es rico en flavonoides y polifenoles, los cuales se enlistan en la Tabla 1:

Tabla 1: Flavonoides presentes en el extracto de toronja. Fuente: Autor

Flavonoide	Compuestos	Referencias
Flavanonas	Narirutina, naringina y naringenina	(Ballistreri et al., 2019; Cvetnić & Vladimir-Knežević, 2004; Nishad, Saha, Dubey, Varghese, & Kaur, 2019)
Flavonoles	Rutin	
Flavonas	Rhoifolin, diosmina	
Polimetoxiflavonas	Heptametoxiflavona, nobiletina, sinensetina y tangeretina.	
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxicinámicos son los más dominantes: ferúlicos, cafeico, Sinápico y p-cumáricos. Ácidos hidroxibenzóicos: vanílico, protocatechuic y gálico.	

2.3. Cultivos de Toronja en Ecuador

En Ecuador se cultivan mayoritariamente dos variedades de toronja blanca: la variedad Duncan, un árbol vigoroso que produce frutos de mayor tamaño con un promedio de 423g; y la variedad Marsh *seedless*, la cual carece de semillas y reduce las pérdidas en la producción por su capacidad de mantener los frutos sobre el árbol cuando

ya llegan a un estado óptimo de madurez (Valarezo, Valarezo, Mendoza, & Álvarez, 2014).

3. *Oidium* sp.

3.1. Descripción

Oidium sp. es una género de hongos pertenecientes a la familia *Erysphacea* que es el agente causal de la cenicilla o mildiú polvoroso en las partes aéreas de varias plantas superiores. Son parásitos obligados, el hospedero se convierte en una fuente de carbohidratos, aminoácidos y otros nutrientes. Para infectar a las células vegetales desarrollan un órgano especializado denominado haustorio, éste penetra permite la transferencia de nutrientes de célula hospedera al patógeno (Szabo & Bushnell, 2001). El síntoma producido en hojas maduras es la aparición de manchas cloróticas, que al aumentar área infectada producen el colapso de la hoja, necrosan el tejido, se reduce la capacidad fotosintética de la planta, y en consecuencia el rendimiento de la producción a pesar que éste hongo no ataca a los frutos (Bernal, 2010).

3.2. Oidiopsis en tomate

En el caso de las plantas de tomate la variedad que causa esta enfermedad es *Oidium neolycopersici*, afecta a más de 60 especies de 13 familias, incluyendo a las Solanaceae (Sun et al., 2019). Desde finales de la década de 1980 esta enfermedad se esparció por todos los continentes, afectado a la producción de tomate llegando a reducir el rendimiento hasta en un 50% en los casos más graves. Este hongo se encuentra principalmente en invernaderos donde se cultivan tomates puesto que el ambiente proporciona la humedad y temperatura adecuada para su proliferación (Lebeda et al., 2014; Sun et al., 2019).

3.3. Tratamientos con fungicidas sintéticos

El Instituto de Investigación Agropecuarias (INIA) recomienda el uso de Azufre para el control de la oidiopsis en casos no severos (Sepúlveda, 2018). Para casos más graves Bernal (2010) sugiere el uso de Pyraclostrobin, Pyraclostrobin+, Boscalid, Flutriafol, azufre y Sporekill. Por otro lado, Jones et al. (2001) sugieren el uso de fungicidas que contengan benomyl, bitertanol, bupirimato, carbendazim, fenarimol, pyrazophos, thiabendazol, triforine, y preparaciones sulfurosas.

4. Sistema inmunológico vegetal

4.1. Fisiología del estrés

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa estructurales, metabólicas y defensas inducidas en respuesta al estrés producido por el ambiente u organismos que puedan ser potencialmente dañinos para el organismo vegetal (Conrath et al., 2015). Los principales atacantes de las plantas son virus, bacterias, hongos e invertebrados. Algunos tienen la capacidad de superar los mecanismos morfológicos de defensa de las plantas, y otros atacan aprovechando los órganos vegetales que se comunican con el exterior como los estomas. Los patógenos han desarrollado varias estrategias para aprovecharse de las plantas de las cuales se destacan tres: la necrofilia, biotrofia y la hemibiotrofia. Algunos hongos y bacterias son necrófilos y utilizan enzimas para hidrolizar la pared celular, o toxinas para necrosar los tejidos. La biotrofia se produce cuando el patógeno toma alimentos de las células sin matarlas, este es el caso de algunos hongos, virus y nemátodos endoparásitos. Y la hemibiotrofia que combina una primera etapa biotrófica y una segunda necrotrófica (Azcón Jieto & Talón, 2013; Planello Carro et al., 2010).

La respuesta fisiológica al estrés ocurre en cuatro etapas. La fase de alarma está vinculada a la activación de los mecanismos de defensa que la planta posee para sobrellevar el ataque, la carencia de los mecanismos necesarios termina en la muerte de la planta. Las respuestas que ocurren en esta fase son modificaciones del metabolismo celular, activación de mecanismos de reparación celular y expresión de genes de defensa. En la fase de resistencia la planta alcanza un estado fisiológico óptimo que le permitirá resistir al ataque. La fase de agotamiento ocurre en el caso que el ataque sea prolongado, la resistencia se agota y la planta ralentiza o detiene sus funciones, en el caso que el factor de provoca el estrés perdure, la planta muere. La fase final es la de regeneración, ocurre cuando se supera el ataque y las funciones fisiológicas de la planta vuelven a un estado óptimo (Azcón Jieto & Talón, 2013).

4.2. Rutas de transmisión de la señal estresante

El primer nivel de reconocimiento que desencadena en la respuesta de defensa envuelve patrones de reconocimiento de receptores (PRRs) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Este tipo de inmunidad es una respuesta basal de defensa llamada inmunidad activada por PAMP (PTI). El segundo nivel del sistema inmune vegetal es efectuado por proteínas de resistencia (R) que reconocen efectores específicos de los patógenos o pestes y activan mecanismos de defensa de las plantas de una manera más efectiva (Gimenez, Salinas, & Manzano-Agugliaro, 2018). Este tipo de resistencia llamado inmunidad activada por efectores (ETI) es una respuesta más robusta y generalmente activa respuestas de hipersensibilidad (HR) en la que la célula infectada entra en un proceso de muerte programada (apoptosis), matando también a células vecinas y al patógeno (Shittu, 2019).

Luego de la exposición al factor biótico o abiótico que causa estrés, los estímulos estresantes son transformados en señales químicas o físicas que advierten a la célula de un posible ataque. La primera respuesta activada por PTI y ETI lleva a la activación de mecanismos de defensa basales de la planta. Se activan canales de iones específicos modificando los niveles de Ca^{2+} citoplasmático. Otra respuesta temprana es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y se activan las cascadas de señalización para la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Las rutas inducidas corriente abajo incluyen la acumulación de fitohormonas, de las cuales el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) estimulan la resistencia a patógenos biotróficos y hemibiotróficos. Las rutas del JA y ET son inducidas por patógenos necrotróficos y masticadores, el SA activa un tipo de resistencia llamada resistencia sistémica adquirida (SAR) que promueve la expresión de genes relacionados con la patogenicidad (PR) y sirve como respuesta preventiva en áreas alejadas del punto de infección (Conrath, 2009). Todos estos mecanismos llevan a la reprogramación de la expresión genética en el núcleo para desarrollar la mejor estrategia de defensa de la planta. (Azcón Jieto & Talón, 2013; Ben Rejeb, Pastor, & Mauch-Mani, 2014; Gimenez et al., 2018).

4.3. Proteínas PR

Las plantas, cuando son atacadas por insectos e infecciones microbianas responden típicamente con la formación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Estos son los productos de la expresión de genes relacionados con la defensa para detener el ataque del patógeno. Estas proteínas incluyen enzimas hidrolíticas: inhibidores de proteinasas capaces de inhibir la actividad proteolítica de enzimas secretadas por el

patógeno, enzimas líticas como glucanasas, quitinasas e hidrolasas que atacan las paredes celulares del atacante (Jain, 2017).

El gen que codifica la proteína PR1 se encuentra en el cromosoma 1 del tomate, posiblemente tiene actividad antifúngica, se utiliza como biomarcador para la resistencia y su expresión es inducida por enfermedades y SA. El grupo PR2 está compuesto por β1-3-glucanasas y las proteínas PR3 son quitinasas, ambas capaces de digerir las paredes celulares del patógeno e inhibir su desarrollo. La expresión de éstas dos últimas, se activa rápidamente cuando la planta es atacada (Malo et al., 2017).

4.4. MAPKs

Las *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) son proteínas de serina/treonina, cuyas rutas de señalización corriente debajo de los receptores extracelulares están altamente conservadas en eucariotas (He, Zhou, Shan, & Meng, 2018). Éstas quinasas se mantienen inactivas hasta que una MAPKK (MAP quinasa-quinasa) cataliza la fosforilación de los dos aminoácidos (Azcón Jieto & Talón, 2013). Son indispensables en procesos de activación proteica (fosforilación y desfosforilación), por lo que son excelentes candidatos para señalizar enzimas que median la capacidad de los elicitores de defensa en las plantas al ser uno de los primeros eventos de señalización en PAMPs y MAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos/microbios) (He et al., 2018). Se han identificado 16 genes de MAPK en plantas de tomate las cuales están clasificadas en cuatro subfamilias según sus secuencias y estructuras, la MAPK3 pertenece a la subfamilia A y podría estar relacionada con las respuestas al estrés biótico (Yu, Yan, Yang, & Zhu, 2014). Las otras subfamilias de las MAPK en tomates no han sido muy estudiadas, en un estudio utilizando plantas knockout *SlMAPK6* Li et al. (2021)

plantearon que esta proteína puede estar relacionada en la regulación del desarrollo de brotes auxiliares y la biosíntesis de Giberelinas (GA). Estos dos genes están regulados por la MAPKK9 en *Arabidopsis* y su expresión está ligada a respuestas de defensa en las plantas (Liu et al., 2020).

4.5. Priming SAR

Algunos compuestos naturales o sintéticos tienen la capacidad de elicitar las defensas de plantas. El ejemplo más exitoso de este proceso es el uso de BABA (ácido beta aminobutírico), el cual puede inducir respuestas que protege a los cultivos de varias enfermedades incluyendo el agente causal de la cenicilla (*Oidium neolycopersici*) al tratar las semillas con el compuesto (Baccelli & Mauch-Mani, 2016). El ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) tiene una acción mimética en las plantas e induce efectivamente la resistencia contra los principales fitopatógenos fúngicos y bacterias en varios cultivos (Conrath, 2009). Malo et al. (2017) utilizaron extractos naturales de ají, ruda y clavo para inducir la expresión de genes de regulación y defensa en *Solanum lycopersicum*, con la posible capacidad de activar rutas de señalización dependientes e independientes de SA. En un estudio en *Arabidopsis*, Zarattini et al., (2017) lograron activar el sistema inmune de esta especie utilizando soluciones de Ácido Desoxicólico 200 µM, una sal biliar secundaria que resulta como desecho en la producción industrial de Ácido Ursodesoxicólico.

5. Pruebas moleculares

5.1. qRT-PCR

Es un ensayo que permite reportar la presencia de productos de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tras cada ciclo (Roche Applied Science, 2004). El primer

proceso es la transformación de moléculas de ARN molde a cadenas de ADN complementario (ADNc) por una ADN polimerasa dependiente de ARN, también conocida como Transcriptasa Reversa. Se pueden utilizar primers específicos para el gen de interés o primers oligo dT (desoxitimina), los cuales se hibridarán a las colas poliA (poliadenina) de las moléculas de ARNm maduro (O´Connell, 2002).

Las ventajas de este ensayo es que al utilizar fluoróforos para monitorizar la amplificación de productos en cada ciclo de la PCR es un análisis cuantitativo, a diferencia de la PCR convencional que es cualitativa; permite analizar muestras que difieran en amplio rango su concentración inicial, y sus resultados son confiables y reproducibles (Bustin & Mueller, 2005). Estas pruebas generalmente se realizan con los productos obtenidos de una Transcripción Reversa de ARN a ADNc, permitiendo así cuantificar la expresión de un gen diana, para ello se utilizan Sondas TaqMan, las cuales se hibridan a una de las cadenas de ADN y al hidrolizarse emiten fluorescencia, o con tintes como SYBR Green I con primers específicos para el gen. En ambos casos, tras cada ciclo de la PCR se medirá la fluorescencia emitida por los fluoróforos, la cual será proporcional a la cantidad de moléculas amplificadas en la reacción (O´Connell, 2002).

5.2. Cuantificación Relativa

Generalmente, la cinética de una PCR está compuesta de cuatro estados, muy similares a los propuestos por Monod para el crecimiento bacteriano. El primer estadio inicial o de latencia, donde no existe cantidad de fluorescencia que supere al ruido producido por los fluoróforos. El segundo estadio es logarítmico, donde idealmente se produce una amplificación exponencial de las moléculas de ADN. Con la acumulación de factores inhibitorios y disminución de la actividad enzimática y sustratos, la reacción llega

a una fase de retardo. Finalmente, la reacción alcanza un estado estacionario donde no se producen más amplicones (Schefe, Lehmann, Buschmann, Unger, & Funke-Kaiser, 2006).

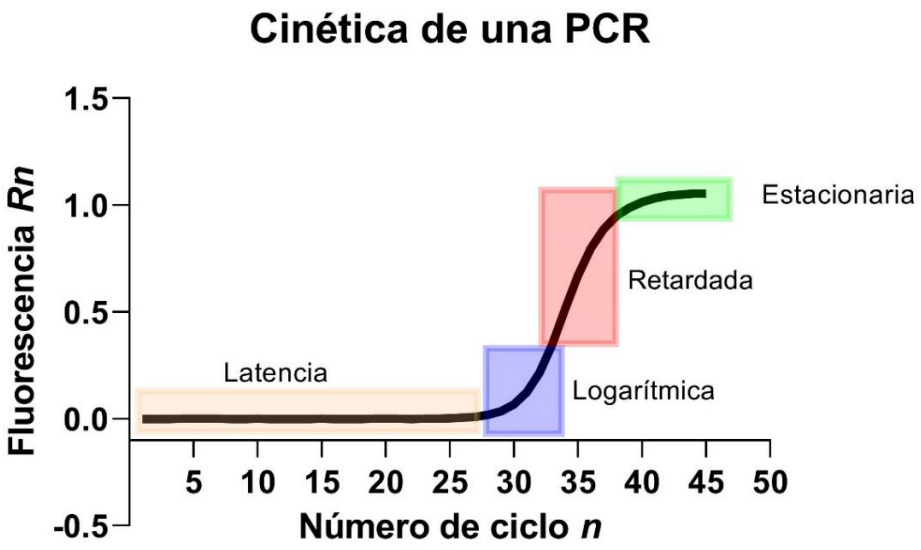

Ilustración 1 *Fases de la cinética de una PCR. Fuente: Autor.*

El análisis comparativo de C_T (ciclo umbral) o método $\Delta\Delta C_T$ permite obtener una cuantificación relativa del producto de la expresión de un gen comparado con la expresión de un gen el cual se asume que tiene una expresión constante y son indispensables para el mantenimiento de la célula (genes housekeeping) (Roche Applied Science, 2004; Schefe et al., 2006). Los resultados se expresan como el incremento o disminución fold change (cambio) de la expresión del gen afectado por el tratamiento y sin tratamiento (Bonab et al., 2015).

La fase logarítmica es crucial para el análisis de datos de la qPCR. La Ecuación 1 describe la cinética de esta fase, donde R_n y R_0 representan la cantidad de fluorescencia

proporcional a la cantidad de amplicones de ADN después de 0 (R_0) o n (R_n) ciclos, y *E* representa la eficiencia de la reacción, donde *E* ($0 \leq E \leq 1$) (Schefe et al., 2006).

$$R_n = R_0(1+E)^n$$

Ecuación 1

Para el análisis se deben obtener los C_T y la eficiencia *E* de cada pocillo de reacción. C_T es una fracción en la cual la curva de la cinética de la reacción supera el umbral de fluorescencia establecida por el programa o el usuario. Por el otro lado, *E* teóricamente sería equivalente a 1, asumiendo que en cada ciclo de PCR se duplica el número de amplicones. No obstante, varios factores como restos de fenol, etanol, incluso transcriptasa reversa inhiben la eficiencia de la PCR. Por lo tanto, *E* definirá el valor de C_T. Para calcular E se puede utilizar el método de la regresión linear, donde se calcula el logaritmo (*log*) de la cantidad de fluorescencia (R_n) en cada ciclo, resultado en un gráfico lineal en la fase exponencial de la cinética de la curva de PCR. Dentro de este rango, se debe calcular la mayor pendiente de la recta con el mayor coeficiente de correlación R^2. El gráfico que se obtiene se grafica como $logR_n$ en las ordenadas y *n* (número de ciclo) en las abscisas. La pendiente se puede calcular transformando la *Ecuación 1*, donde la pendiente *s* es igual a *log(1+E)* acorde a la fórmula general de las rectas *y=mx+b*, donde m es la pendiente (Schefe et al., 2006).

$$R_n = R_0(1+E)^n$$
$$logR_n = log(1+E) \times n + log\, R_0$$
$$s = \log(1+E)$$
$$10^s = 1+E$$
$$E = 10^s - 1$$

Ecuación 2

La tasa relativa de expresión (*rER*) se calcula con la Ecuación 3 donde: *GOI* es el gen de interés y *HKG* es el gen housekeeping.

$$rER = \frac{R_{norm}(SOI)}{R_{norm}(HKG)} = \frac{\left(1 + E(GOI)\right)^{-\Delta C_T(GOI)}}{\left(1 + E(HKG)\right)^{-\Delta C_T(HKG)}}$$

Ecuación 3

Con $\Delta C_T(gen) = C_T(gen; SOI) - C_T(gen; HKG)$. Posteriormente se pueden realizar Análisis de varianza (ANOVA) para estudios estadísticos de la variación de los tratamientos aplicados (Schefe et al., 2006).

METODOLOGÍA

1. Preparación del extracto

1.1. Obtención del material vegetal

Se recolectaron hojas y frutos de un cultivo privado ubicado en la ciudad de Cuenca, Azuay. Se tomaron frutos en diversos estados de madurez y se eligieron hojas en buen estado, libres de enfermedades o heridas.

1.2. Deshidratación

Las frutas y las hojas se lavaron con agua para remover el polvo y se desinfectaron con una solución de cloro comercial al 5% para evitar el desarrollo de microrganismos dentro de la estufa. Se deshidrataron en una estufa Binder a 45 °C por tres días, el producto se pulverizó con una licuadora industrial Heavy Duty para aumentar la superficie de contacto con el solvente.

1.3. Extracción

Se utilizó una modificación del método propuesto por Nishad et al. (2019). Una solución al 10% p/v de material vegetal con etanol 60%. Se utilizó material vegetal fresco y deshidratado de la siguiente forma: hojas frescas (HF), hojas y frutos deshidratados (HFD), hojas deshidratadas (HD), y frutos deshidratados (FD). Se incubó por tres días con constante agitación y protegidos de la luz. El producto resultante se filtró con un matraz Kitasato y una bomba de vacío y se mantuvo en refrigeración protegido de la luz hasta su uso.

1.4. Caracterización fitoquímica de fenoles

Se realizó una prueba colorimétrica a los diferentes extractos obtenidos utilizando Cloruro Férrico ($FeCl_3$) al 5%. Si la solución cambia a azul oscuro, “indica la presencia de fenoles o taninos pirogálicos (hidrosolubles). Si el cambio es a verde oscuro indica la presencia de fenoles o taninos de tipo catecol (condensados)” (Hinojosa Dávalos et al., 2013).

2. Construcción de semilleros

Se adquirieron semillas certificadas en un supermercado local. Las semillas se hidrataron por 48 horas previa su siembra para facilitar el proceso germinativo, posteriormente se colocaron en los semilleros con sustrato compuesto por humus y arena en una proporción 3:1. Se colocaron los semilleros dentro un pequeño invernadero para mantener la humedad y aislar las plantas del ambiente, evitando el contagio y ataques de patógenos. Transcurrido un mes se trasplantaron los brotes a macetas más grandes con sustrato de las mismas características mencionadas anteriormente y se mantuvo las plantas dentro del mismo invernadero hasta la aplicación de los tratamientos.

3. Determinación de la capacidad inhibitoria

3.1. Purificación de una cepa de *Oidium* sp.

Se tomaron muestras de hojas contaminadas con el hongo de invernaderos del cantón Paute, provincia del Azuay. Estas se almacenaron en bolsas autosellantes y se mantuvieron en refrigeración hasta su resiembra. También se tomaron muestras con isopos estériles que se colocaron en agua de peptona. Posteriormente se cultivaron en

medio SDA, se mantuvieron las cajas Petri en una estufa a 25 °C y cada 3-4 días se realizaron resiembras hasta obtener un cultivo homogéneo.

3.2. Caracterización

3.2.1. Macroscópica:

El micelio crece en el exterior del hospedero, forma un micelio blanco polvoriento. Los conidióforos son erguidos y simples; la parte superior crece a media que se forman los conidios. (Barnett & Hunter, 1988; Jones et al., 2001; Lodge et al., 2004).

3.2.2. Microscópica

Al observar al microscopio se busca que el hongo tenga una estructura similar a la propuesta por Barnett & Hunter (1988) que se observan en la Ilustración 2, donde A y B muestra la estructura de las hifas y C la forma de las esporas. Los conidios son cilíndricos, unicelulares, hialinos, producidos en cadenas basipétalas Las esporas tienen forma elipsoidal, aproximadamente de 30 µm x 15 µm. La superficie del conidio está cubierta por arreglos irregulares de estructuras en forma de cintas y proyecciones redondeadas. En la fase germinativa, un tubo de germen de superficie lisa emerge del cuerpo del conidio, que al alongarse adquiere una configuración lobulada en forma de trébol (Jones et al., 2001).

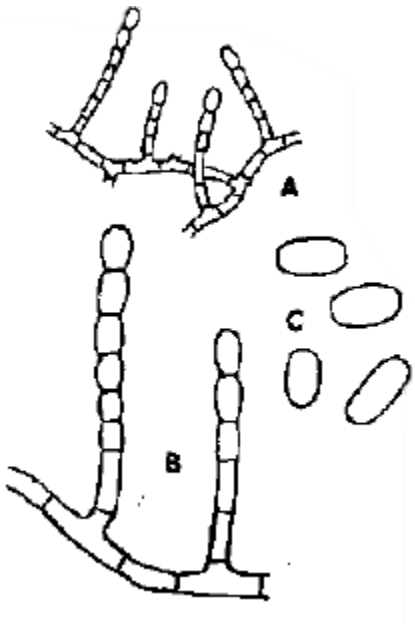

Ilustración 2 *Estructura microscópica de Oidium sp. Fuente:* (Barnett & Hunter, 1988, p. 69)

3.2.3. Molecular

Para la caracterización molecular se extrajo el ADN del hongo con el método de Fenol Cloroformo, se amplificó la región de la subunidad 16S del ribosoma fúngico utilizando los primers universales ITS1 e ITS4 (Badotti et al., 2017). Se secuenció el producto de la amplificación con el método Sanger en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, campus El Girón. Posteriormente se utilizaron softwares bioinformáticos libres para el análisis de la secuencia obtenida.

3.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Se cultivó el hongo aislado en matraces de 250 mL con 80 mL de medio SDA a 25 °C por una semana. Se realizó el lavado de esporas con agua destilada estéril, se filtró con una gasa estéril y se procedió a la cuantificación de concentración de esporas con una cámara de Neubauer. Se realizaron las diluciones necesarias hasta obtener una

concentración entre 1 y 2 x 10^8 UFC mL^{-1}. (CLSI, 2008; Sanguinetti & Posteraro, 2018). Las pruebas de CMI se realizará en una microplaca de 96 pocillos, cada pocillo tenía un volumen final de 200µL, donde varió la concentración de extracto y PDC (Caldo Papa Dextrosa) y cada pocillo tenía 10µL de inóculo y se ajustó la concentración final. Para el Blanco se utilizó el medio de cultivo y agua y como Control Positivo se utilizó el fungicida comercial para *Oidium sp.* Azufrol de Agrosad a una concentración del 2% p/v. La organización final de la placa fue la siguiente:

Tabla 2 Disposición de los tratamientos en la placa de 96 micro pocillos.

	HD			HF			FD			HFD		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%
C	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%	80%
D	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%
E	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
F	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
G	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
H	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP

HD: Hojas Deshidratadas, HF: Hojas Frescas, FD: Frutos Deshidratados, HFD: Hojas y Frutos Deshidratados, B: Blanco, CP: Control Positivo. Fuente: El Autor.

4. Evaluación de la capacidad del extracto de toronja para estimular la expresión de genes de defensa

4.1.1. Aplicación del tratamiento

La población total es de 25 plantas de tomate de 9 semanas. Se dividió la población en cuatro bloques para la aplicación de los tratamientos. Al bloque uno se le aplicó el extracto de toronja, al bloque dos se le aplicó una solución de Ácido Desoxiclólico 200 µM como control positivo (Zarattini et al., 2017), al tercer bloque se le

aplicó agua como control negativo y el último bloque no se le aplicó ningún tratamiento (blanco). A los tres primeros bloques se les roció con las soluciones en las partes aéreas de las plantas y se realizaron las pruebas transcurridas 24 horas después de la aplicación del tratamiento. Se tomaron hojas de distintas plantas en cada bloque, se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron con un mortero para formar un pool, se mantuvo en congelación hasta su análisis. El tratamiento se repitió después de 15 días con las mismas condiciones.

4.1.2. qPCR

El análisis cuantitativo de la expresión génica realizó en un termociclador Lightcylcer nano de Roche. Se recuperó el ARN de las muestras utilizando el Kit SV Total RNA Isolation System de Promega (2004), el protocolo seguido para la extracción se encuentra en el Anexo 1. El ADNc se obtuvo con el Transcriptor Universal ADNc Master de Roche y la reacción se llevó a cabo en un Termociclador Multigene PCR de Labnet, el protocolo se especifica en el Anexo 2. Para la amplificación cuantitativa se utilizó el kit FastStart Essential ADN Green Master de Roche (2013). Se utilizaron primers específicos para la amplificación de PR1, PR2, PR3, MAPK3 y MAPK6.

4.1.3. Cálculo de la eficiencia de PCR y concentración inicial de ADN molde

Para el cálculo de la eficiencia de cada pocillo en las reacciones de PCR se utilizó el software libre LinRegPCR versión 2020.2 (Phruksahiran & Chandra, 2013). Este software analiza los datos individuales de cada pocillo de un ensayo de PCR, determina la línea base de fluorescencia y posteriormente la eficiencia de cada reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Determinación de la capacidad inhibitoria

1.1. Purificación y caracterización de una sepa de *Oidium sp.*

1.1.1. Macroscópica

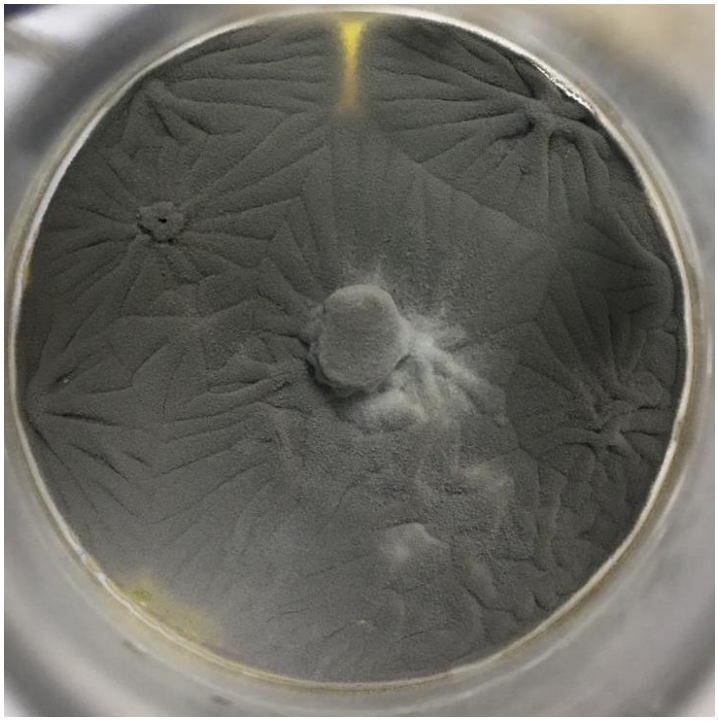

Ilustración 3 Cultivo *in vitro* de *Oidium sp*. en SDA. Fuente; El Autor.

Las muestras se tomaron en un invernadero de tomates del cantón Paute, provincia del Azuay. Se seleccionaron las hojas infectadas con hongos que cumplían las características descritas por Barnett & Hunter, (1988) y Lodge et al. (2004), evitando las hojas que tenían varias enfermedades. Se cultivaron en medio SDA con el método de impresión de superficie foliar y con alícuotas de 100 µL del medio donde se habían colocado los hisopados realizados *in situ* y previamente incubados. Las cajas Petri con las muestras se incubaron a 25 °C, temperatura promedio de un invernadero de tomate. Al desarrollarse en *in vitro Oidium sp*. adquirió una tonalidad verde-grisácea de

apariencia polvorosa, se desarrolló hasta cubrir por completo la superficie del medio y no creció verticalmente. No existen estudios en los cuales se haya descrito el desarrollo *in vitro* del hongo por lo que se deben hacer caracterizaciones microscópicas y/o moleculares para su identificación.

1.1.2. Microscópica

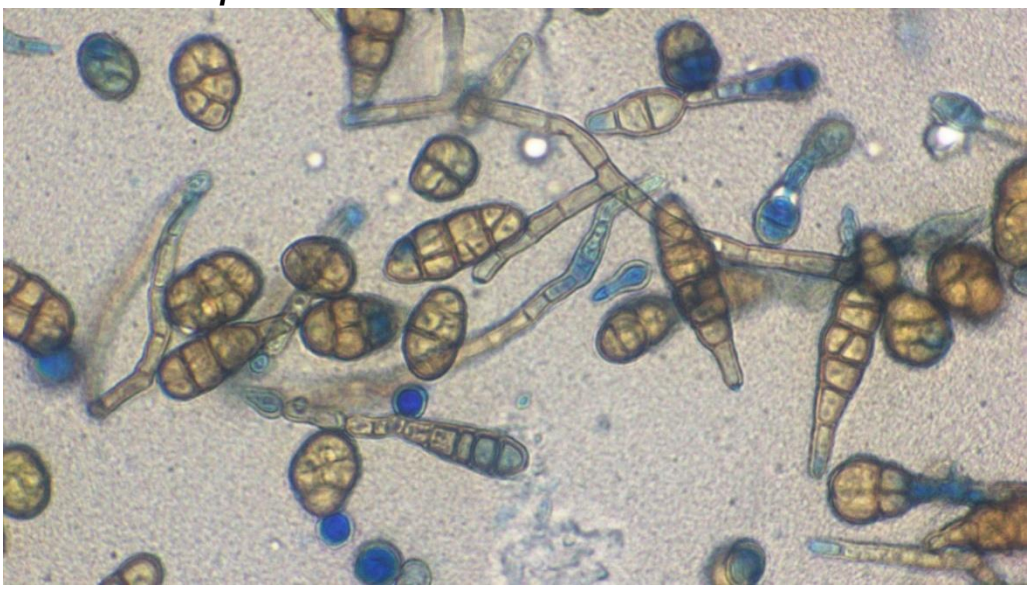

Ilustración 4 Estructuras de *Oidium sp* vistas al microscopio con Azul de Lactofenol. Fuente: El Autor.

Los conidios tienen forma cilíndrica y se desarrollan en cadena. Las esporas tienen forma y el tamaño indicado por Barnett & Hunter, (1988) y Jones et al. (2001). Igualmente, por la dificultad de su desarrollo *in vitro*, no existen muchos estudios que describan a este género y mayoría de estudios se realizan cultivos *in vivo* donde se infectan las plantas del estudio con esporas tomadas de cultivos infectados.

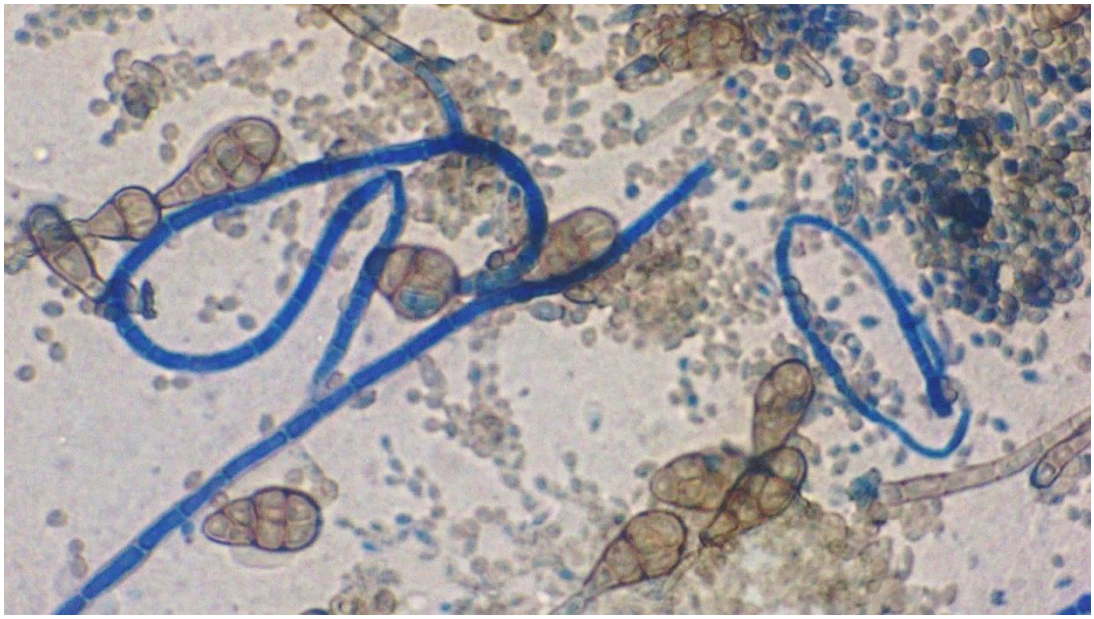

Ilustración 5 Estructuras y esporas de *Oidium sp*. Fuente: El Autor.

1.1.3. Molecular

Se recuperó el ADN del hongo estudiado utilizando el método de Fenol Cloroformo, se utilizó el kit GoTaq MasterMix de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió el tamaño del amplicón en un gel de agarosa al 1.5% utilizando SYBR Safe como tinte, se determinó que el tamaño del amplicón es alrededor de 600pb. Las muestras se procesaron con el método Sanger en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede El Girón. Se utilizó la herramienta BLAST del NCBI para analizar el alineamiento de la secuencia obtenida del amplicón ITS1-ITS4. Se comparó la secuencia con algunas variedades del género *Oidium*. Como resultado se obtuvo un alineamiento del 95% con la subunidad ribosomal de *Oidium neolycopersici* con número de accesión MG647823.1.

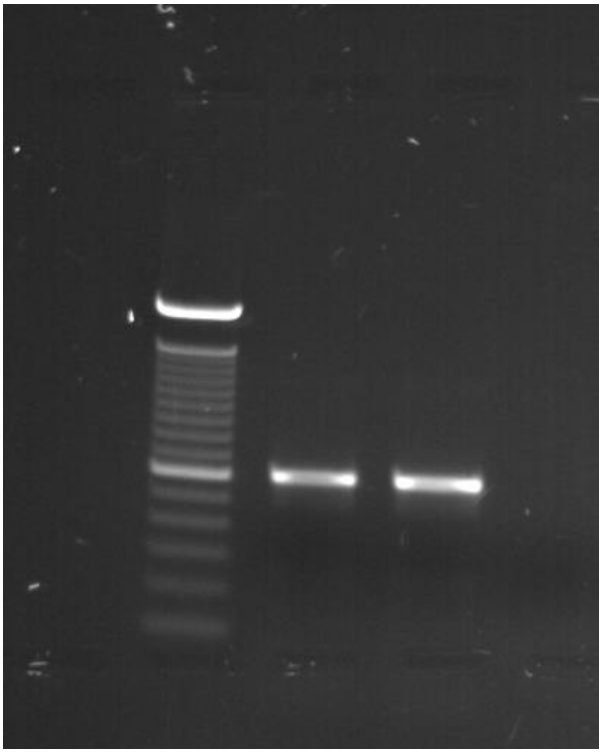

Ilustración 6 Tamaño del producto de amplificación utilizando los primes ITS1 e ITS4. Las bandas tienen alrededor de 600pb. Fuente: El Autor.

1.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Se prepararon cuatro extractos distintos con diferentes órganos de la planta: a) Hojas Deshidratadas, b) Hojas Frescas, c) Frutos Deshidratados, d) Frutos y Hojas Frescas. Para el estudio se busca que el extracto tenga la capacidad de estimular los mecanismos de defensa de las plantas y tengan una acción antimicrobiana. Se sabe que los compuestos fenólicos tienen funciones antimicrobianas en las rutas metabólicas de las plantas, por lo que previo al ensayo de microdiluciones se realizó una prueba colorimétrica con una solución al 5% de $FeCl_3$. Todos los extractos dieron positivo a la prueba, los extractos viraron a verde oscuro, confirmando la presencia de fenoles de tipo catecol (Hinojosa Dávalos et al., 2013).

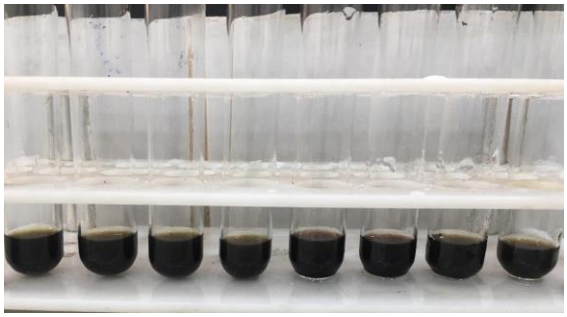

Ilustración 7 Prueba colorimétrica de fenoles con cloruro férrico al 5%. Las pruebas se hicieron por duplicado, de izquierda a derecha: HD, HF, FD, HFF. Fuente: El Autor.

Se determinó la capacidad inhibitoria de extractos de diferentes órganos de plantas de toronja. En pruebas previas se determinó que se requieren concentraciones altas del extracto para que sea efectivo, por tal razón se eligieron las concentraciones descritas en el apartado 3.3 del Capítulo II. Después de 48 horas se añadió 5 µL de Azul de Rezasurina, compuesto que se utiliza para determinar la viabilidad de células, las células viables son capaces de reducir de forma irreversible el compuesto que se toma un color violeta o rosa.

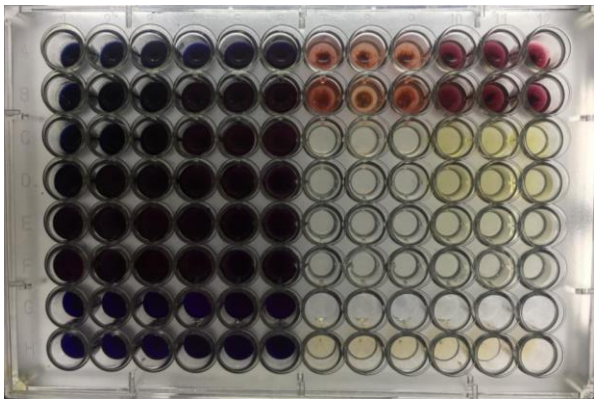

Ilustración 8 Revelado con Azul de Rezasurina de la placa de micropocillos. Las columnas 1-3 HD, 4-6 HF, 7-8 FD y 9-12 HFD. Fuente: El Autor.

Las columnas a las que se les añadió extractos con hojas de toronja fueron más efectivas. El extracto de Hojas Deshidratadas en el ensayo tuvo un 80% de CMI, mientras que el de Hojas Frescas era de 100%. En la ilustración 9 se puede observar con mayor

detalle los resultados del ensayo. El control positivo (Azufrol) también inhibió el desarrollo del hongo a la concentración especificada por el fabricante. El control negativo permitió el desarrollo del hongo. Este resultado es correspondiente al hecho que al deshidratar las hojas de toronja se requerirá una mayor masa de material seco al momento de formular las soluciones al 10% con etanol, mientras que al utilizar hojas frescas gran parte de la masa añadida a la solución es el agua contenida en las vacuolas de las células vegetales.

Se determinó que aquellos extractos que contenían frutos no son efectivos para inhibir el crecimiento de esporas de *Odium sp*. Resultado opuesto al esperado según los estudios y descripciones realizados por Cvetnić & Vladimir-Knežević (2004) quienes utilizaron pulpa y semillas frutos para su estudio. En la ilustración 8 se puede observar que las columnas 7-12 que contenían extracto de frutos deshidratados y extracto de frutos y hojas frescas, a pesar de estar en altas concentraciones no tenían capacidad fungicida o fungistática, por lo que no se continuó con el estudio de estos extractos. En un ensayo previo se utilizó un extracto obtenido a partir de frutos liofilizados de toronja, el cual tampoco dio resultados positivos para la prueba. Esto puede deberse posiblemente a la variedad de frutos utilizados para el ensayo, el estado de madurez o la concentración de carbohidratos solubles presentes en la pulpa de los frutos utilizados. Se puede descartar cualquier interferencia del solvente utilizado puesto que de haber sucedido esto en los pocillos a altas concentraciones no hubieran proliferado las esporas de *Oidium sp.*

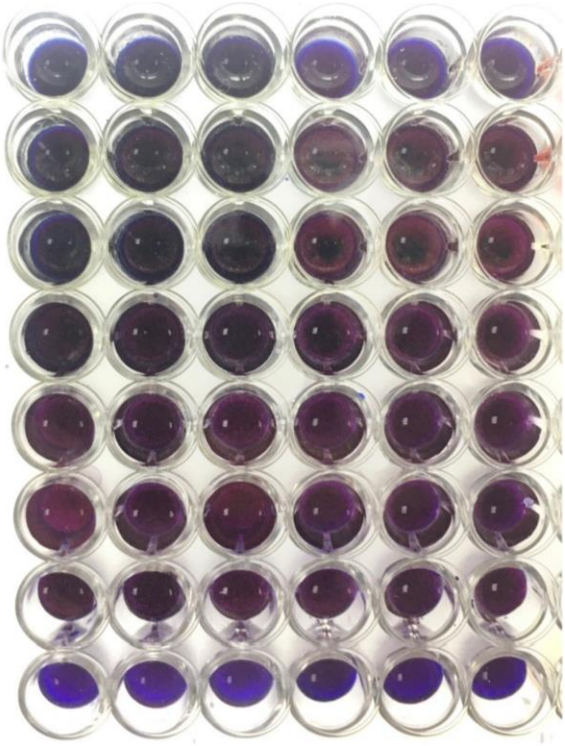

Ilustración 9 Columnas 1-6 de la microplaca. Fuente: El Autor.

Para concluir con los resultados de la CMI se sembró en una caja Petri con SDA 100 µL de inóculo con extracto de HD al 80%. Pasadas 48 horas, no se encontraron colonias de *Oidium sp*. concluyendo que el extracto tiene actividad fungicida. Estos resultados son favorables para el estudio puesto que la obtención de este extracto no requiere mayor inversión en sus componentes y tampoco se necesita una sofisticada tecnología para su preparación. Esto es favorable especialmente para los agricultores y campesinos del país, cuyos recursos son limitados y no tienen acceso a agroquímicos comerciales reduciendo la productividad de sus cultivares. Otra gran ventaja del uso de un extracto natural es su muy baja toxicidad ambiental y los efectos negativos a la salud de los consumidores que tienen los fitoquímicos. Así también que no se requieren equipos especiales para su aplicación en las plantas, tal como es el caso de pesticidas

sintéticos, que en algunos casos requieren boquillas especiales para las bombas o complejos sistemas de aspersión y riego.

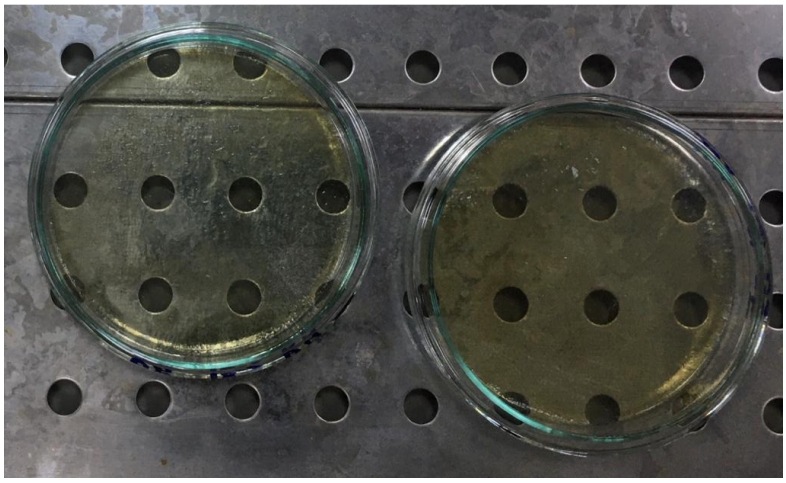

Ilustración 10 Siembra de inóculo de Oidum sp. en Sabouraoud Dextrose Agar con extracto de Hojas Deshidratadas de Toronja al 80%. Fuente: El Autor.

2. Cuantificación de la expresión de genes de defensa

2.1. Extracción de ARN

Para el estudio se seleccionó el extracto de Hojas Deshidratadas de toronja al ser el que funcionaba a menores concentraciones. Se aplicó el tratamiento a las plantas asperjándolas con las diferentes soluciones, 24 horas después de la aplicación del tratamiento se tomaron las muestras y se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -20°C hasta su procesamiento. Se repitió el proceso pasados quince días en las mismas condiciones. El propósito del bloque B es la obtención de datos a un nivel basal del cultivar para el posterior análisis de varianza. Se obtuvieron las siguientes concentraciones en las muestras, puesto que la concentración máxima de ARN molde que el Kit Transcriptor Universal ADNc Master sugiere es de 2.5 µg se diluyeron las muestras que superaban esta concentración:

Tabla 3 Concentración de ARN obtenida de las extracciones y diluciones realizadas para la obtención de ADNc. Fuente: El Autor.

Muestra	Tratamiento 1		Tratamiento 2	
	Concentración	Concentración reac. ADNc	Concentración	Concentración reac. ADNc
C-	$2.08x10^4$ ng/mL	$1.04\ x10^3$ µg/mL	$8.36x10^3$ ng/mL	$8.36x10^3$ ng/mL
C+	$2.90x10^3$ ng/mL	$2.90x10^3$ ng/mL	$2.62x10^3$ ng/mL	$2.62x10^3$ ng/mL
T	$1.90x10^4$ ng/mL	$0.95\ x10^3$ µg/mL	$8.96x10^3$ ng/mL	$8.96x10^3$ ng/mL
B	$3.16x10^4$ ng/mL	$1.58\ x10^3$ µg/mL	$2.44x10^4$ ng/mL	$2.44\ x10^3$ ng/mL

2.2. qRT-PCR

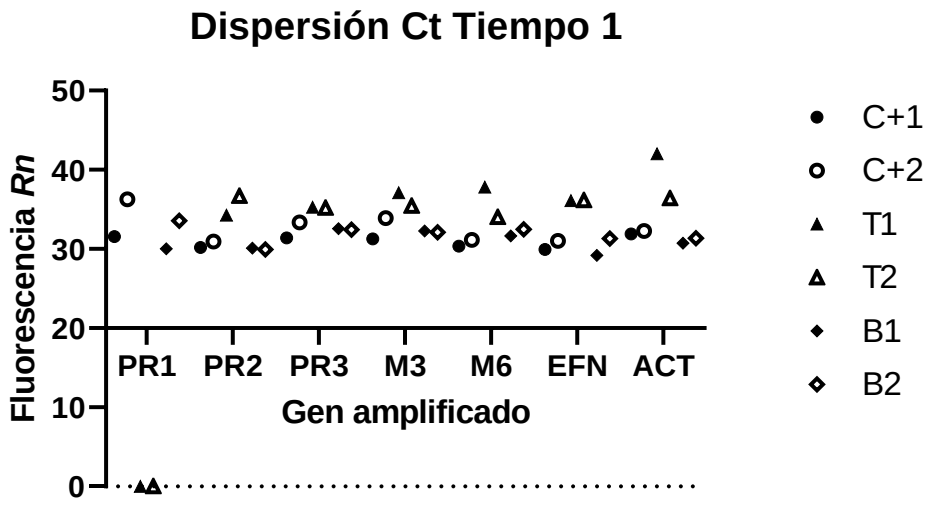

Ilustración 11 Dispersión de los Ct obtenidos en las dos repeticiones de qPCR en el primer tratamiento. Fuente: El Autor.

Todas las muestras se procesaron con cada par de primers (forward y reverse) por duplicado utilizando SYBR green como fluoróforo. Los datos arrojados por el termociclador fueron procesados con el software LinRegPCR para calcular la Eficiencia

(*E*) y la concentración inicial de ADNc en la reacción (R_0). Los resultados obtenidos se presentan en el Anexo 4.

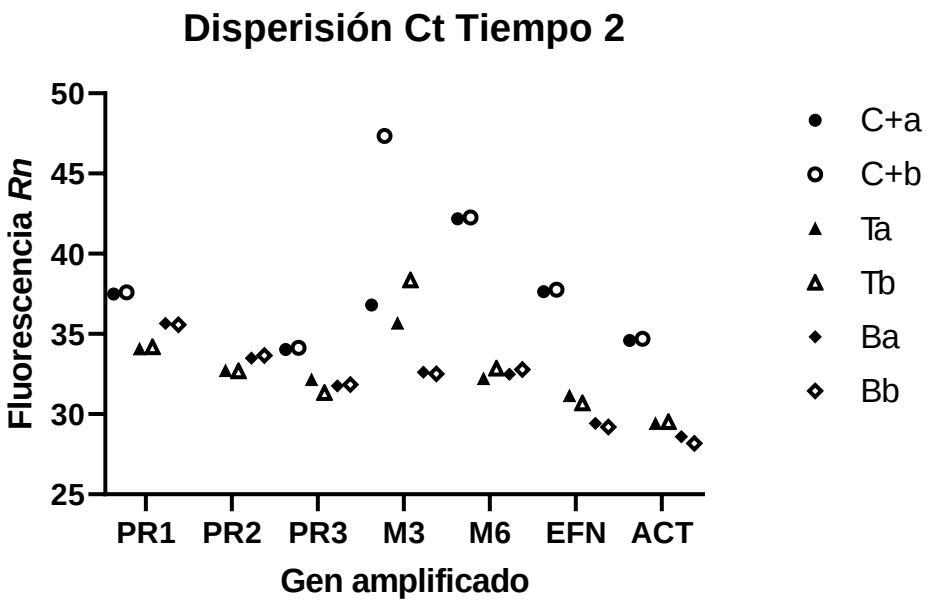

Ilustración 12 Dispersión de los Ct obtenidos en las dos repeticiones de qPCR en el segundo tratamiento. Fuente: El Autor.

En las ilustraciones 11 y 12 se muestra la dispersión de los datos obtenidos en las PCR, para obtener resultados confiables la diferencia entre los Ct obtenidos en las repeticiones debe ser mínima. En el gráfico se puede observar que los resultados obtenidos en el primer tratamiento están más agrupados y el Ct mínimo se encuentra alrededor del ciclo número 30. Esto puede ser resultado de las diluciones de ARN molde que se realizaron para la obtención de ADNc, proceso que no se realizó en el segundo tratamiento. Con una baja concentración inicial de ADNc, el Ct obtenido en la qPCR será mayor. No obstante, en el segundo tratamiento los resultados fueron muy similares, con un C_t mínimo promedio de 30. Por lo que es posible que esta detección tardía de fluorescencia se deba a la calidad de los reactivos utilizados.

2.3. Niveles de inducción de los genes (Fold Change)

Siguiendo el modelo matemático propuesto por Schefe et al. (2006) se calculó la expresión relativa de los genes de estudio contra la expresión de los genes Housekeeping. Los genes de referencia que se utilizaron en el estudio fueron la Actina (ACT) proteína estructural del citoesqueleto de las células y el Factor de Elongación (EF) que actúa en la síntesis de proteínas en conjunto con los ribosomas. El comportamiento de estos dos genes en los diferentes tratamientos y tiempos se puede visualizar en las ilustraciones 10 y 11.

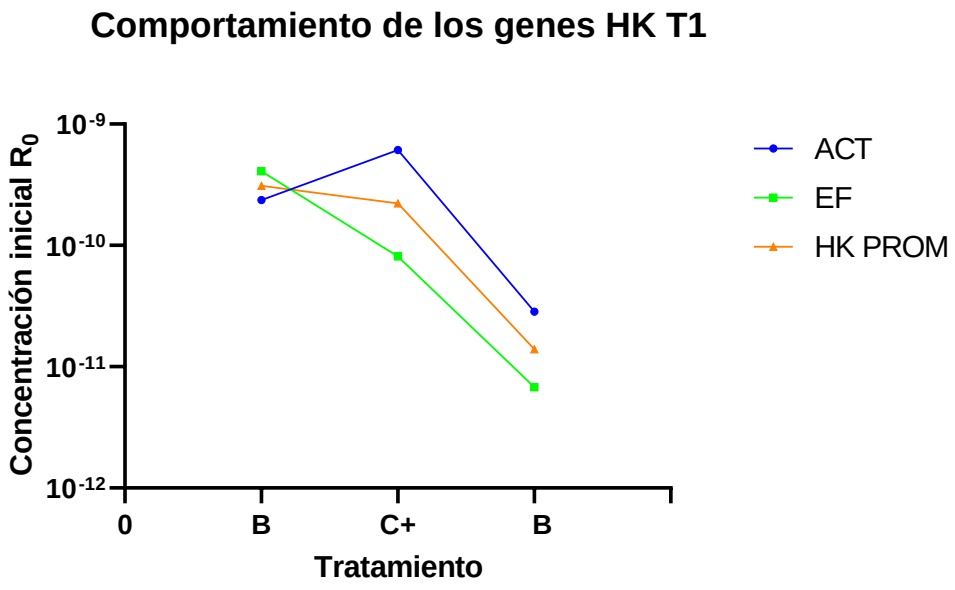

Ilustración 13 Genes housekeeping en el primer tiempo en escala logarítmica base 10. Fuente: El Autor.

El primer tratamiento se realizó con plantas de 9 semanas. En un estado basal, las plantas del cultivar expresan EF y ACT a un nivel similar, con una expresión ligeramente mayor de EF que de ACT. En el caso del control positivo y el tratamiento con

extracto de toronja ACT se expresa con una diferencia muy cercana a un orden logarítmico en comparación con EF. El segundo tratamiento se realizó con las mismas plantas dos semanas después (11 semanas). En las plantas en estado basal los genes ACT y EF se expresaron en un nivel similar, con una muy ligera expresión mayor de EF que ACT. En el control positivo existe una expresión mayor de ACT que EF y de igual forma, no existe una mayor diferencia en los niveles de expresión. Por último, en el bloque al cual se le aplicó el extracto de Toronja, los niveles de expresión de los dos genes HK es igual, con una ligera expresión mayor de ACT.

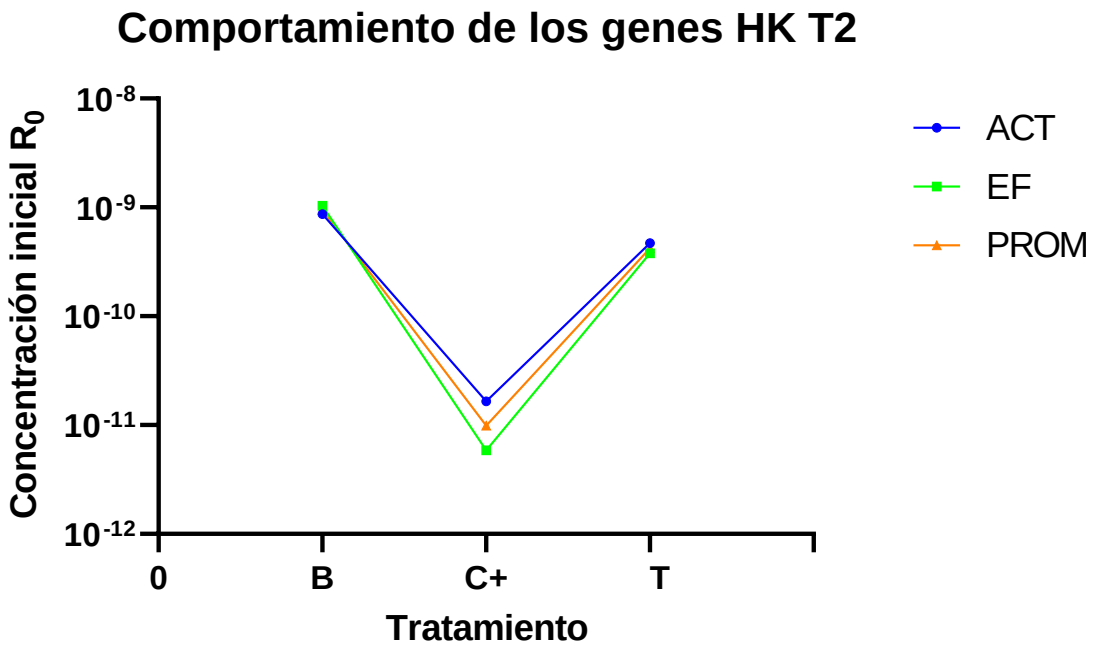

Ilustración 14 Genes housekeeping en el primer tiempo en escala logarítmica base 10. Fuente: El Autor.

Tabla 4 Resultados del cálculo de la cuantificación relativa de los genes de estudio en los diferentes tratamientos y los diferentes tiempos. Fuente: El Autor.

			Fold change			
Tratamiento	**C+**		**T**		**B**	
Gen	**T1**	**T2**	**T1**	**T2**	**T1**	**T2**
PR1	17.55	1	-	1.2	4.15	1.14

PR2	1.08	-	26.72	1.1	0.36	1.34
PR3	2.35	1	5.62	0.68	0.37	1.29
M3	2.56	38.39	2.36	4.58	0.37	1.13
M6	1.12	1	0.59	1.72	0.69	1.47

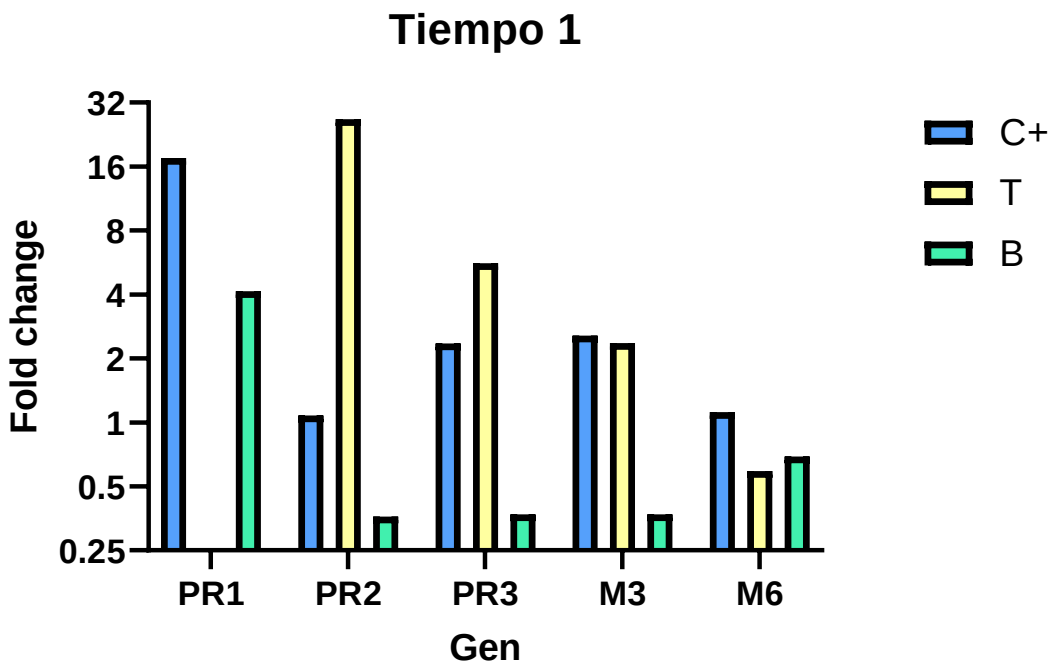

Ilustración 15 Cambios de expresión de los genes de estudio en el primer tratamiento. Fuente; El Autor

En el primer tratamiento (plantas de 9 semanas) la expresión de los genes de estudio se puede observar en la ilustración 15. El blanco corresponde al cultivar en un estado basal. Un Fold Change igual o cercana a uno significa que la expresión del gen de estudio es similar a la expresión de ACT y EF. En un estado basal, todos los genes se expresan en menor medida que los genes HK, con excepción de PR1 que se expresa 4 veces más. Esto puede deberse a que alguno de los individuos pertenecientes al bloque pudo haber estado infectado con algún organismo que ataque los órganos inferiores de las plantas, Lavrova, Zinovieva, Udalova, & Matveeva (2017) probaron el

aumento de la expresión de los genes PR1 y PR6 en plantas atacadas por *Meloidogyne incognita*. Goyal et al. (2016) probaron que, en plantas de tomate, una exposición a temperaturas menores a 8 °C genera estrés y aumenta la expresión del gen PR1, siendo los cambios de temperatura en el cultivar otra posible razón por la que la expresión de esta proteína aumentó en el bloque B. En el caso del extracto de toronja, en el cual no se amplificó PR1, puede deberse por la presencia de algún inhibidor presente dentro de la reacción puesto que se determinó que en un estado basal todas las proteínas estudiadas se expresan en bajas concentraciones. El Control positivo (ácido desoxicólico), estimuló la sobre expresión de todos los genes de estudio a comparación del blanco. Finalmente, el extracto de Toronja (T) tuvo resultados variados, no fue efectivo para inducir la expresión de PR1, mientras que fue muy efectivo para PR2 y PR3 y una respuesta media en M3 y M6 a comparación del C+. Para los genes PR2, PR3 y M3 indujo una respuesta superior al B y a los genes HK; y para M6 la expresión fue inferior en comparación a B y HK.

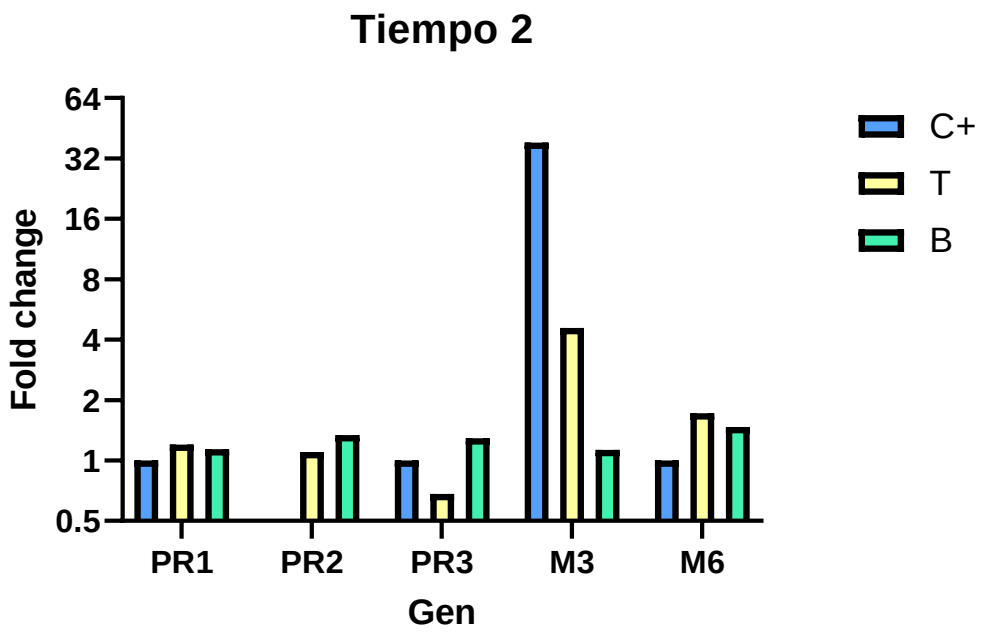

Ilustración 16 Cambios de expresión de los genes de estudio en el primer tratamiento. Fuente: El Autor.

En el segundo tratamiento los resultados del Fold Change se observan en la ilustración 16. En general se puede observar que el tratamiento tuvo un efecto menor en la expresión de los genes de estudio. En el caso del Blanco, la expresión de todos los genes fue muy cercana a 1. El Control Positivo tuvo una expresión muy similar a la del Blanco con excepción de PR2 y M3, donde el nivel de expresión del primero no fue detectable con la reacción y del segundo fue 38 veces mayor que los genes HK. El extracto de toronja, por otro lado, para los genes PR1, PR2 y M6 tuvo una expresión similar que el Blanco y muy cercanas a 1; PR3 tuvo una expresión menor que el B y el C+ y por último para M3, del mismo modo que el C+, tuvo una expresión mayor que el resto de los genes con un cambio de 4.58.

3. Análisis estadístico

En los gráficos 17, 18 y 19 se muestra el promedio de Fold Change con cada variable del estudio. Podemos concluir de manera general que el estudio tuvo una mayor respuesta en el primer tratamiento a la semana 9, donde el promedio de Fold Change de los bloques fue cercano a 0.8, y que el ácido desoxicólico tuvo un efecto ligeramente mayor que el extracto de toronja y, que el gen que en promedio tuvo una mayor expresión fue el de la MAPK3. Posterior a esta descripción general de los efectos de las variables, se realizaron pruebas para determinar si existe una diferencia estadística entre los diferentes bloques.

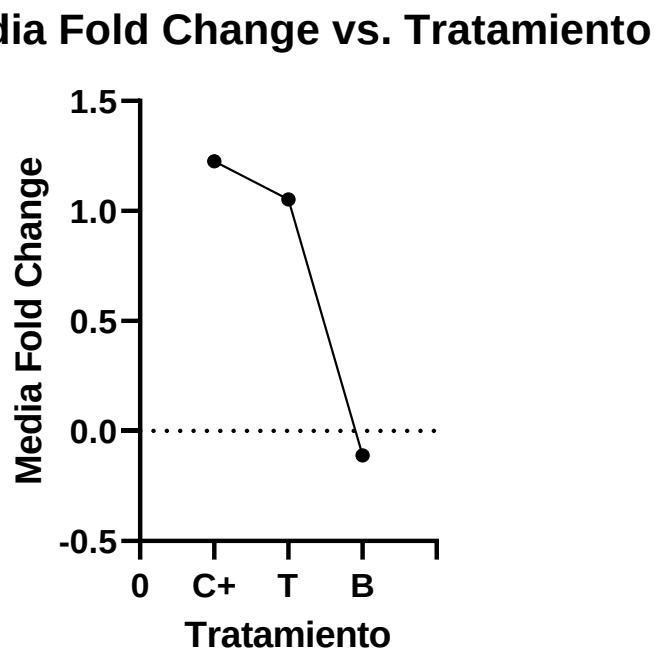

Ilustración 17 Media del Fold Change según el gen amplificado. Fuente: El Autor.

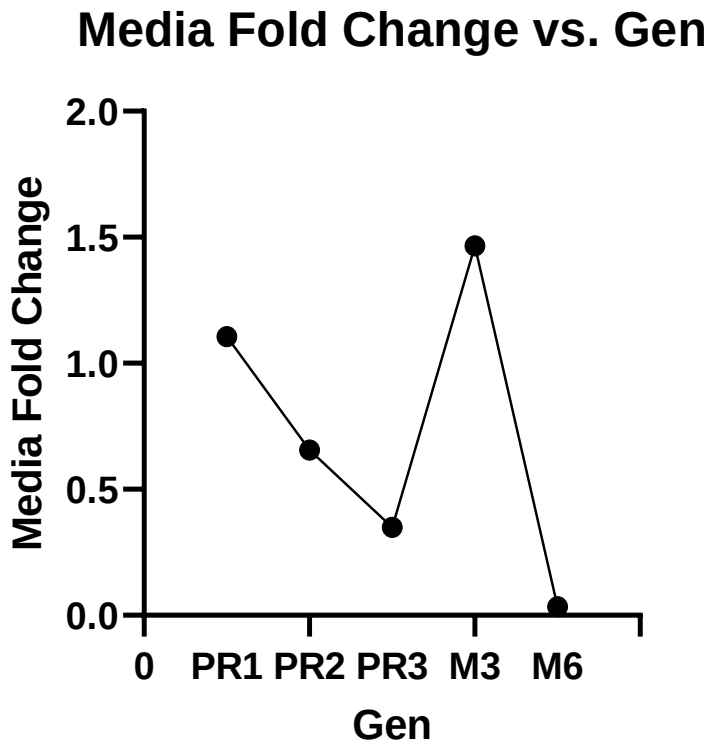

Ilustración 18 Media del Fold Change según el gen amplificado. Fuente: El Autor.

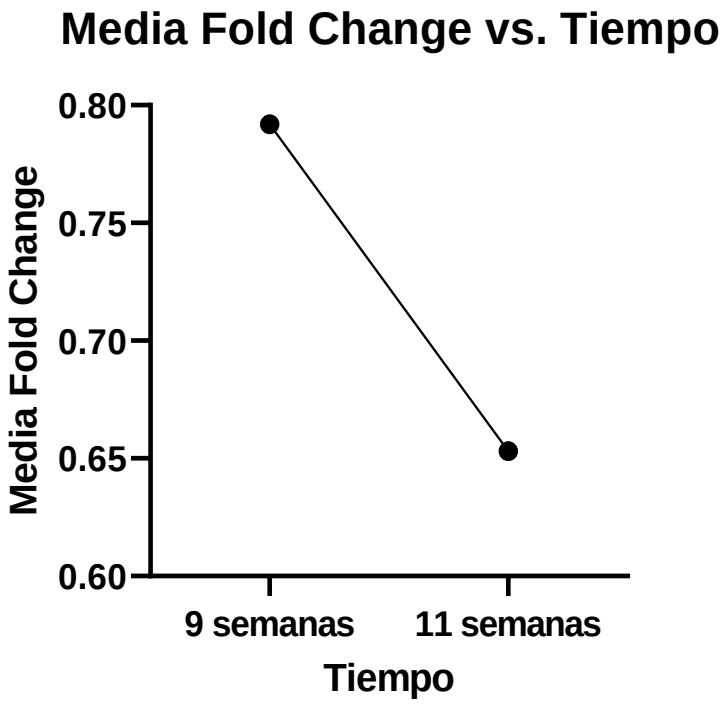

Ilustración 19 Media del Fold Change según el tiempo de aplicación del tratamiento. Fuente: El Autor.

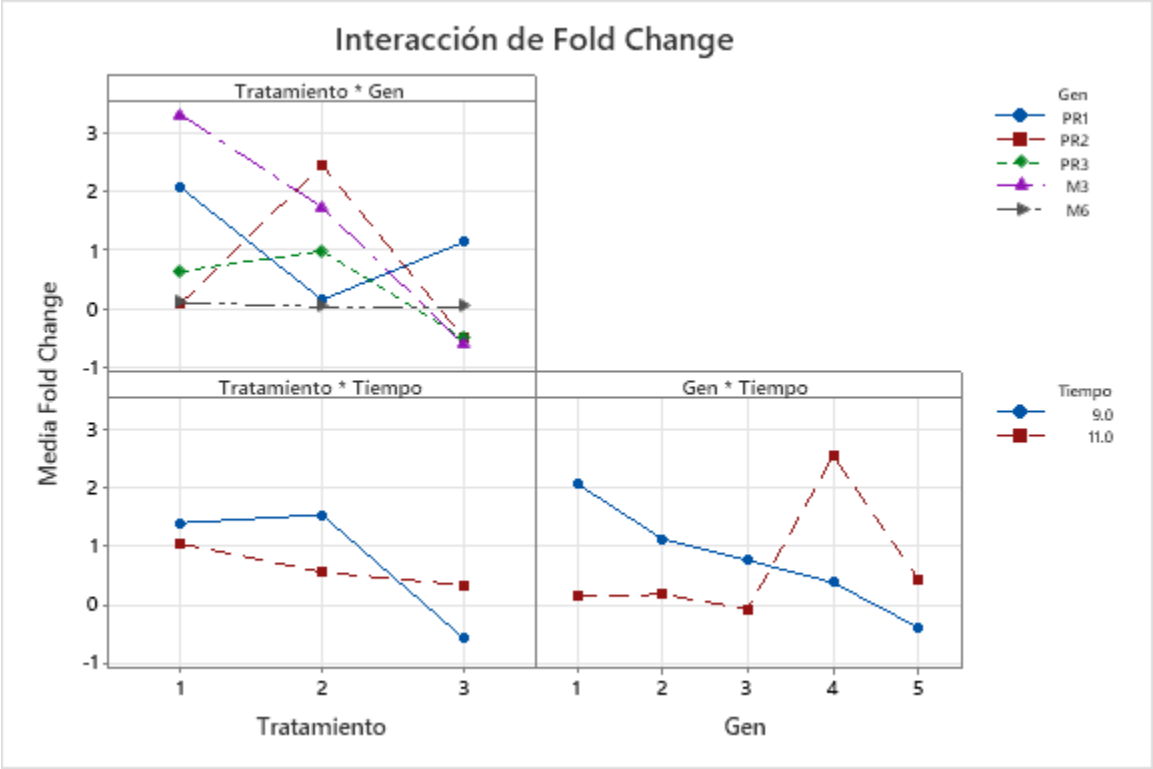

Ilustración 20 Interacción de las variables en el Fold Change. En Tratamiento*Tiempo los valores de x correspondientes son: 1 C+, 2 T y 3 B; mientras que en Gen*Tiempo: 1 PR1, 2 PR2, 3 PR3, 4 M3 y 5 M6. Fuente: El Autor.

En la ilustración 20 se pueden observar las interacciones que existen entre las variables de este estudio. En la interacción Tratamiento*Gen el extracto de toronja indujo la expresión de PR2 y PR3 con mayor eficacia que el control positivo e induce una mayor expresión de todos los genes de estudio, excepto PR1 comparando con los niveles de expresión del blanco. En la interacción Tratamiento*Tiempo que el extracto de toronja fue el más efectivo para el primer tiempo del experimento (tiempo que fue más efectivo de manera global). Por último, podemos concluir que en el primer tiempo de la corrida experimental se expresaron en mayor medida los genes PR, mientras que en el segundo tiempo del tratamiento se expresaron en mayor cantidad los genes MAPK.

Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos obtenidos provienen de una población normal. El valor del factor calculado es de 0.872, mientras que el factor t para la población es de 0.927. Al ser el factor c menor que el factor t, se rechaza la normalidad de la distribución de los datos y se deben utilizar métodos no paramétricos para el análisis de los tratamientos.

Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar si existe una diferencia significativa de las medianas de los tratamientos utilizando el software Minitab 20. Esta prueba permite comparar solamente una variable a la vez, por lo que se realizaron tres pruebas diferentes para analizar el efecto del Tratamiento, los Genes de estudio y el Tiempo en el Fold Change. La prueba de Kruskal Wallis establece que: H_0=Todas las medianas son iguales y H_i= al menos una de las medianas es diferente.

Tabla 5 Análisis de Kruskal Wallis Fold Change vs. Tratamientos. Fuente: El Autor.

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	2	1.78	0.410
Ajustado para empates	2	1.79	0.408

Puesto que el valor de p es mayor al de α (0.05), se acepta la hipótesis nula, por lo que podemos concluir que no existe una diferencia significativa del efecto de los tratamientos en las medianas del Fold Change. En el análisis Fold Change vs. Gen, tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa por lo que también se acepta la hipótesis nula y no hay diferencia entre las poblaciones. Y, por último, el efecto del tiempo tampoco tuvo un efecto estadístico significativo sobre la expresión génica en el estudio.

Tabla 6 Análisis de Kruskal Wallis Fold Change vs. Gen. Fuente: El Autor.

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	4	3.07	0.546
Ajustado para empates	4	3.09	0.543

Tabla 7 Análisis de Kruskal Wallis Fold Change vs. Tiempo. Fuente: El Autor.

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	1	0.02	0.885
Ajustado para empates	1	0.02	0.884

CONCLUSIONES

Se analizó la capacidad del extracto etanólico de toronja como como un posible fungicida para el control de patógenos que atacan a los órganos aéreos de las plantas y elicitor de genes de defensa en plantas de tomate. Se aisló una cepa de *Oidium neolycopersici* caracterizada utilizando fichas taxonómicas y secuenciando un fragmento ITS1-4 amplificado perteneciente a la subunidad ribosomal 16S. Con la cepa aislada se realizaron estudios de sensibilidad utilizando extractos de diferentes órganos de toronja. El extracto que mejor respuesta tuvo fue el de Hojas Deshidratadas, seguido por el de Hojas Frescas. Este resultado corresponde al hecho que al deshidratar las hojas y molerlas se aumenta la superficie de contacto con el solvente, y al eliminar el agua presente en las células la masa de material vegetal utilizado para la preparación de las soluciones es mayor que al utilizar hojas frescas. La CMI determinada para el extracto de hojas deshidratadas de toronja fue del 80%. Éste es un resultado favorable puesto que la producción del extracto no supone mayor dificultad para los agricultores, no se requiere de tecnología sofisticada y su costo de producción no es elevado. Otra ventaja del uso de pesticidas naturales es su baja toxicidad ambiental.

Las otras dos soluciones preparadas contenían frutos y ninguna de estas inhibió el crecimiento del hongo. Esto puede deberse a la mayor cantidad de carbohidratos solubles presentes en los frutos y las bajas concentraciones de estos (carbohidratos solubles) en las hojas. Se puede descartar que el solvente utilizado (etanol 60%) haya sido el responsable de la actividad antifúngica de la solución por dos razones, la primera: por estar a una concentración menor a la sugerida por organismos internacionales como

la Organización Mundial de la Salud para productos antisépticos y la segunda, porque de haber intervenido como el agente fungicida de la solución, todos los tratamientos hubiesen tenido resultados positivos, por lo menos a altas concentraciones.

Las cuantificaciones relativas (expresadas como logaritmo de base 2) obtenidas para el Extracto de Toronja fueron 4.74 para PR2, 2.5 para PR3, 1.24 para MAPK3 y -0.76 para MAPK6; mientras que en el segundo tratamiento fueron: 0.26 para PR1, 0.13 para PR2, -0.55 para PR3, 2.2 para MAPK3 y 0.78 para MAPK6. Un análisis estadístico descriptivo determinó que el extracto de toronja produjo un efecto muy similar al del Control Positivo y las medias de ambos son superiores a la media del Blanco, por lo que el extracto de toronja tiene la capacidad de estimular la expresión de los genes de defensa elegidos para este estudio. No obstante, el Fold Change producido no es estadísticamente diferente en los tres bloques, y comparado con otros estudios como el de Malo et al. (2017) los niveles de cambio de la expresión son muy inferiores a los producidos por los extractos utilizados; o el efecto producido por la exposición a temperaturas bajas (Goyal et al., 2016).

RECOMENDACIONES

En este estudio no se realizó una caracterización fitoquímica en profundidad del extracto de toronja utilizado, por lo que en un estudio futuro podría realizarse para identificar los compuestos que de manera individual puedan generar un mayor efecto en la activación de genes de defensa o en la capacidad antifúngica del extracto.

Se podría continuar el estudio y cuantificar las concentraciones de Ácido Salicílico después de cada tratamiento para comprobar si se activan también las rutas que median la Resistencia Sistémica Adquirida mediada por esta fitohormona.

Para reducir los errores producidos por pipeteo en las reacciones de qPCR se deben centrifugar las tiras de microtubos, eliminando posibles burbujas de aire producidas por las pipetas o los reactivos utilizados.

REFERENCIAS

Agrocalidad. (2015). Resolución Técnica N - 0105. Guía de buenas práctivas agrícolas para tomate riñón. *Inocuidad Alimentaria*, 80. Retrieved from http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/guia-tomate-rinon-final.pdf

Azcón Jieto, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal (2a. ed.)*. Madrid, SPAIN: McGraw-Hill España. Retrieved from http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliotecaupssp/detail.action?docID=3229499

Baccelli, I., & Mauch-Mani, B. (2016). Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones. *Plant Molecular Biology*, *91*(6), 703–711. https://doi.org/10.1007/s11103-015-0406-y

Badotti, F., De Oliveira, F. S., Garcia, C. F., Vaz, A. B. M., Fonseca, P. L. C., Nahum, L. A., … Góes-Neto, A. (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology*, *17*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12866-017-0958-x

Ballistreri, G., Fabroni, S., Romeo, F. V., Timpanaro, N., Amenta, M., & Rapisarda, P. (2019). *Anthocyanins and Other Polyphenols in Citrus Genus : Biosynthesis , Chemical Profile , and Biological Activity*. *Polyphenols in Plants* (2nd ed.). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00014-1

Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1988). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. (Macmillan, Ed.) (4th editio). https://doi.org/10.1016/S0007-1536(55)80058-7

Ben Rejeb, I., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms. *Plants*, *3*(4), 458–475. https://doi.org/10.3390/plants3040458

Bernal, R. (2010). *Enfermedades de Tomate (Lycopersicum esculentum Mill) en invernaderos en las zona de Salto y Bella Union*. *Serie Tecnica 181*.

Blancard, D. (2011). *Enfermedades del Tomate*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., Nikbin, B., … O'Shea, K. S. (2015). Real-time PCR handbook. *Lab Chip*, *4*(2), 189–200.

Bustin, S. A., & Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, *109*(4), 365–379. https://doi.org/10.1042/CS20050086

CLSI. (2008). *M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi* (Second).

Conrath, U. (2009). *Chapter 9 Priming of Induced Plant Defense Responses*. *Advances in Botanical Research* (1st ed., Vol. 51). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51009-9

Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for Enhanced Defense. *Annual Review of Phytopathology*, *53*, 97–119. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132

Cvetnić, Z., & Vladimir-Knežević, S. (2004). Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharmaceutica*, *54*(3), 243–250.

de la Rosa-Hernández, M., Wong-Paz, J. E., Muñiz-Márquez, D. B., Carrillo-Inungaray, M. L., & Sánchez-González, J. M. (2016). Compuestos fenólicos bioactivos de la toronja (Citrus paradisi) y su importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *47*(2), 22–35. Retrieved from https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956610003

FAO. (2017). FAOSTAT. Retrieved from http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC

Gimenez, E., Salinas, M., & Manzano-Agugliaro, F. (2018). Worldwide research on plant defense against biotic stresses as improvement for sustainable agriculture. *Sustainability (Switzerland)*, *10*(2), 1–19. https://doi.org/10.3390/su10020391

Goyal, R. K., Fatima, T., Topuz, M., Bernadec, A., Sicher, R., Handa, A. K., & Mattoo, A. K. (2016). Pathogenesis-Related protein 1b1 (PR1b1) is a major tomato fruit protein responsive to chilling temperature and upregulated in high polyamine transgenic genotypes. *Frontiers in Plant Science*, *7*(June), 1–14. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00901

Hanan Alipi, A., & Mondragón Pichardo, J. (2009). Solanum lycopersicum: jitomate silvestre. Retrieved from http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/lycopersicon-esculentum/fichas/ficha.htm

He, Y., Zhou, J., Shan, L., & Meng, X. (2018). Plant cell surface receptor-mediated signaling - A common theme amid diversity. *Journal of Cell Science*, *131*(2). https://doi.org/10.1242/jcs.209353

Hinojosa Dávalos, J., Gutiérrez Lomelí, M., Siller López, F., Rodríguez Sahagún, A., Morales Del Río, J. A., Guerrero Medina, P. J., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2013). Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de Tithonia tubaeformis. *BIOtecnia*, *15*(2), 53. https://doi.org/10.18633/bt.v15i2.150

Jain, V. K. (2017). *Fundamentals of Plant Physiology* (19th ed.). NEw Delhi: S Chand.

Jones, H., Whipps, J. M., & Gurr, S. J. (2001). The tomato powdery mildew fungus Oidium neolycopersici. *Molecular Plant Pathology*, *2*(6), 303–309. https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00084.x

Khare, C. P. (2007). Citrus paradisi Macf. BT - Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary. In C. P. Khare (Ed.) (p. 1). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-70638-2_364

Kong, F., Wang, J., Cheng, L., Liu, S., Wu, J., Peng, Z., & Lu, G. (2012). Genome-wide analysis of the mitogen-activated protein kinase gene family in Solanum lycopersicum. *Gene*, *499*(1), 108–120. https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.048

Lavrova, V. V., Zinovieva, S. V., Udalova, Z. V., & Matveeva, E. M. (2017). Expression of PR genes in tomato tissues infected by nematode Meloidogyne incognita (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, *476*(1), 306–309. https://doi.org/10.1134/S1607672917050064

Lebeda, A., Mieslerová, B., Petřivalský, M., Luhová, L., Špundová, M., Sedlářová, M., … Pink, D. A. C. (2014). Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of Oidium neolycopersici. *European Journal of Plant Pathology*, *138*(3), 569–596.

https://doi.org/10.1007/s10658-013-0307-3

Li, Y., Yue, N., Basit, A., Li, Y., Zhang, D., Qin, L., … Yan, J. (2021). Targeted Editing of SlMAPK6 Using CRISPR/Cas9 Technology to Promote the Development of Axillary Buds in Tomato Plants. *Journal of Agricultural Science*, *13*(2), 11. https://doi.org/10.5539/jas.v13n2p11

Liu, J., Wang, X., Yang, L., Nan, W., Ruan, M., & Bi, Y. (2020). Involvement of active MKK9-MAPK3/MAPK6 in increasing respiration in salt-treated Arabidopsis callus. *Protoplasma*, *257*(3), 965–977. https://doi.org/10.1007/s00709-020-01483-3

Lodge, D. J., Ammirati, J. F., O'dell, T. E., Mueller, G. M., Huhndorf, S. M., Wang, C. J., … Czederpiltz, D. L. (2004). Terrestrial and Lignicolous Macrofungi. *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, 127–172. https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50011-8

Malo, I., De Bastiani, M., Arevalo, P., & Bernacchia, G. (2017). Natural extracts from pepper, wild rue and clove can activate defenses against pathogens in tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*, *149*(1), 89–101. https://doi.org/10.1007/s10658-017-1168-y

Meza, J., Pantoja, A., Galan, P. R., Godoy, N., Gattini, J., Villasanti, C., … Díaz, J. (2013). *El Cultivo De Tomate Con Buenas Prácticas Agrícolas En La Agricultura Urbana Y Periurbana*.

Morton, J. (1987). Grapefruit. In *Fruits of warm climates* (pp. 152–152). Miami, FL.

Nishad, J., Saha, S., Dubey, A. K., Varghese, E., & Kaur, C. (2019). Optimization and

comparison of non-conventional extraction technologies for Citrus paradisi L. peels: a valorization approach. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(3), 1221–1233. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03585-0

O´Connell, J. (Ed.). (2002). *RT-PCR Protocols* (Vol. 193). Humana Press.

Phruksahiran, N., & Chandra, M. (2013). Quantitative data analysis of ESAR data. *Advances in Radio Science*, *11*, 291–295. https://doi.org/10.5194/ars-11-291-2013

Planello Carro, M. del R., Carro, M. del R. P., & Escaso Santos, F. (2010). *Fundamentos basicos de fisiologia vegetal y animal*. Pearson Educacion. Retrieved from https://elibro.net/es/lc/bibliotecaups/titulos/53915

Promega. (2004). SV Total RNA Isolation System. Catalog no. Z3100, TM048, 28.

Roche. (2013). FastStart Essential DNA Green Master Protocol, (06), 1–22. Retrieved from https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/6e009ae3-75f1-e311-98a1-00215a9b0ba8

Roche. (2017). Transcriptor Universal cDNA Master Roche, (05), 1–12.

Roche Applied Science. (2004). Relative Quantification, (13), 50414.

Sanguinetti, M., & Posteraro, B. (2018). Susceptibility Testing of Fungi to Antifungal Drugs, 1–16. https://doi.org/10.3390/jof4030110

Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., & Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel “gene expression’s C T difference” formula. *Journal of Molecular Medicine*, *84*(11), 901–910. https://doi.org/10.1007/s00109-006-0097-6

Sepúlveda, P. (2018). Oídio en tomate, 2. Retrieved from www.inia.cl/mateo/

Shittu, H. O. (2019). Plants' Innate Defence Mechanisms Against Phytopathogens. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *9*(2), 314–319. https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.314-319

Sun, G., Feng, C., Guo, J., Zhang, A., Xu, Y., Wang, Y., … Ma, Q. (2019). The tomato Arp2/3 complex is required for resistance to the powdery mildew fungus Oidium neolycopersici. *Plant Cell and Environment*, *42*(9), 2664–2680. https://doi.org/10.1111/pce.13569

Szabo, L. J., & Bushnell, W. R. (2001). Hidden robbers: The role of fungal haustoria in parasitism of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(14), 7654–7655. https://doi.org/10.1073/pnas.151262398

Valarezo, A., Valarezo, O., Mendoza, A., & Álvarez, H. (2014). Guía teécnica sobre el manejo de cítricos en el litoral ecuatoriano. *Iniap*, *Manual Téc*, 76. Retrieved from http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/handle/41000/1253/INIAP bolet%EDn divulgativo 401.pdf;jsessionid=D1007D5AB572344C64E459A02A674197?sequence=1

Yu, L., Yan, J., Yang, Y., & Zhu, W. (2014). Overexpression of tomato mitogen-activated protein kinase SlMPK3 in tobacco increases tolerance to low temperature stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *121*. https://doi.org/10.1007/s11240-014-0675-1

Zamanizadeh, H. R., Hatami, N., Aminaee, M. M., & Rakhshandehroo, F. (2011).

Application of biofungicides in control of damping disease off in greenhouse crops as a possible substitute to synthetic fungicides. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *8*(1), 129–136. https://doi.org/10.1007/BF03326202

Zarattini, M., Launay, A., Farjad, M., Wénès, E., Taconnat, L., Boutet, S., … Fagard, M. (2017). The bile acid deoxycholate elicits defences in Arabidopsis and reduces bacterial infection. *Molecular Plant Pathology*, *18*(4), 540–554. https://doi.org/10.1111/mpp.12416

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de extracción de ARN (Promega, 2004):

1. Congelar el tejido vegetal en nitrógeno líquido y pulverizar en un mortero.
2. Añadir 0.03g de tejido pulverizado en 175µL de ARN Lysis Buffer.
3. Agregar 350µL de ARN Dilution Buffer. Mezclar por inversión y centrifugar a velocidad máxima por 10 minutos.
4. Añadir 200µL de etanol 95% al lisado clarificado, mezclar pipeteando 3-4 veces. Transferir la mezcla a la Spin Column Assembly. Centrifugar a 12-14 x1000g por un minuto.
5. Tomar la Spin Basket de la Spin Column Assembly, desechar el líquido del Collection Tube y ensamblar de nuevo con la Spin Basket. Agregar 600µL de ARN Wash Solution, centrifugar a 12-14 x1000g.
6. Vaciar el Collection Tube. Prepare el mix de incubación de ADNsa combinando en un tubo estéril agregando 40µL de Yellow Core Buffer, 5µL 0.09M $MnCl_2$ y 5µL de enzima ADNsa I por muestra. Mezclar pipeteando con suavidad, no en el vortex. Mantener la ADNsa en hielo mientras esté descongelada. Aplicar 50µL de este preparado directamente en la membrana dentro del Spin Basket.
7. Incubar por 15 minutos a 20-25°C. Añadir 200µL de ADNse Stop Solution y centrifugar a 12-14 x1000g por un minuto.
8. Añadir 600µL de ARN Wash Solution y centrifugar a 12-14 x1000g por 1 minuto.
9. Vaciar el Collection Tube, añadir 250µL de ARN Wash Solution y centrifugar a alta velocidad por 2 minutos.

10. Para cada muestra, Transferir la Spin Basket a un tubo de 1.5 mL. Añadir 100µL de agua libre de nucleasas a la membrana. Centrifugar a 12-14 x1000g por 1 minuto, colocar las tapas hacia fuera. Remover el Spin Basket y descartar. Tapar el tubo de elusión y almacenar el ARN a -70°C.

Anexo 2: Protocolo de obtención de ADNc Roche (2017).

1. Descongelar los componentes y colocarlos en hielo.
2. Homogenizar en el vortex brevemente y centrifugar los reactivos.
3. Preparar el master mix de la reacción en un tubo libre de nucleasas, mantener en hielo. El master mix debe tener las siguientes componentes:

Reactivo	Volumen	Concentración final
Agua, grado PCR	x µL	-
TU Reaction Buffer	4µL	1x
TU Reverse Transcriptase	1µL	1x
ARN molde	x µL	2.5 µg
Total	20µL	

4. Mezclar y centrifugar.
5. Protocolo PCR: hibridación de primer: 25°C por 5 min, transcripción reversa: 55°C por 10 min, desnaturalización: 85°C por 5 min.

Anexo 3: Protocolo para rt-PCR

1. Descongelar un vial de FastStart Essential ADN Green Master y agua de grado PCR. Centrifugar brevemente los viales y mezclar cuidadosamente con una pipeta. Mantener en hielo y protegerlo de la luz.
2. Prepare una solución 10x concentrada de los primers para PCR.
3. En un tubo de 1.5 mL prepare el master mix para reacciones de 20µL añadiendo los reactivos listados a continuación:

Reactivo	Volumen
Agua, grado PCR	3µL
Primers PCR 10x conc.	2µL
Master Mix, 2x conc	10 µL
Total	15µL

4. Mezclar cuidadosamente con la pipeta. No utilizar el vortex. Tomar 15µL del PCR mix y colocar en las tiras de 8 tubos para LightCycler. Añada 5µL de ADN molde.
5. Cargar el termociclador.
6. Iniciar el programa.

Anexo 4: Resultados del procesamiento de datos en LinRegPCR.

Name	indiv_PCR_eff	Amplicon	threshold	mean_PCR_eff	Cq	N0
B	1.875	ACT	0.090	1.855	31.241	3.73E-10
B	1.907	ACT	0.075	1.907	31.687	9.95E-11
B	1.852	EF	0.090	1.869	29.739	7.51E-10
B	1.929	EF	0.075	1.934	31.609	6.70E-11
B	1.636	M3	0.090	1.648	32.619	7.47E-09
B	1.589	M3	0.075	1.667	31.969	6.02E-09
B	1.849	M6	0.090	1.867	32.173	1.70E-10
B	1.845	M6	0.075	1.853	32.777	1.25E-10
B	1.926	PR1	0.075	1.926	33.872	1.72E-11
B	1.888	PR2	0.075	1.866	30.210	4.97E-10
B	1.899	PR3	0.090	1.871	33.159	8.47E-11
B	1.871	PR3	0.075	1.881	32.629	8.39E-11
C+	1.834	ACT	0.090	1.855	30.443	6.11E-10
C+	1.943	EF	0.075	1.934	31.323	8.09E-11
C+	1.660	M3	0.090	1.648	31.627	1.23E-08
C+	1.656	M3	0.075	1.667	34.026	2.11E-09
C+	1.884	M6	0.090	1.867	30.925	3.72E-10
C+	1.880	M6	0.075	1.853	31.463	2.81E-10
C+	1.889	PR1	0.090	1.889	32.106	1.21E-10
C+	1.862	PR2	0.090	1.852	30.691	5.42E-10
C+	1.843	PR2	0.075	1.866	31.152	2.76E-10
C+	1.843	PR3	0.090	1.871	31.928	1.83E-10
C+	1.891	PR3	0.075	1.881	33.708	4.24E-11
T	1.808	ACT	0.092	1.808	36.949	2.85E-11
T	1.886	EF	0.090	1.869	36.660	9.90E-12
T	1.953	EF	0.075	1.934	36.461	2.73E-12
T	1.869	EF	0.092	1.869	37.073	7.75E-12
T	1.636	M3	0.090	1.648	42.409	5.61E-11
T	1.679	M3	0.075	1.667	35.520	9.81E-10
T	1.769	M3	0.092	1.769	37.599	4.48E-11
T	1.835	M6	0.075	1.853	34.309	4.85E-11
T	1.850	M6	0.092	1.850	38.442	4.86E-12
T	1.843	PR2	0.090	1.852	34.849	4.18E-11
T	1.857	PR2	0.092	1.857	37.272	8.83E-12
T	1.886	PR3	0.092	1.886	35.753	1.29E-11
B	1.884	ACT	0.082	1.892	28.978	7.69E-10

B	1.952	ACT	0.082	1.892	28.628	9.61E-10
B	1.845	EF	0.082	1.846	29.781	9.58E-10
B	1.811	EF	0.082	1.846	29.546	1.11E-09
B	1.000	M3	0.053	1.688	0.000	-9.99E+02
B	1.680	M3	0.053	1.688	31.759	3.16E-09
B	1.887	M6	0.082	1.892	32.920	6.29E-11
B	1.888	M6	0.082	1.892	33.202	5.25E-11
B	1.000	PR1	0.053	1.879	35.301	1.14E-11
B	1.890	PR1	0.053	1.879	35.301	1.14E-11
B	1.942	PR2	0.053	1.940	33.227	1.45E-11
B	1.858	PR2	0.053	1.940	33.363	1.33E-11
B	1.929	PR3	0.053	1.883	31.527	1.15E-10
B	1.870	PR3	0.053	1.883	29.842	3.34E-10
C+	1.917	ACT	0.082	1.892	34.998	1.65E-11
C+	1.909	EF	0.082	1.846	38.086	5.88E-12
C+	1.692	M3	0.053	1.688	36.509	2.62E-10
C+	1.422	M3	0.053	1.688	42.820	-9.99E+02
C+	1.923	M6	0.082	1.892	42.628	1.29E-13
C+	1.869	PR1	0.053	1.879	37.202	3.43E-12
C+	1.843	PR2	0.075	1.866	31.152	2.76E-10
C+	1.895	PR3	0.053	1.883	33.718	2.87E-11
T	1.861	ACT	0.082	1.892	29.753	4.69E-10
T	1.916	EF	0.082	1.846	31.583	3.17E-10
T	1.855	EF	0.082	1.846	31.044	4.42E-10
T	1.694	M3	0.053	1.688	35.149	5.35E-10
T	1.893	M6	0.082	1.892	32.615	7.64E-11
T	1.952	M6	0.082	1.892	33.335	4.83E-11
T	1.878	PR1	0.053	1.879	33.749	3.03E-11
T	1.937	PR2	0.053	1.940	32.479	2.39E-11
T	1.887	PR2	0.053	1.940	32.397	2.52E-11
T	1.837	PR3	0.053	1.883	31.772	3.03E-11