

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas



**“ACTIVACIÓN DE LA RUTA FENILPROPANOIDE Y ENZIMAS
DE ESTRÉS OXIDATIVO POR *Trichoderma longibrachiatum*
ICA-4 EN PLANTAS DE ALGODÓN TRANSGÉNICO
INOCULADAS CON *Fusarium spp*”**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

Tania Elisa González Soto

DIRECTOR Dr. en C. Daniel González Mendoza

Co-DIRECTOR Dr. en C. Rosalba Troncoso Rojas

Ejido Nuevo León, Mexicali, B.C.

Mayo del 2016

La presente tesis “Inducción de la ruta fenilpropanoide y enzimas de estrés oxidativo por *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4 en plantas de algodón transgénico inoculadas con *fusarium* spp” realizada por el **M.C. Tania Elisa González Soto**, dirigido por el Dr. En C. Daniel González Mendoza y la Co-Directora Dra. En C. Rosalba Troncoso Rojas, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias
Comité Particular

Dr. Daniel González Mendoza
Director de Tesis

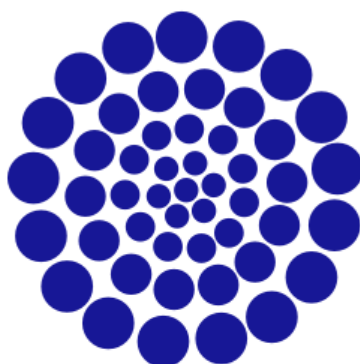
Dra. Rosalba Troncoso Rojas
Co-Director de Tesis

Dr. Alejandro Manelik García López
Sinodal

Dr. Onécimo Grimaldo Juárez
Sinodal

Dra. Lourdes Cervantes Díaz
Sinodal

Esta tesis de Doctorado titulada “**Activacion de la ruta fenilpropanoide y enzimas de estrés oxidativo por *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4 en plantas de algodón transgénico inoculadas con *Fusarium spp*”**, fue financiada parcialmente por el proyecto: CONACYT 219750 denominado “Mecanismos de tolerancia a metales esenciales y no esenciales en plantas de climas semiáridos: uso del mezquite (*Prosopis* sp.) como modelo de estudio.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a **Dios** y a la **Virgen** por estar a mi lado iluminando mi camino y bendiciendo mi trabajo y cada una de las cosas que tanto me gusta investigar y darme las fuerzas necesarias y la fe para concluir esta investigación.

A mi director de tesis el **Dr. Daniel Gonzalez Mendoza** por apoyarme en el transcurso de mi investigación y enseñarme a ser mejor investigadora, así como a poner en práctica mi conocimiento adquirido a lo largo del tiempo de estudio.

A mi Co-Directora de tesis la **Dra. Rosalba Troncoso** por estar siempre atenta a mis inquietudes y dudas, por apoyarme en la realización de la investigación y estar siempre para mí cuando necesitaba de su apoyo.

A mis asesores de Tesis a la **Dra. Lourdes Cervantes, Dr. Alejandro Manelik García L., Dr. Onécimo Grimaldo Juárez** por apoyarme con la investigación, además de darme a conocer las herramientas y conocimientos necesarios para culminar este trabajo de la mejor manera posible.

Al **CONACYT**, por el apoyo brindado a través de la expedición de la autorización de la beca de posgrado durante mi tiempo de estudio.

Al **ICA-UABC**, por permitirme formar parte de su programa de doctorado y por todo el apoyo brindado durante mi formación.

Al **Personal Académico, Administrativo, de Servicios** en general, muchas gracias por el apoyo brindado y por hacer de mi estancia una estancia placentera.

A mis **papás: Oscar y Elisa** por ser mi motor para salir adelante, por enseñarme a tratar de ser mejor persona, por los valores que me inculcaron, por darme los apoyos necesarios para terminar esta etapa de mi vida, por estar siempre ahí dando batalla para que yo siempre me encuentre de la mejor manera, por ser mi orgullo, mi guía mi todo, los amo papas.

A mis hermanas: **Lucía, Luisa y Fernanda** por apoyarme y darme fuerzas para que estos 3 años se me pasaran mas rápido y por estar siempre a mi lado en los momentos que ya no podía mas, las quiero mucho hermanitas.

A mi **Familia** por brindarme su apoyo incondicional, por estar siempre en los momentos que más necesitaba de su apoyo, a mis primas **Nallely** y **Karla** por estar cuando más necesitaba un abrazo familiar, a mis **tíos (as), primos (as)** a mi **Manina** y a toda la Familia, muchas gracias.

A la **Sra. Eloísa** y **Sr. Domingo** por estar siempre apoyándome, dándome fuerzas y alentándome a ser mejor persona, por su apoyo incondicional conmigo y con toda mi familia, les estoy muy agradecida.

A mis compañeros **Felipe, Ali Abdelmoteleb (el Egipcio), Claudia, Fanny, Tuty** y **Ana** por compartir tan bellos y gratos momentos tanto dentro del instituto y laboratorio, así como por fuera del mismo.

A **Juan** por ser parte importante en mi vida y estar siempre a mi lado apoyándome, así como por compartir sus conocimientos, momentos de aventuras, viajes, anécdotas y muchas cosas más que jamas olvidare.

A todas las personas que de una u otra manera estuvieron formando parte de toda esta etapa de mi vida, amigos, maestros, familiares, compañeros.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL.....	V
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE CUADROS	IX
ABREVIATURAS	X
CAPÍTULO I.....	1
1.1 Introducción	1
1.2 Hipótesis.....	8
1.3 Planteamiento del problema	8
1.4 Objetivo	9
1.4.1 <i>Objetivos específicos</i>	9
1.5 Literatura citada.....	10
CAPÍTULO II.....	14
2.1 Resumen	14
2.2 Abstract	15
2.3 Introducción	16
2.4 Material y Métodos	19
2.4.1 <i>Selección de sitios de muestreo</i>	19
2.4.2 <i>Aislamiento de cepas de hongos en cultivo de algodón transgénico</i>	20
2.4.3 <i>Identificación morfológica de las cepas fúngicas aisladas</i>	20
2.4.4 <i>Caracterización molecular de las cepas fúngicas aisladas</i>	20
2.4.5 <i>Diseño experimental</i>	22
2.5 Resultados y Discusión	22
2.5.1 <i>Aislamiento de diferentes especies de hongos en la rizósfera de cultivo de algodón transgénico</i>	22
2.5.2 <i>Descripción morfológica de las distintas cepas de Fusarium</i>	24
2.5.3 <i>Caracterización molecular de las distintas cepas de Fusarium solani</i>	27
2.6 Conclusiones	29
2.7 Literatura citada	30
CAPÍTULO III.....	34

3.1	Resumen	34
3.2	Abstract	35
3.3	Introducción	36
3.4	Material y Métodos	37
3.4.1	<i>Pruebas de germinación de plántulas de algodón transgénico</i>	37
3.4.2	<i>Pruebas de patogenicidad, porcentaje de severidad en plántulas de algodón inoculadas con F. solani.</i>	38
3.4.3	<i>Determinación de la eficiencia fotosintética e índice de verdor en plántulas de algodón transgénico inoculadas con F. solani.</i>	40
3.4.4	<i>Determinación de la arquitectura radicular y puntos de infección de F. solani en plántulas de algodón transgénico.</i>	40
3.4.5	<i>Diseño experimental.</i>	40
3.5	Resultados y Discusión	41
3.5.1	<i>Efecto de F. solani en germinación de semilla de algodón transgénico</i>	41
3.5.2	<i>Porcentaje de severidad en plántulas de algodón transgénico inoculadas con F. solani.</i>	42
3.5.3	<i>Cambios en la eficiencia fotosintética e índice de verdor en plántulas de algodón transgénico inoculadas con F. solani</i>	46
3.6	Conclusiones	49
3.7	Literatura citada	49
CAPÍTULO IV.....		53
4.1	Resumen	53
4.2	Abstract	54
4.3	Introducción	55
4.4	Material y Métodos	56
4.4.1	<i>Pruebas de antagonismo de Trichoderma ICA-4 con F. solani</i>	56
4.5	Resultados y Discusión	57
4.5.1	<i>Efecto de Trichoderma ICA-4 sobre el crecimiento de F. solani.</i>	57
4.6	Conclusiones	60
4.7	Literatura citada	60
CAPÍTULO V.....		63
5.1	Resumen	63
5.2	Abstract	64

5.3	Introducción	65
5.4	Material y Métodos	68
5.4.1	<i>Determinación de fenoles totales en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4.</i>	68
5.4.2	<i>Determinación de flavonoides totales en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4.</i>	69
5.4.3	<i>Determinación de compuestos fenólicos por HPLC en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4.</i>	70
5.4.4	<i>Determinación de enzimas de defensa en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4</i>	71
5.4.4.1	<i>Determinación de la actividad enzimática fenilalanina amonio-liasas (PAL)</i>	72
5.4.4.2	<i>Determinación de la actividad enzimática de peroxidasa (POD)</i>	73
5.4.4.3	<i>Determinación de la actividad enzimática de glucanasa</i>	74
5.4.4.4	<i>Determinación de la actividad enzimática de quitinasas</i>	74
5.4.5	<i>Diseño experimental</i>	75
5.5	Resultados y Discusión	75
5.5.1	<i>Contenido total de fenoles y flavonoides en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4</i>	75
5.5.3	<i>Principales compuestos fenólicos en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4.</i>	78
5.5.4	<i>Actividad enzimática de PAL en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4</i>	81
5.5.5	<i>Actividad enzimática de peroxidasa en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4</i>	82
5.5.6	<i>Actividad enzimática de glucanasas en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4</i>	84
5.5.7	<i>Actividad enzimática de quitinasas en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4</i>	86
5.6	Conclusiones	88
5.7	Literatura citada	88
	CONCLUSIONES	97
	ANEXOS.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principales estados productores de algodón a nivel Nacional....	3
Figura 2	Mecanismos de defensa en la planta activados por la presencia de microorganismos patógenos. Se muestran las reacciones de defensa que ocurren en la planta al estar en contacto con el patógeno	7
Figura 3	Coordenadas de los 3 sitios de muestreo de suelo y plantas de Algodón transgénico del Valle de Mexicali, B.C	19
Figura 4	Aislamiento de suelo por técnica de dilución en serie proveniente de la rizósfera de cultivo de algodón transgénico del Valle de Mexicali, así como cultivo de tallo de planta de algodón transgénico.	23
Figura 5	Cinética de crecimiento de las cuatro cepas aisladas de la rizósfera de plantas de algodón transgénico en el Valle de Mexicali.	24
Figura 6	Visualización de las diferentes características de color de las cuatro cepas aisladas de la rizósfera de algodón transgénico en el Valle de Mexicali, B.C.	26
Figura 7	Diferentes estructuras del hongo <i>F. solani</i>	27
Figura 8	Productos de PCR obtenidos de las 4 cepas aisladas de la rizósfera de algodón transgénico del Valle de Mexicali.	28
Figura 9	Árbol filogenético basado en secuencias ITS del rDNA de aislamientos de hongos obtenidos de la rizósfera de algodón y de secuencias de referencia del GenBank.	29
Figura 10	Diagrama de flujo de la inoculación de las 4 cepas de <i>F. solani</i> en plantas de algodón transgénico Bollgard.	38
Figura 11	Pruebas de patogenicidad en el proceso de germinación de semillas de algodón transgénico Bollgard inoculadas con 4 cepas de <i>F. solani</i> .	41
Figura 12	Sintomatología presente en plantas de algodón transgénico inoculadas con <i>F. solani</i> 12 días después de la inoculación.	42
Figura 13	Porcentaje de severidad en plántulas de algodón transgénico Bollgard a los 3, 6, 9 y 12 días de inoculado el patógeno.	43
Figura 14	Síntomas de las cuatro cepas aisladas de <i>F. solani</i> en cultivo de algodón transgénico Bollgard.	44
Figura 15	Puntos de Infección presentes en plántulas de algodón transgénico Bollgard a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de inoculado <i>F. solani</i> .	45
Figura 16	Eficiencia fotoquímica del Fotosistema II en plántulas de algodón transgénico Bollgard inoculadas y no con cuatro cepas de <i>F. solani</i> durante 12 días después de la inoculación muestreo y un testigo.	47
Figura 17	Comportamiento del índice de verdor para plántulas de algodón transgénico Bollgard inoculadas con cuatro cepas de <i>F. solani</i> para cada día de muestreo y un testigo.	48

Figura 18	Inhibición del crecimiento micelial (PICR) en cultivos duales de las tres cepas de <i>F. solani</i> con <i>Trichoderma longibrachiatum</i> ICA-4, así como el grado obtenido a partir de la escala de Elías y Arcos (1984).	58
Figura 19	Micoparasitismo de <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4 contra el hongo fitopatógeno <i>Fusarium solani</i> .	59
Figura 20	Contenido de fenoles totales en plantas de algodón transgénicas inoculadas o no con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4.	76
Figura 21	Contenido de flavonoides totales en plantas de algodón transgénico inoculadas o no (testigo) con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4.	77
Figura 22	Perfiles cromatográficos de ácidos fenólicos en plantas de algodón transgénico inoculadas o no (testigo) con la cepa <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4.	79
Figura 23	Perfiles cromatográficos de flavonoides en plantas de algodón transgénico testigo (sin inocular <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4) y en plantas inoculadas con la cepa <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4.	80
Figura 24	Actividad del enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) en plantas de testigo (sin inocular con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4) y en plantas inoculadas con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4.	81
Figura 25	Actividad del enzima peroxidasa (POD) en plantas de Control (sin inocular con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4) y en plantas inoculadas con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4.	83
Figura 26	Actividad del enzima glucanasa (GLU) en plantas de testigo (sin inocular con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4) y en plantas inoculadas con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4.	85
Figura 27	Actividad del enzima quitinasa (QUI) en plantas de testigo (sin inocular con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4) y en plantas inoculadas con <i>T. longibrachiatum</i> ICA-4.	86

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Características morfológicas representativas de las cuatro cepas aisladas de la rizósfera de algodón transgénico en el Valle de Mexicali.	25
Cuadro 2	Valores correspondientes a los diferentes porcentajes de lesión presentes en las plántulas.	39
Cuadro 3	Escala para evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo), de acuerdo a la medida de la invasión de la superficie, colonización y esporulación (Elías y Arcos, 1984)	57

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
L	Microlitro
µmol	Micromol
4-Me-U	4-Metilumbeliferona β-D-N, N', N'' triacilquitotriósido
AlCl ₃	Cloruro de aluminio
ANOVA	Análisis de varianza
Avr	Avirulencia
B.C.	Baja California
BHA	Hidroxianisol butilado
BSA	Suero albumina bovina
cDNA	DNA complementario
CHI	Chalcona isomerasa
CHS	Chalcona sintasa
Cm	Centímetro
Cot	Cotangente de curva patrón
D.O.	Densidad óptica
DEPC	Diethylpyrocarbonato
Dil	Dilución
DNA	Ácido desoxibirronucleico
DNS	ácido 3,5 dinitro salicílico
dNTP's	Deoxinucleósidos trifosfato
DTTP	Timidina trifosfato
E.U.A	Estados Unidos de América
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ens	Ensayo
enz	Enzima
<i>Et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros)
etc	Etcétera
Fm	Fluorescencia máxima
Fv	Fluorescencia variable
g	Gramo
GLU	Glucanasa
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ha	Hectárea
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HR	Respuesta hipersensible
IGS	Intergenic Spacer región
ISR	Resistencia sistémica inducida
ITS	Internal transcribed spacer
JA	Ácido jasmónico
ε	Coefficiente extinción molar
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio

MgSO ₄	Sulfato de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitro
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
NaNO ₂	Nitrato de sodio
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
PAL	Fenilalanina amonio-liasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar dextrosa de papa
POD	Peroxidasa
PR's	Proteínas de patogénesis
P.S.	Peso seco
QUI	Quitinasa
RCA	Radio de crecimiento antagonista
RCP	Radio de crecimiento del patógeno
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
RNAse	Enzima que degrada el RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
Rt	Tiempo de retención
S	Segundo
SA	Ácido salicílico
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	dodecilsulfato sódico
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SNA	Agar Nährstoffarmer Spezieller
Spp	Subsubespecie
TAE	Tris acetato EDTA
Tris-HCl	TRIS hydrochloride

CAPÍTULO I

1.1 Introducción

El algodón es una fibra natural celulósica (polisacárido cuya unidad estructural es la 1,4- β -anhidroglucosa y la unidad repetida la celobiosa). Se extrae de una semilla que requiere un mínimo de 180 a 200 días sin heladas, unos 160 días con temperaturas por encima de los 15°C, una adecuada iluminación solar y un mínimo de 50 cm³ de agua durante la época de crecimiento. Como se puede observar la temperatura, la luz solar, el agua y los nutrientes limitan las áreas en las que se puede cultivar el algodón de forma satisfactoria (Freeland *et al.*, 2006).

Las características de las fibras de algodón presentan una gran variabilidad respecto a su longitud, madurez, delicadeza, uniformidad y resistencia, parámetros que constituyen los elementos básicos para determinar la calidad de una fibra y por tanto su posterior aplicación. La longitud de la fibra, su delicadeza y su resistencia dependen básicamente de características genéticas. Por el contrario, el sistema de cosechado influye sobre la uniformidad de la fibra, sobre todo en fibras cortas, y las condiciones medio ambientales sobre su madurez. Se pueden considerar cuatro especies cultivadas de algodón (*Gossypium*): las especies originarias de Asia y Europa (*Gossypium herbaceum* y *Gossypium arboreum*) y las especies originarias del continente americano (*Gossypium barbadense* y *Gossypium hirsutum*). Sobre un 90% del algodón que se comercializa en el mundo hoy en día es de la variedad *Gossypium hirsutum*, y sobre un 8% de la *Gossypium barbadense* (Solleiro, 2014). *Gossypium hirsutum*, comúnmente denominado como algodón mexicano o algodón de tierras altas, pertenece a la familia *Malvácea*, a la tribu *Gossypieae* y al género *Gossypium* (Cronquist, 1981). El género *Gossypium* comprende 50 especies (Percival *et al.*, 1999), de las cuales 14 se distribuyen en México. Usualmente, sólo cuatro especies de este género son cultivadas y se les conoce con el término genérico de algodón.

El algodón es uno de los productos más cultivados a nivel mundial, representando la mitad del área total de cultivos no destinados a la alimentación, con 86 millones de acres

y es además, la fibra más consumida a nivel mundial (50% del total) (Solleiro, 2014). La importancia económica del algodón es debida principalmente a la propia fibra. Aunque hay productos derivados de las semillas ampliamente utilizados por otras industrias. Por un lado, las semillas de algodón que contienen un 24% de proteína, representan un 47% del “cottonseed cake”, el cual se emplea como pienso para animales rumiantes o como fertilizante (Freeland *et al.*, 2006). Dichas semillas también contienen un 15% de aceite, el denominado aceite de algodón que se emplea para fabricar margarinas, aceites comestibles, jabones, pinturas, etc. Por otro lado, las cáscaras de las semillas que representan un 40%, se emplean como fertilizantes o piensos (Myers y Stolton, 1999). La cantidad y composición de los residuos en la desmotadora una vez cosechado el algodón depende en gran medida del método de recolección. Si éste es manual los residuos son básicamente hojas y fibras, mientras que si es mecanizado los residuos contienen también ramitas, cáscaras, etc. Estos residuos producen una buena composta e incluso en algunos países se está investigando para producción de energía a partir de los mismos. La cantidad de pelusa que resta en las semillas después del desmote varía en función de la variedad, pero puede llegar hasta el 10% del total. Esta pelusa, las motas (semillas no desarrolladas) y los residuos fibrosos del desmote se emplean en la producción de fieltros, colchones, tapicería y ropa de cama, también pueden emplearse como algodón de baja calidad o como materia prima en las industrias papeleras, productoras de rayón, para fabricar papel fotográfico, películas de rayos X, o materiales explosivos (Freeland *et al.*, 2006).

La producción de algodón es crucial para las economías de la mayoría de países en vías de desarrollo en África, Asia y Latinoamérica, ya que representa la principal entrada de divisas gracias a las exportaciones. El algodón es cultivado en más de 80 países (Smith, 1999) y se estima que aproximadamente el 2.4% del área cultivable en el mundo está destinado para el algodón (Blaise, 2006). Las áreas específicas de producción incluyen países como E.U.A., India, China, México, Sudamérica, el medio oriente y Australia, donde las condiciones climáticas proporcionan los requerimientos adecuados para el cultivo del algodón. En la mayor parte de países productores de algodón la industria textil ha hecho que la principal prioridad haya sido exportar productos ya manufacturados no

sólo algodón crudo, ya que la expansión en este sector genera un gran número de puestos de trabajo en el sector industrial y agrícola (Blaise, 2006).

Por otro lado, los países del Sudeste asiático que han experimentado un fuerte desarrollo en la industria textil han intentado aumentar la producción de algodón para evitar las importaciones de esta materia prima (Smith, 1999). Según los datos de FAOSTAT (2007), durante el 2007 el 25.15% de la superficie mundial de oleaginosas fue de algodón (63.04 millones de hectáreas), donde México ocupó el 15 lugar del total de la producción y 32 en superficie cosechada a nivel mundial aportando el 0.62% de la producción mundial de algodón cosechado en el 0.35% de la superficie mundial. El número de productores a nivel nacional es de 5 mil (aprox.) principalmente distribuidos en los estados de Chihuahua, Sinaloa, Sonora, Baja California, Tamaulipas y la Región Lagunera (CONAPAAC, 2008), A nivel nacional el estado de Chihuahua es líder en superficie sembrada para el cultivo de algodón, aumentado su producción de 33 mil has en el 2003 a más de 60 mil hectáreas en el 2006, 2007 y 2008, por lo que esto se traduce en mayor producción. Por otra parte, Baja California, se sitúa como el segundo estado en cuanto a superficie destinada para la siembra de algodón que va de 13 mil a 23 mil hectáreas (figura 1).

Producción algodón a nivel Nacional

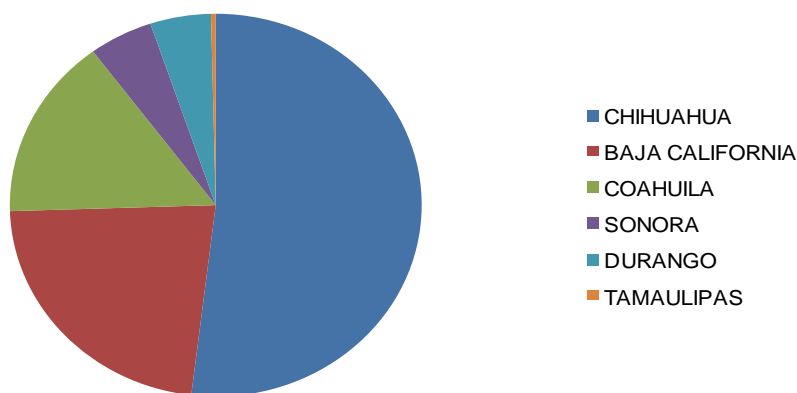


Figura 1. Principales estados productores de algodón a nivel Nacional.

El algodón es uno de los cultivos más emblemáticos de la ciudad de Mexicali, ya que llegó a ser, por sus volúmenes de producción, el más importante, en especial en el Valle de Mexicali. Según el SIAP, en el año agrícola 2007, el algodón es el tercer cultivo de mayor importancia económica en Mexicali. De acuerdo al VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal, Baja California ocupa el segundo lugar nacional en producción de algodón después de Chihuahua, el tercer lugar lo tiene Coahuila de Zaragoza. Se tienen registradas en la entidad 384 unidades de producción agrícola dedicadas a la siembra de algodón. La superficie sembrada asciende a 20 815.48 hectáreas, lo que representa una participación del algodón de 7.1% en el total de superficie sembrada de la entidad. De este cultivo se cosecharon casi 21 mil hectáreas, es decir 99.8% de la superficie sembrada, lo que significa que tuvo una siniestralidad de 0.2%; la producción obtenida fue de 71 760.84 toneladas, con un rendimiento de 3.5%, por su parte, la extensión cosechada de algodón representa 7.3% del total estatal. Al revisar la participación de los municipios en el cultivo del algodón, se aprecia que en Mexicali se ubican 374 unidades de producción agrícola que siembran este cultivo, las cuales aportan 98% tanto de las hectáreas sembradas como de las cosechadas (INEGI, 2013).

En Mexicali, el cultivo de algodón ha tenido una tendencia variable en los últimos años, reduciendo sus rendimientos debido a la presencia de organismos fitopatógenos que afectaron el cultivo, tal es el caso de la presencia de mosquita blanca la cual se estableció como un problema en el Valle de Mexicali, B. C. en 1991, y avanzó hacia el sur del país, causando serios daños a este y otros cultivos (Martínez, 1994). Las plagas de insectos son el mayor obstáculo para incrementar la productividad en la mayoría de países productores de algodón. Las pérdidas provocadas por plagas y el costo de los insecticidas para combatirlas suponen a los agricultores un gasto anual de 5 mil millones de dólares. Aproximadamente el 88% del área total de algodón sufre una infestación media-alta de plagas de lepidópteros (Polak *et al.*, 2005). En el algodón se aplican más insecticidas que en otros cultivos, aproximadamente 20% de todos los insecticidas aplicados a todos los cultivos. La biotecnología es una herramienta recientemente usada por los investigadores y en particular por los agricultores para mejorar la productividad de sus cosechas. Mediante esta tecnología se han desarrollado variedades de algodón como la Bollgard,

la cual produce la proteína Cry1Ac, derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, reduciendo y en muchos casos eliminando la necesidad de aplicar insecticidas químicos para controlar las principales plagas de orugas de las cápsulas (Perlak *et al.*, 1991). El algodón Bollgard tiene valor no solo como un reemplazo de las aplicaciones de insecticidas contra plagas específicas, sino también como una herramienta en el manejo de plagas, que puede otorgar beneficios adicionales a la reducción en los costos del cultivo (Edge *et al.*, 2001).

Sin embargo, han surgido preocupaciones acerca de los posibles riesgos ambientales causados por el uso de algodón transgénico, dándole importancia al efecto que tiene éste sobre los microorganismos del suelo (Castaldini *et al.*, 2005), por lo que se han realizado distintos estudios evaluando la resistencia de enfermedades en líneas de algodón transgénico en comparación con las líneas convencionales de algodón. Zhu y Feng (2005) informaron que las líneas de algodón transgénicas mostraron una mayor incidencia de *Fusarium* y *Verticillium* en comparación con líneas convencionales. Por tal motivo se realizaron distintas evaluaciones sobre la producción de exudados radiculares de plantas de algodón transgénicas, las cuales mostraron que las líneas transgénicas promueven la germinación de esporas y el crecimiento micelial del hongo *F. oxysporum* en comparación con las líneas convencionales (Li *et al.*, 2009).

Se ha visto la presencia de plantas muertas por marchitamiento en el Valle de Mexicali, provocado presumiblemente por hongos fitopatógenos de suelo responsables de la enfermedad de damping off como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Thielaviopsis* sp., *Phymatotrichum omnivorum*. El daño que se presenta es una necrosis de color marrón oscuro, inicialmente a un lado del tallo y avanza hasta redondearlo completamente, estrangulando el hipocotilo al nivel del suelo, lo que produce la muerte de la planta al bloquearse el flujo de agua hacia las hojas. Cuando se presenta en plantas de mayor edad, las lesiones son hendiduras, de borde definido y color oscuro y las plantas permanecen erguidas pero se marchitan y mueren (Corpoica, 2005). En el caso del marchitamiento causada por el hongo *Fusarium* sp., los síntomas aparecen en la época de floración y en la zona basal de la planta. Los tallos toman un color pardo (casi

negro) y las hojas se tornan amarillentas, luego se caen y la planta muere. En corte longitudinal y transversal de tallos y raíces, se aprecia una coloración negra o castaña en los haces vasculares, en forma de corona (Corpoica, 2005).

La planta al verse afectada por un organismo patógeno activa sus mecanismos de defensa la cual implica la puesta en marcha de una secuencia compleja de acciones, en donde en primer lugar se produce la percepción por la planta del estímulo estresante, seguida del procesamiento de la señal de estrés percibida, que implica tanto su amplificación como su integración en la ruta o rutas de transmisión de la información, y finalmente tiene lugar la regulación de la expresión génica (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Las plantas al estar expuestas a un gran número de patógenos, han desarrollado sistemas de defensa altamente efectivos para detener o contrarrestar la infección; estos mecanismos son de dos tipos, constitutivos e inducidos por la presencia del patógeno (figura 2). Los mecanismos de defensa constitutivos actúan deteniendo la entrada de los patógenos en los tejidos de la planta, funcionando de forma constante, utilizando estrategias químicas o estructurales. Las primeras consisten en la producción por parte de la planta de gran diversidad de sustancias tóxicas para los organismos patógenos (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996). Si a pesar de estas barreras el patógeno entra en la planta, ésta puede activar mecanismos de defensa con el fin de detener la infección, son los llamados mecanismos de defensa inducidos por patógeno. Es una reacción más severa a nivel local, en el tejido que está directamente en contacto con el patógeno, y más leve a nivel sistémico en los tejidos no infectados. Este tipo de reacción permite potenciar las barreras, tanto químicas como estructurales, que los tejidos vegetales tienen de forma constitutiva (Heath, 2000).

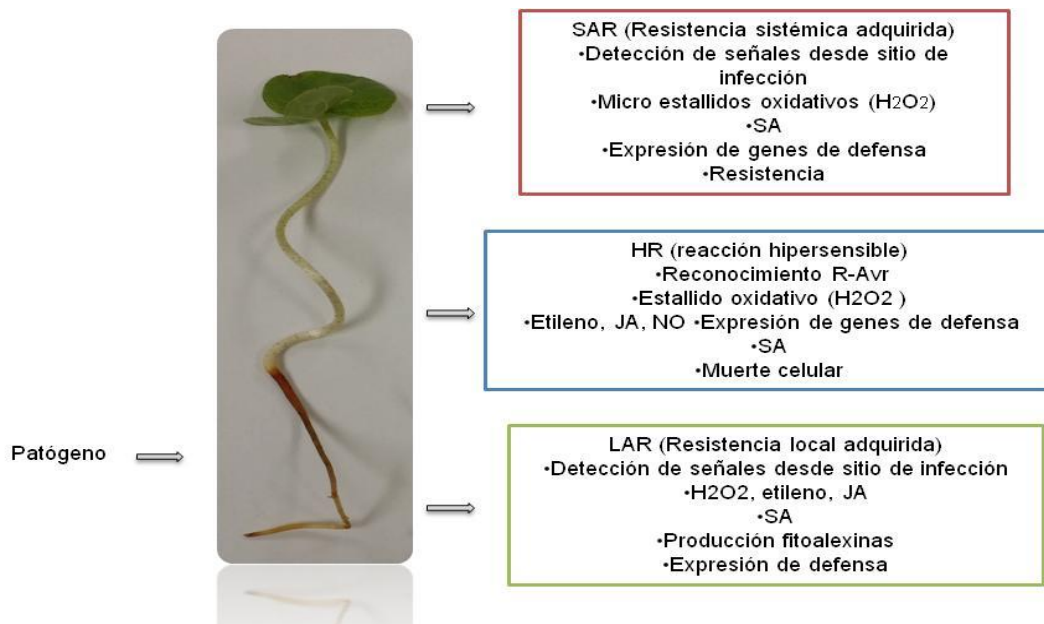


Figura 2. Mecanismos de defensa en la planta activados por la presencia de microorganismos patógenos. Se muestran las reacciones de defensa que ocurren en la planta al estar en contacto con el patógeno.

Se ha visto que estos mecanismos de defensa pueden ser inducidos por diversos factores como por ejemplo, el uso de microorganismos benéficos los cuales son capaces de inducir la resistencia sistémica en la planta creando un sistema de control biológico. Dentro de los microorganismos usados en control biológico se encuentran distintos géneros de hongos (*Trichoderma* spp., hongos micorrízicos, entre otros), así como bacterias (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., entre otras). El control biológico de fitopatógenos con microorganismos antagonistas ha recibido gran interés en los últimos años debido a su potencial y a las aplicaciones exitosas en diferentes cultivos (Fravel, 2005). El éxito del control de estos organismos se atribuye a la actividad sinérgica de diferentes mecanismos de acción directos e indirectos (Harman *et al.*, 2004).

Uno de los hongos antagónicos que se ha utilizado como control biológico, es *Trichoderma* spp., el cual produce cambios celulares en el hospedero, tales como un aumento de depósitos de calosa en el interior de la pared celular y aumento en la actividad peroxidasa (POD) y quitinasa (QUI) (Yedidia *et al.*, 1999), además de inhibir el crecimiento del patógeno y ocasionar cambios histológicos en el hospedero,

relacionándose principalmente a la producción de reguladores de crecimiento y estimulación de la división, diferenciación y crecimiento celular en la planta por el agente biocontrol (Infante *et al.*, 2009). A nivel molecular, la resistencia resulta en el incremento en la producción de metabolitos y enzimas relacionados con los mecanismos de defensa, tales como las enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL) y chalcona sintetasa (CHS), involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas y de proteínas relacionadas con la patogenicidad como: quinasas y β -1,3-glucanasas, entre otros (Benítez *et al.*, 2004).

Debido a lo mencionado anteriormente sobre el uso de control biológico como inductor de resistencia sistémica en plantas, surge el interés de estudiar estos microorganismos en la interacción planta-microorganismo benéfico-patógeno.

1.2 Hipótesis

La infección de plantas de algodón transgénico Bollgard por *Fusarium solani* modifica la expresión de diferentes mecanismos de defensa de la planta, incluyendo un aumento en el contenido de compuestos fenólicos, actividad de enzimas de defensa (fenilalanina amonio-liasa, glucanasas, quitinasas y peroxidasas).

1.3 Planteamiento del problema

El cultivo de algodón transgénico Bollgard en el Valle de Mexicali ha presentado una disminución en los rendimientos obtenidos, debido a la marchitez del cultivo y la futura muerte de la planta. Esta marchitez es causada principalmente por hongos fitopatógenos del género de *Fusarium*, causando la marchitez de plantas en varias parcelas en el Valle de Mexicali, B.C. Debido a lo anterior es importante el control de este hongo fitopatógeno, el cual ha sido controlado de cierta manera por medio de la utilización de fungicidas químicos durante décadas; sin embargo se ha visto un deterioro ambiental en el tiempo de aplicación que ha llevado al hombre a buscar metodologías de control más amigables con el ambiente, mediante el uso de alternativas biotecnológicas que contribuyan a la reducción y eliminación de éstos compuestos químicos.

Dentro de estas alternativas biotecnológicas se encuentra al uso de microorganismos benéficos, ya que estos presentan una alternativa ecológica y eficaz frente a los numerosos y crecientes problemas causados por hongos patógenos presentes en el cultivo de algodón transgénico. Uno de los principales microorganismos utilizados como agentes de biocontrol se encuentra a diferentes especies del hongo *Trichoderma* spp. los cuales ofrecen buenas posibilidades como antagonista de hongos patógenos de plantas, actuando como hiperparásitos competitivos, son fáciles de aislar y cultivar, poseen un crecimiento rápido en un gran número de sustratos y posee además mucha biodiversidad en los suelos de uso agrícola. Se ha visto que este hongo induce los mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque por hongos fitopatógenos por lo que este trabajo permitirá evaluar el contexto de la interacción algodón transgénico-*F. solani*-*Trichoderma*, evaluando desde la identificación del agente causal de la enfermedad de marchitamiento, así como el efecto antagónico de *Trichoderma* frente este agente fitopatógeno y la activación en los mecanismos de defensa que van desde la actividad de enzimas de defensa (PAL, POD, GLU, QUI), así como la expresión de los principales genes de defensa en las plantas, permitiéndonos conocer los mecanismos y respuestas en esta interacción con el fin de apoyar a los agricultores para el manejo integrado de hongos fitopatógenos empleando alternativas biotecnológicas como el uso de *Trichoderma* en el cultivo de algodón transgénico.

1.4 Objetivo

El objetivo general de este trabajo es evaluar la inducción de mecanismos de defensa, los cuales incluyen la formación de compuestos fenólicos y actividad de enzimas de defensa, así como evaluar la expresión de genes de defensa en la interacción Algodón-*Trichoderma*-*Fusarium solani*.

1.4.1 Objetivos específicos

1. Aislar e identificar al hongo causante de la enfermedad de marchitamiento en plantas de algodón transgénico en el Valle de Mexicali, B.C.
2. Identificar las especies de *Fusarium* presentes en plantas de algodón transgénico cultivadas en el Valle de Mexicali utilizando un enfoque filogenético.
3. Determinar el porcentaje de germinación de semillas de algodón transgénico, así como la severidad en semillas y plántulas de algodón transgénico Bollgard inoculados con cuatro cepas de *F. solani*.
4. Determinar el porcentaje de severidad, eficiencia fotosintética, clorofila y puntos de necrosamiento en plantas de algodón transgénicas inoculadas con distintas cepas de *F. solani*.
5. Determinar la capacidad antagónica y el mecanismo de acción de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4 sobre tres cepas distintas de *F. solani*.
6. Determinar el perfil de compuestos fenólicos así como la inducción de enzimas de defensa (PAL, QUI, GLU, POD) en plantas de algodón transgénico a nivel campo.

1.5 Literatura citada

Azcón-Bieto J. y Talón M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal: Fisiología de las plantas y el estrés. 2da Ed. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid. 29: 577-597.

Benítez T., Rincón A., Limón M. and Codón A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.

Blaise D. 2006. Yield, Boll Distribution and Fibre Quality of Hybrid Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) as influenced by Organic and Modern Methods of Cultivation. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 192:248-256.

Castaldini M., Turrini A., Sbrana C., Benedetti A., Marchionni M., Mocali S., Fabiani A., Landi S., Santomassimo F., Pietrangeli B., Nuti M., Miclaus N. and Giovannetti M. 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial

mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 71:6719-6729.

Corpoica. 2005. Módulos 1 y 3 del Tutorial: “El Algodonero, Manejo Integrado del Cultivo en Colombia”. Ibagué: ConalgodonFFA-Minagricultura-Corpoica. 215.

Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York. 1202.

Edge J., Benedict J., Carroll J., Arroll J. and Reding H. 2001. Bollgard Cotton: An assessment of global economic, environmental, and social benefits. *J. Cotton Science.* 5:1-8.

Fravel D .2005. Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology.* 43: 337-359.

Freeland J., Pettigrew T., Thaxton P. and Andrews G. 2006. Agrometeorology and cotton production.in *Guide to Agricultural Meteorological Practices.* 3ra Ed. (en preparación). Capítulo 13.

Harman G., Petzoldt R., Comis A. and Chen J. 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94: 147–153.

Heath M. 2000.Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology.* 44:321-334.

Agricultural area organic, total: from FAOSTAT/ResourceSTAT – Land section: Agricultural area organic, total (FAOSTAT Code 6671). <http://faostat.fao.org/>

Agricultura-Baja California y Ganado-Baja California. Censos. 2007. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México).

http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/agropecuario/2007/agricultura/bc/agriculBC.pdf

Medina J. 2012. Algodón Mexicano. Editorial El firco hoy, Mexico, Distrito Federal.
https://www.icac.org/wp-content/uploads/2012/07/Mexico_es.pdf

Infante D., Martínez B., González N. y Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev Protección Veg.24:1:14-21.

Kloepper J., Ryu C. and Zhang S. 2004. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. The American Phytopathology Society. 94:11:1259-1266.

Li X., Liu B., Heia S., Liu D., Han Z., Zhou K., Cui J., Luo J. and Zeng Y. 2009. The effect of root exudates from two transgenic insect-resistant cotton lines on the growth of *Fusarium oxysporum*. Transgenic Res. 2009. 18:757-767.

Martínez J. 1994. Problemática Fitosanitaria causada por la Mosquita Blanca en México. In: Memoria de la Segunda asamblea anual del CONACOFI. Montecillo, Estado de México. 77-88.

Mauch-Mani B. and Slusarenko A. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. Plant Cell .8: 203-212.

Myers D. and Stolton S. 1999. Organic Cotton, From Field to Final Product. Intermediate Technology Publications.

Percival A., Wendel J. and Stewart J. 1999. Taxonomy and Germplasm Resources. In Cotton: Origin, History, Technology, and Production. Smith, W.C. (ed.). John Wiley and Sons. 1.2: 33-63.

Perlak F., Fuchs R., Dean D., McPherson S. and Fischhoff D. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 88:3324-3328.

Polak M., Prause J., Contreras G. y Caram G. 2005. Plagas en el cultivo de algodón *Gossypium hirsutum* (L.) (Malvales: *malvaceae*) en relación a condiciones ambientales y a sus estados fenológicos. www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2001/5-Agrarias/A-016.pdf

Prescott T., Harley J. y Klein D. 2004. Microbiología. 5ta Ed. McGraw-Hill, Interamericana España. 1240.

servicio de información agroalimentaria y pesquera, México. 2014. SIAP-SAGARPA. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>.

Smith W. 1999. Production statistics. Chapter 3.1. In: WC Smith, JT Cothren, eds. Cotton: Origin, History, Technology and Production. John Wiley and Sons, Inc. 435-449.

Solleiro R. 2014. Algodón Mexicano. Comité nacional sistema producto algodón, A.C. CONAPAAC. 3.

Yedidia I., Benhamou N. and Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol. 65: 1061–1070.

Zhu K. and Feng Z. 2005. Analysis on disease resistance in anti-insect cotton cultivars (lines) in China. Chin Cotton. 32:4:23.

CAPÍTULO II

MARCHITEZ RADICULAR DE CULTIVO DE ALGODÓN TRANSGÉNICO: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL

2.1 Resumen

La producción de cultivo de algodón en el valle de Mexicali se ve afectada La producción de cultivo de algodón en el valle de Mexicali se ve afectada principalmente por enfermedades que causan marchitez y pudrición de la raíz, las cuales son asociadas principalmente a especies de hongos como lo es *Fusarium*. Por lo tanto, en el presente estudio el objetivo fue el aislamiento e identificación de especies de *Fusarium* de la rizósfera de plantas de algodón transgénico resistente al ataque de insectos plantados en el Valle de Mexicali. Los resultados del estudio mostraron un total de 4 cepas de hongos nativos aislados de la rizósfera de plantas de algodón, las cuales fueron nombradas como T-ICA01, T-ICA03, T-ICA04, y T-ICA08. Se identificaron las cepas de hongos en función de sus características fenotípicas y sus datos de secuenciación de regiones ITS correspondientes al hongo *Fusarium solani*. Finalmente, nuestros resultados mostraron que, en algodón transgénico resistente a los insectos, la enfermedad de "marchitamiento" es causado por el hongo *Fusarium solani*. Futuros estudios son necesarios para evaluar la importancia de la caracterización de las poblaciones de *F. solani* con el fin de aclarar si los estados fenológicos también pueden tener un efecto sobre la diversidad genética de las poblaciones de hongos observados.

Palabras clave: Valle de Mexicali, ADN, *Fusarium*, Algodón, Enfermedades

2.2 Abstract

The cotton production in Mexicali valley is particularly affected by the wilt and root rot disease associated with *Fusarium* species. Therefore, in the present study the objective was isolation and molecular identification of the *Fusarium* species of the rhizosphere of transgenic insect-resistant cotton plants planted in Mexicali valley. The result showed a total of four native fungi isolated from the rhizosphere of cotton plants, T-ICA01, T-ICA03, T-ICA04, and T-ICA08. The fungi isolated were identified based on their phenotypic and ITS regions sequencing data as *Fusarium solani*. On the other hand, the percentage infection index showed that T-ICA03 and T-ICA04 caused a systemic colonization (90%) followed by the appearance of radicle and coleoptiles necrosis. In contrast, T-ICA08 strain was less pathogenic against seed tissues (40%) in comparison with the other strains isolated. Finally, our results showed that in transgenic insect-resistant cotton the disease “*Fusarium* wilt” is caused by the fungus, *Fusarium solani*. Future studies are necessary for evaluate the importance of characterization of *F. solani* populations in order to clarify whether the phenological stages might also have an effect on the genetic diversity of fungal populations observed.

Key words: Mexicali valley, DNA, *Fusarium*, cotton, diseases

2.3 Introducción

El Valle de Mexicali se encuentra en el Distrito de Desarrollo Rural 002, que cubre el municipio de Mexicali, Baja California, y el municipio de San Luis Río Colorado, Sonora (Méndez-Trujillo *et al.*, 2013). Su área de suelo cultivable es de 210,930 hectáreas (ha) de las cuales un total de 184,283 hectáreas pertenecen a Mexicali y 26,648 hectáreas pertenecen a San Luis Río Colorado. Un total de 15,177 personas dependen económicamente de la agricultura en el valle de Mexicali, principalmente en la producción de algodón (Vargas-Bejarano *et al.*, 2012). El algodón (*Gossypium hirsutum* L.) es el cultivo de mayor importancia económica utilizado en la industria textil (Karademir *et al.*, 2011).

En este sentido, en los últimos años se ha sembrado el algodón transgénico Bollgard, el cual produce una proteína para el control de insectos (Cry1Ac) derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* (B.t.k.), presente naturalmente en el suelo. La producción de la proteína Cry1Ac en la planta de algodón otorga una protección eficaz contra plagas claves de insectos Lepidópteros para este cultivo (Betz *et al.*, 2000). Este tipo de algodón transgénico ha sido utilizado en México desde 1996 para el control del gusano rosado, el gusano tabacalero y el gusano bellotero, produciendo un incremento en el rendimiento y una disminución del uso de agroquímicos para el control de plagas (Teran-Vargas *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha visto la presencia de otras enfermedades en cultivos de algodón presentando serios problemas y pérdidas económicas; en particular enfermedades relacionadas a la marchitez y pudrición de la raíz (Abd-Elsalam *et al.*, 2003). En este sentido, se ha visto que los hongos más comunes asociados con la pudrición de la raíz de algodón y enfermedades de marchitamiento son del género *Fusarium* spp. (Abo-Elyousr *et al.*, 2008). *Fusarium* spp. es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland, 1988). Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa- dextrosa

agar (PDA) a 25 °C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias (Booth, 1970) y una de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias.

Este patógeno causa pudrición de la raíz y los síntomas de damping-off en el algodón, afectando así el rendimiento y la calidad de la fibra (AGBIOS, 2013). *Fusarium* spp., es uno de los microorganismos que contribuyen a la complejidad de la enfermedad en las plantas de algodón (Chimbekujwo, 2000). Los síntomas de la enfermedad de *Fusarium* spp., en plantas de algodón incluyen la pudrición de semillas, la aparición de pre y post almácigos, plántulas con podredumbre de raíz, entre otras, las cuales producen una reducción del vigor de las plántulas (Abd-Elsalam *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). Además, estudios recientes han demostrado que las plantas transgénicas tienen efectos colaterales, así como una disminución en la resistencia en comparación con las líneas convencionales frente al ataque de *Fusarium* spp. (Li *et al.*, 2009).

En México, los estudios sobre la presencia de las especies de *Fusarium* asociadas con algodón transgénico resistente a los insectos son escasos. La identificación de hongos fitopatógenos se ha basado tradicionalmente en la observación de caracteres morfológicos. Para superar los problemas asociados al método convencional de clasificación racial, se ha utilizado la variación natural presente en el DNA de cualquier especie. Así, el uso de técnicas basadas en el análisis de polimorfismos de los ácidos nucleicos ha revolucionado los aspectos de detección e identificación de organismos fitopatógenos y sus variantes patogénicas, y por consiguiente, el control y prevención de los mismos, dado su gran poder resolutivo y su aplicabilidad a una gran variedad de éstos (Martin *et al.*, 2000). Este tipo de técnicas también proporcionan información sobre las relaciones genéticas y la variabilidad entre, y dentro de, las diferentes razas de hongos fitopatógenos (Jiménez Gasco *et al.*, 2001).

Una necesidad fundamental para los fitopatólogos concierne a la correcta identificación y caracterización de la diversidad genética de las diferentes especies patogénicas, tanto con fines diagnósticos como para dilucidar su papel ecológico y epidemiológico. En las últimas décadas las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han tenido un gran impacto en la identificación rápida y fiable de hongos fitopatógenos facilitando el diagnóstico de enfermedades fúngicas, así como en ámbitos filogenéticos y taxonómicos (Enya *et al.*, 2008). Las regiones seleccionadas para la aplicación de estas técnicas moleculares son regiones universales del genoma que contienen regiones tanto conservadas como variables, permitiendo la discriminación entre distintas especies. La región espaciadora interna transcrita (ITS, por sus siglas en inglés: Internal transcribed spacer), es la región del ADN nuclear de hongos más utilizados en la identificación genética. Estas regiones de ADN mitocondrial y nuclear que se han utilizado tanto en estudios de filogenia como en taxonomía de hongos, son las que codifican para el ARN ribosómico (ADNr). El ADNr mitocondrial consta de dos genes, 16S y 23S, que se repiten en forma espaciada a lo largo de su genoma. Por el contrario, el ADNr nuclear tiene muchas copias, que se repiten en tándem y se trata de un sistema complejo que incluye los genes 18S, 28S y 5.8S ARNr. Las secuencias de estos genes están separadas por dos espaciadores internos que se transcriben, llamados ITS-1 e ITS-2 de una longitud entre 200 y 400 bases. Entre estos genes hay un espaciador intergénico que no transcribe, llamado IGS (non-transcribed intergenic spacer). Las zonas no codificantes del rADN nuclear (ITS-1, ITS-2 e IGS) son más susceptibles de acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en el estudio de la identificación y tipificación de especies fúngicas. El diseño de cebadores universales dentro de las zonas altamente conservadas de los genes rARN para PCR ha permitido amplificar las regiones ITS-1, ITS-2 e IGS en un amplio rango de organismos (Bogale *et al.*, 2007).

Haciendo uso de la información proporcionada sobre los diferentes métodos de identificación, el objetivo de esta investigación fue aislar e identificar molecularmente las especies de *Fusarium* presentes en plantas de algodón transgénico resistente a los insectos cultivados en el Valle de Mexicali utilizando un enfoque filogenético.

2.4 Material y Métodos

2.4.1 Selección de sitios de muestreo

Durante la realización de prospecciones fitopatológicas sobre incidencia y distribución de la fusariosis vascular en parcelas comerciales de algodón transgénico en el Valle de Mexicali, B. C., se observó la ocurrencia en dichas parcelas de plantas afectadas por un síndrome similar al de fusariosis. Así, las plantas afectadas mostraron síntomas de marchitamiento y hasta la presencia de plantas muertas. De las plantas sintomáticas se muestrearon fragmentos de la parte alta del tallo principal y se utilizaron para realizar aislamientos en medio de cultivo. Asimismo, se tomó muestra de suelo proveniente de la rizósfera de las plantas. Los tejidos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio (NaOCl al 2%, 1.5 min), se cortaron en fragmentos de 5 mm de longitud, se colocaron en PDA incubándose durante 7 días a $25\pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 12-h luz. Las muestras de suelo, así como plantas de algodón transgénico resistente al ataque por insectos en el Valle de Mexicali, B.C. se obtuvieron de tres sitios diferentes durante el periodo de agosto-noviembre de 2013 (figura 3).



Figura 3. Coordenadas de los 3 sitios de muestreo de suelo y plantas de algodón transgénico del Valle de Mexicali, B.C

La observación de los aislamientos mostró el crecimiento de un hongo morfológicamente similar al hongo fitopatógeno *Fusarium*, observando el crecimiento en parte de la raíz de la planta, por lo tanto, a partir de esas muestras se aislaron con el fin de obtener cultivos puros. Por otra parte, se tomaron 100 g del suelo de la rizósfera adherida a las raíces de algodón transgénico resistente a los insectos, se colocaron en bolsas de plástico esterilizadas y se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, para su posterior aislamiento e identificación.

2.4.2 Aislamiento de cepas de hongos en cultivo de algodón transgénico

Una muestra de diez gramos de suelo de la rizósfera se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 90 mL de agua destilada estéril y se agitó (100 rpm) durante 15 min. A continuación, se hicieron diluciones seriadas y alícuotas de 0.1 mL y se extendieron sobre placas que contenían medio PDA (Papa Dextrosa Agar). Las placas de PDA se incubaron durante 7 días a 30 °C y se aislaron colonias morfológicamente diferentes que aparecieron en el medio y se sub-cultivaron en medio agar Nährstoffarmer Spezieller (SNA) (anexo 1) (Nirenberg, 1976) para la identificación morfológica y su posterior análisis. De igual manera se realizó el aislamiento de hongos por medio de la técnica de crecimiento de cámara húmeda.

2.4.3 Identificación morfológica de las cepas fúngicas aisladas

Las cepas aisladas fueron identificadas taxonómicamente con base en la velocidad de crecimiento, características como color de la colonia, tipo de conidia, textura del micelio, presencia de exudados, así como la presencia de olor (Leslie y Sumrell, 2006).

2.4.4 Caracterización molecular de las cepas fúngicas aisladas

El ADN genómico de las cepas de hongos se extrajo utilizando el método de González-Mendoza *et al.* (2010), con ligeras modificaciones como la ruptura celular por medio de

perlas de vidrio. Los aislados se cultivaron en un medio mínimo de sales Kirk (anexo 2) a 28 °C durante 7 días. Se añadió en tubos eppendorf con 5 perlas de cristal aproximadamente 200 mg de micelio y 450 µL de buffer de extracción (0.5mM EDTA, 0.01mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM de NaCl, 3% SDS) se puso en vórtex durante 5 minutos para posteriormente añadirle 150 µL de acetato de sodio 3M a pH 5.2 y se incubó por 10 min a -20 °C, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, al sobrenadante se le añadió un volumen igual de isopropanol frío y se centrifugó a las mismas condiciones. El pellet se lavó con etanol y se resuspendió en 30 µL de agua DEPC. Todas las cepas de *Fusarium* spp. fueron identificadas mediante reacciones de PCR por medio de primer específicos para el marcador molecular ITS, los cuales fueron ITS5 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y el primer ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). La mezcla de reacción se preparó en un volumen total de 30 µL que contenía 3 µL de buffer 10X, 2.5 µL de MgSO₄, 2 µL de cada primer (ITS4 y 5), 1µL de DNA, 1µL de dNTP's y 0.3 µL de la enzima Taq. La reacción se realizó en un termociclador Multigenes, Labnet usando las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos, 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, y una temperatura de hibridación a 55.5 °C durante 30 segundos con una extensión a 72 °C durante 30 segundos y la extensión final a 72 °C durante 7 min seguido de enfriamiento a 4 °C.

La calidad de las reacciones de PCR se realizó en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (1X) (40 mM Tris-acetato y EDTA 1 mM) y las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Las imágenes fueron capturadas y almacenadas con el sistema de imágenes digitales Multidoc-It (UVP). Los productos de PCR fueron purificados usando el kit 'Purelink® PCR Purificación' (Invitrogen) y la secuenciación se llevó a cabo en el Genewiz Lab en New Jersey en Estados Unidos de América, para lo cual se enviaron las muestras correspondientes.

Las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos del GenBank, se realizó una búsqueda mediante análisis BLAST frente a las secuencias obtenidas de la base de datos GenBank. Para el análisis filogenético, las secuencias obtenidas se editaron y se alinearon junto con secuencias homólogas representativas obtenidas de las bases de

datos GenBank, utilizando el paquete informático MEGA 7.0. Posteriormente, se generó un árbol filogenético empleando el método de Máxima-Parsimonia (MP) utilizando el paquete informático MEGA 7.0.

2.4.5 Diseño experimental

Para la realización del ensayo se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados de cinética de crecimiento fueron analizados utilizando el programa informático NCSS versión 2007. Los efectos de las diversas pruebas realizadas se determinaron mediante la aplicación del análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y separación de medias (método de Tukey, $p \leq 0.05$) de los datos. Los datos para la realización del árbol filogenético se realizaron mediante el modelo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic*), el cual procede por agrupación de las secuencias que presentan la menor distancia genética, mediante el programa MEGA 7.0.

2.5 Resultados y Discusión

2.5.1 Aislamiento de diferentes especies de hongos en la rizósfera de cultivo de algodón transgénico.

Mediante la técnica de dilución en serie se logró el aislamiento de cuatro cepas con características diferentes en cada una de ellas, se realizó un cultivo húmedo con tejidos del tallo y raíz (figura 4) para el aislamiento del hongo presente en dicho cultivo, por lo que se procedió a la caracterización morfológica y molecular de cada uno de los distintos microorganismos encontrados.

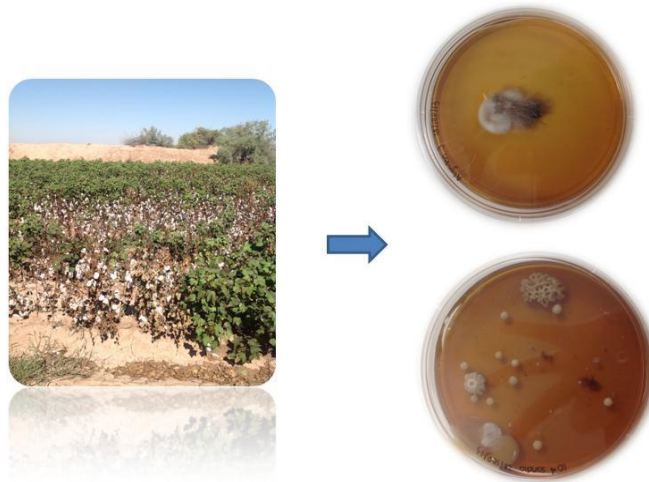


Figura 4. Aislamiento de suelo por técnica de dilución en serie proveniente de la rizósfera de cultivo de algodón transgénico del Valle de Mexicali, así como un cultivo de tallo de planta de algodón transgénico.

En la enfermedad de marchitamiento comúnmente se presenta una necrosis de color marrón oscuro. Inicialmente se empieza a observar a un lado del tallo y avanza hasta redondearlo completamente, estrangulando el hipocotilo al nivel del suelo, lo que produce la muerte de la planta al bloquearse el flujo de agua y nutrientes hacia las hojas. Cuando se presenta en plantas de mayor edad, las lesiones se manifiestan como hendiduras, de borde definido y color oscuro y las plantas permanecen erguidas pero se marchitan y mueren (Corpoica, 2005). Se ha reportado que la mayoría de las veces los síntomas aparecen en la época de floración y en la zona basal de la planta. Los tallos toman un color pardo (casi negro) y las hojas se tornan amarillentas, luego se caen y la planta muere. En corte longitudinal y transversal de tallos y raíces, se aprecia una coloración negra o castaña en los haces vasculares, en forma de corona y en ocasiones se puede ver el crecimiento del micelio del hongo (Corpoica, 2005).

El hongo *Fusarium* tiene la capacidad de atacar un gran número de plantas de importancia agrícola y ocasiona principalmente marchitamientos vasculares, seguidos de la muerte de la planta (Nelson, 1981). Algunas especies pueden ocasionar también pudrición de la corona y de las raíces de algunas plantas (Farr *et al.*, 1989).

2.5.2 Descripción morfológica de las distintas cepas de *Fusarium*

Una especie fúngica puede ser descrita por varios conceptos o valores que la hacen diferenciarse del resto, en nuestro estudio, el género *Fusarium*, la morfología, experimentos de entrecruzamiento o los datos moleculares, o la integración de dos o tres de estos aspectos pueden derivar de la identificación de las diferentes especies (Yli-Mattila *et al.*, 2002). En el medio de cultivo PDA, las colonias presentaron un diámetro entre los 5 y 7 cm durante un periodo de incubación de 9 días (figura 5). No existió diferencia significativa al tercer día de medición, sin embargo, para el sexto día después de la inoculación las cepas de T-ICA08 y T-ICA01 no existió diferencia significativa entre ellas, pero si con los demás tratamientos y testigo. El día 9 posterior a la inoculación se presentó el mismo comportamiento, para terminar el día 12 con la ultima medición en donde las cepas T-ICA04 y T-ICA03 no presentaron diferencias significativas entre ellas, pero si con respecto a las demás cepas y testigo (anexo3).

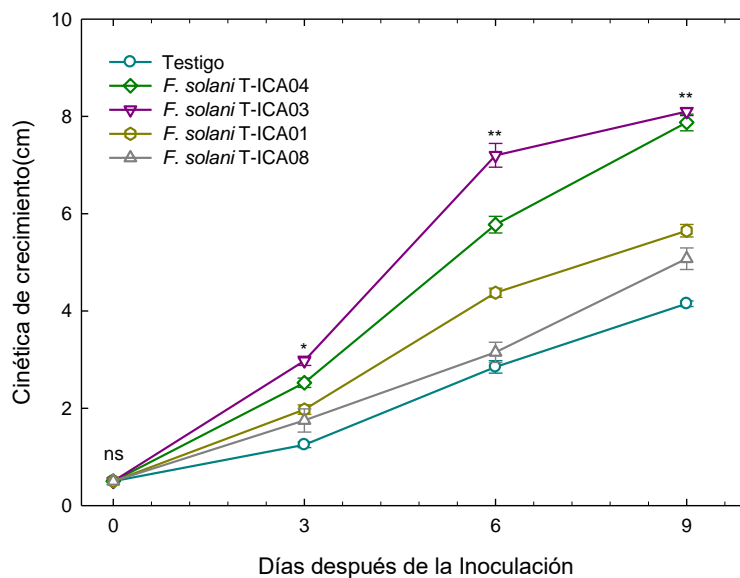


Figura 5. Cinética de crecimiento de las cuatro cepas aisladas de la rizósfera de plantas de algodón transgénico en el Valle de Mexicali. Cada símbolo representa la media de 4 determinaciones independientes \pm error estándar (ns, no significativo; *, significativo; **, altamente significativo).

Las cuatro cepas aisladas (T-ICA01, T-ICA03, T-ICA04 y T-ICA08) presentaron diferente tipo de micelio, las cepas T-ICA08 y T-ICA01 presentaron un micelio algodonoso, ambas inodoras difiriendo en la producción de exudados de la cepa T-ICA01, mientras que la cepa T-ICA03 presentó un micelio aterciopelado inodoro y con la presencia de exudados la cepa T-ICA04 presentó una textura compacta, sin olor y con presencia de exudados, al igual que se presenta el modelo de cinética de crecimiento (anexo 4) de las cuatro cepas de *F. solani* (cuadro1), donde ambas ecuaciones para las cuatro cepas se ajustan a un comportamiento logístico con valores promedio de 0.9980 de r, lo que nos indican que dichos modelos podrían ayudarnos a la predicción de las cinéticas de crecimiento de las cepas de *F. solani*. Los bordes de crecimiento fueron irregulares, mostrando diferencia de colores conforme pasaban los días de crecimiento.

Cuadro 1. Características morfológicas representativas de las cuatro cepas aisladas de la rizósfera de algodón transgénico en el Valle de Mexicali.

CEPA	COLOR	TEXTURA	OLOR	PRODUCCIÓN EXUDADOS	CINÉTICA CRECIMIENTO	MODELO DE CINÉTICA
T-ICA01	Blanco-violeta	Algodonosa	No	Si	Moderado	$y=a/(1+b*exp(-cx))$
T-ICA03	Blanquesino-rosado	Aterciopelado	No	Si	Rápido	$y=a/(1+b*exp(-cx))$
T-ICA04	Blanco-violeta	Compacta	No	Si	Rápido	$y=a/(1+b*exp(-cx))$
T-ICA08	Banco-rosado	Algodonosa	No	No	Lento	$y=a/(1+b*exp(-cx))$

La presencia de color en las cepas de *Fusarium* es dependiendo de la especie que sea y las características de adaptación de la misma, en este caso las cepas presentaron diferente tipo de coloración, la cepa T-ICA08 y T-ICA03 presentaron un color que iba de blanco a rosado, mientras que las cepas T-ICA01 y T-ICA04 presentaron un color de blanco a violeta, esto es posiblemente a la producción de metabolitos secundarios (figura 6).

Fusarium crece dando una colonia blanca la cual produce un pigmento que gradualmente se difunde en el medio. El micelio está formado por hifas septadas y los conidióforos presentan racimos de macroconidios. Se observan también clamidosporas y microconidios (Guzmán, 1977). Estas características son similares a lo ya reportado por Herrera *et al.* (2011) donde observaron que la colonia de *F. solani* en medio de cultivo PDA presentaba micelio algodonoso, de color crema-naranja; sin embargo, se observó en sucesivos reaislamientos cambios de coloración (blanco, blanco-amarillo, crema).

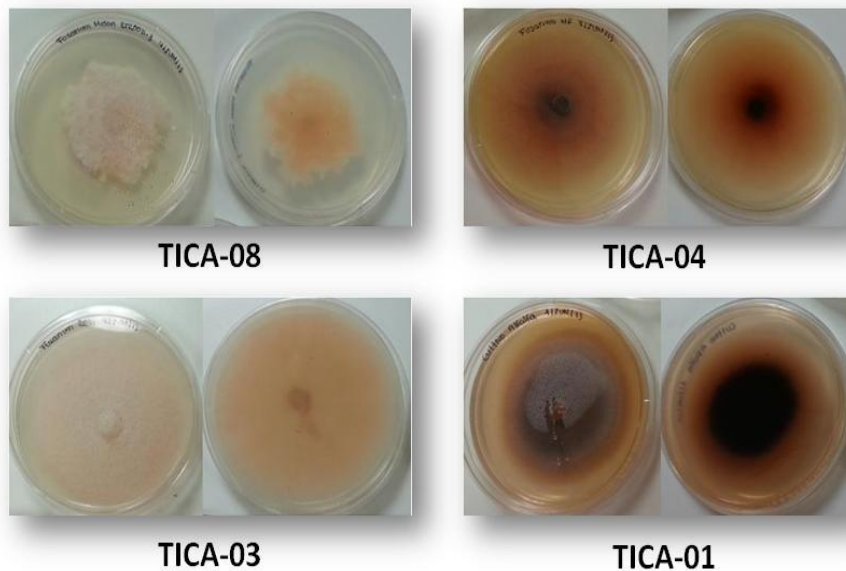


Figura 6. Visualización de las diferentes características de color de las cuatro cepas aisladas de la rizósfera de algodón transgénico en el Valle de Mexicali, B.C.

En cuanto a las características de las conidias en nuestras cepas se presentaron la misma morfología de conidias, en donde la forma fue de media luna con un total de 0 a 2 septo, 3-9 μm de largo por 2-4 μm de ancho, de forma ovoide producidos en conidióforos largos. Se observaron pocos macroconidios, estructuras largas, septadas, en forma de media luna o de canoa, con una dimensión de 10-45 μm por 2-5 μm , con 1-4 septos y clamidosporas (figura 7), estas características son similares a las reportadas por Montealegre *et al.* (2003) quienes reportan valores cercanos a los tamaños de cada una de los diferentes tipos de conidias de *F. solani*.



Figura 7. Diferentes estructuras del hongo *F. solani* (1pixel es igual a 0.3626 mm)

La identificación basada en la morfología presenta en ocasiones un importante grado de dificultad, sobre todo para distinguir especies cercanas o altamente isogénicas, con características fenotípicas muy similares. La identificación por métodos moleculares es una opción para confirmar la identidad de estos hongos y resolver dudas sobre la taxonomía de los mismos (Unda *et al.*, 2011).

2.5.3 Caracterización molecular de las distintas cepas de *Fusarium solani*

La buena calidad de las muestras de DNA genómico, es de suma importancia para su análisis posterior. En la evaluación del DNA obtenido a partir del micelio del hongo, éste resultó íntegro, (con una relación de absorbancia a 260/280 de 1.93) es decir sin degradar, observándose como una banda bien definida al observarse en gel de agarosa. Una vez establecida la integridad del DNA, se llevó a cabo la amplificación de las secuencias ITS por medio de PCR, presentando los resultados obtenidos en la figura 8. Se utilizaron los primers ITS 5 y 4 con los cuales se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 550 pb, que es el tamaño esperado cuando se utilizan estos iniciadores. Una forma rápida y eficaz de identificar los hongos es analizar la secuencia de regiones de DNA específicas (Seifert *et al.*, 2007) por medio de la unidad ribosomal 5.8S flanqueada por sus espaciadores (ITS1-5.8S-ITS4). Esta información, junto con las

características morfológicas constituye la base de la identificación y clasificación taxonómica del hongo.

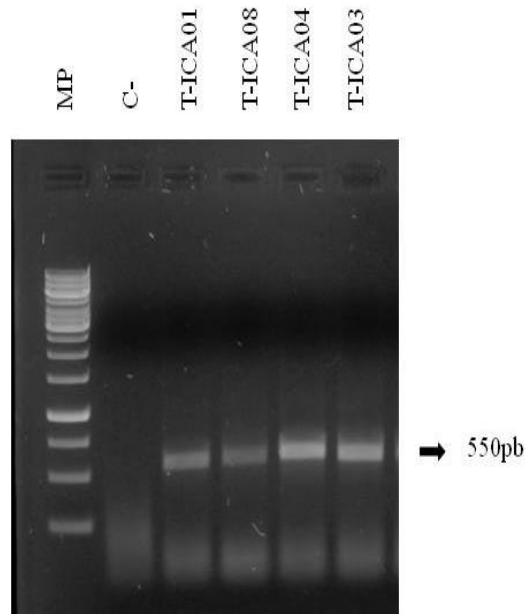


Figura 8. Productos de PCR obtenidos de las 4 cepas aisladas de la rizósfera de algodón transgénico del Valle de Mexicali. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: control negativo; carril 3-6: cepas aisladas de la rizósfera de algodón transgénico.

Las secuencias de ITS amplificadas (anexo 5) fueron comparadas con otras depositadas en el banco de datos del GenBank con el fin de identificar genéticamente al hongo *F. solani*. Las secuencias obtenidas, confirmaron la identidad del hongo, mostrando un alto grado de homología al ser comparadas con otras del GenBank.

Las relaciones evolutivas fueron deducidas usando el método UPGMA (El método de Pares No Ponderados Utilizando Media Aritmética), donde se muestra que la suma de longitud del árbol es de 22.89. El árbol es dibujado para escalar, utilizando longitudes de rama en las mismas unidades que eran usados para evaluar las distancias evolutivas que solían deducir un árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de compuesto de probabilidad máximo y están en las unidades del número de sustituciones bajas por sitio. El análisis implicó 10 secuencias de nucleótidos. El árbol filogenético se construyó con 4 secuencias obtenidas en el presente trabajo de *F. solani*

y 6 secuencias de hongos depositadas en el GenBank (anexo 6), las cuales fueron seleccionadas por presentar altos niveles de homología con las secuencias obtenidas en el estudio. El análisis filogenético permitió identificar a las cepas de *F. solani* T-ICA04, T-ICA01 y T-ICA03 en un grupo y a la cepa de *F. solani* T-ICA08 en otro. Las cepas de *F. solani* T-ICA04, T-ICA01 y T-ICA03 fueron colocadas por separadas en subgrupos cada una (figura 9).

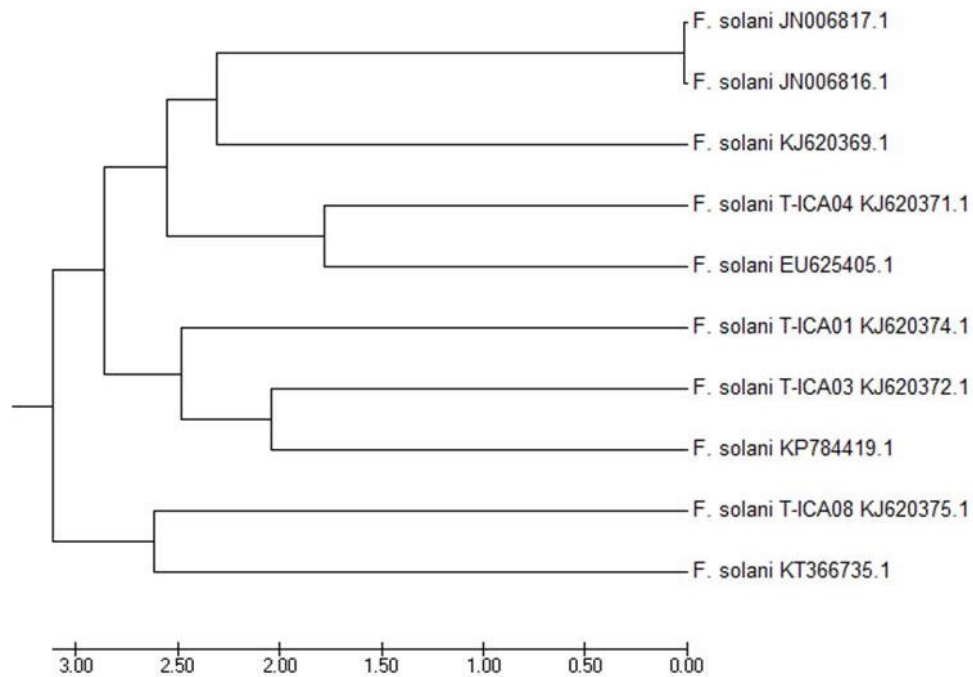


Figura 9. Árbol filogenético basado en secuencias ITS del rDNA de aislamientos de hongos obtenidos de la rizósfera de algodón y de secuencias de referencia del GenBank.

2.6 Conclusiones

El agente causal de esta enfermedad de marchitez en plantas de algodón transgénico es causado por *F. solani*, el cual es un hongo que tiende a penetrar los tejidos de la planta por heridas y causa la propagación del mismo dentro ocasionando la muerte de la planta. Se logró la identificación de cuatro cepas que presentan diferente descripción morfológica y que su relación filogenética las divide en tres grupos diferentes, sin embargo, sería

necesario analizar mediante primers mas específicos y selectivos para ver si pertenecen a diferentes subespecies o diferentes patotipos cada una de las cuatro cepas identificadas, aunque los resultados de identificación en forma general son para la especie *F. solani*.

2.7 Literatura citada

Abd-Elsalam K. 2003. Non-gel based techniques for plant pathogen genotyping. *Acta Microbiol Polon.* 52:329-341.

Abd-Elsalam K., Asran-Amal A. and El-Samawaty A. 2007. Isolation of high quality DNA from cotton and its fungal pathogens. *J Plant Dis Prot.* 114:113-116.

Abo-Elyousr K. and El-Hendawy H. 2008. Integration of *Pseudomonas fluorescens* and acibenzolar-S-methyl to control bacterial spot disease of tomato. *Crop Protection.* 27:1118-1124.

Unda F., Agüero J., Fariñas M. y Martínez M. 2011. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29: 282–285.

Nelson P. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En M.E. Mace, A.A. Bell and e.H. Beckman (eds.). *Fungal wilt diseases of plants.* Academic Press. New York. 51-80.

Farr D., Bills G., Chamuris G. and Rossman A. 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States.* American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota.

AGBIOS. 2013. [Http://www.agbios.com/dbase.php](http://www.agbios.com/dbase.php)

Betz F., Hammond B. and Fuchs R. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 32:156-173.

Bogale M., Wingfield B., Wingfield M. and Steenkamp E. 2007. Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. FEMS Microbiol Lett. 271:1:27-32.

Booth C. 1970. *Fusarium oxysporum* CMI descriptions of plant pathogenic fungi and bacteria. Common wealth Agricultural Bureaux. London. 211.

Bosland P. 1988. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. Advances in plant pathology.6: 281- 289.

Chimbekujwo I. 2000. Frequency and pathogenicity of *fusarium* wilts (*Fusarium solani* and *Fusarium equiseti*) of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Adamawa in Nigeria. Rev Biol Trop. 48:1-5.

Corpoica. 2005. Módulos 1 y 3 del Tutorial: “El Algodonero, Manejo Integrado del Cultivo en Colombia”. Ibagué: ConalgodonFFA-Minagricultura-Corpoica. 215.

Enya J., Togawa M., Takeuchi T., Yoshida S., Yoshida S., Tsushima A., Arie T. and Sakai T. 2008. Biological and phylogenetic characterization of *Fusarium oxysporum* complex, which causes yellows on *Brassica* spp., and proposal of *F. oxysporum* f. sp. *rapae*, a novel forma specialis pathogenic on *B. rapa* in Japan. Phytopathology. 98:475–483.

González-Mendoza D., Argumedo-Delira R., Morales-Trejo A., Herrera-Pulido A., Cervantes-Díaz L., Grimaldo-Juarez O. and Alarcon A. 2010. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. Genet Mol Res. 9:162-166.

Guzmán M. 1977. Micología médica. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 386.

Herrera Parra E., Bacab Pérez I., Alejo Jairo C., Tun Suárez J. y Ruiz Sanchez E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (mart.) sacc. y *Alternaria alternata* (fries) keissler en *thevetia peruviana* (pers.) k. schum. y su control in vitro. Fitosanidad. 1: 4: 231-236.

Jiménez-Gasco M., Pérez-Artés E. and Jiménez-Díaz R. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). European Journal of Plant Pathology. 107:237–48.

Karademir A., Aydemir C. and Yenidoğan S. 2011. Sound absorption and print density properties of recycled sheets made from waste paper and agricultural plant fibres. *African Journal of Agricultural Research*.6:28: 6073-6081.

Lelie J. and Summerell B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing, Ames, Iowa, U.S.A. pag. 5-12.

Li X., Liu B., Heia S., Liu D., Han Z., Zhou K., Cui J., Luo J. and Zheng Y. 2009. The effect of root exudates from two transgenic insect-resistant cotton lines on the growth of *Fusarium oxysporum*. *Trangenic Res.* 18:757-767.

Martin S., Grimwood P. and Morris R. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23:649–711.

Mendez-Trujillo V., Moreno-Ramírez L., Carrillo-Beltrán M. and González-Mendoza D. 2013. Fast Protocol for DNA Isolation of DNA from Bacterial Isolated from a Hyper-arid Environment. *J Pure Appl Microbio.* 7:2713-2716.

Montealegre J., Donoso S., Herrera P. y Besoain X. 2003. Identificación de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. como agente causal de la podredumbre del pie de tomate. *Boletín Micológico.* 18: 53-55.

Nirenberg H. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische differenzierung in der *Fusarium* section Liseola. *Mitteilungen aus der biologischen bundesantsalt dur land-und forstwirtschaft.* Berlin-Dahlem.169:1-117.

Seifert K., Samson R., Dewaar R., Houbraken J., Lévesque C., Monclavo J., Louis S. and Hebert P. 2007. Prospect for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*104:3901-3906.

Terán-Vargas A., Rodríguez J., Blanco C., Martínez-Carrillo J., Cibrián-Tovar J., Sánchez-Arroyo H., Rodríguez-Del-Bosque L. and Stanley D. 2005. Bollgard cotton and resistance of tobacco budworm (Lepidoptera: *Noctuidae*) to conventional insecticides in the Southern Tamaulipas, Mexico. *J Econ Entomol.* 98:2203-2209.

Vargas-Bejarano E., Méndez-Trujillo V., Vázquez Angulo J., González-Mendoza D. y Grimaldo Juárez O. 2012. Cambios fisiológicos en algodón transgénico inoculado con *Trichoderma* spp. *Phyton-Int J Exp Bot.* 81:101-105.

Wang K, Tang D., Wang M., Lu J., Liu J., Qian B., Gong Z., Wang X., Chen J., Gu M. and Cheng Z. 2009. MER3 is required for normal meiotic crossover formation, but not for presynaptic alignment in rice. *J Cell Sci.* 122:12:2055-63.

Yli-Mattila T., Paavanen-Huhtala S., Bulat S., Alekhina I. and Nirenberg H. 2002. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex-a polyphasic approach. *Mycological Research.* 106: 655-669.

CAPÍTULO III.

PATOGENICIDAD DE *F. solani* EN EL PROCESO DE GERMINACIÓN EN SEMILLAS Y PLANTAS DE ALGODÓN TRANSGÉNICO.

3.1 Resumen

La producción de cultivo de algodón en el Valle de Mexicali se ve afectada principalmente por enfermedades que causan marchitez y pudrición de la raíz, las cuales son asociadas principalmente a especies del hongo *Fusarium* spp. Estos patógenos ocasionan raíces con lesiones lineales, puntiformes de color rojizo o café rojizo, causando una disminución en el transporte de agua y nutrientes de la planta, dando como consecuencia la muerte de la misma. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la inoculación con 4 cepas de *F. solani* en el porcentaje de germinación en semillas de algodón transgénico, así como la severidad tanto en semillas como en plántulas de algodón transgénico Bollargd. Se evaluó el porcentaje de germinación en semilla las cuales fueron inoculadas con las cepas de *F. solani*, observándose un porcentaje de inhibición del 30% y 10% en la germinación de las semillas inoculadas con *F. solani* T-ICA03 y T-ICA08, respectivamente. Por otra parte, se evaluó el porcentaje de severidad por la escala de Adorada donde la cepa T-ICA03 mostró el 90% de porcentaje de severidad, así como mayor número de puntos de infección (9) para T-ICA03; mientras que el valor menor de puntos de infección se observó en la cepa T-ICA08, con 3 puntos. Las raíces y semillas inoculadas con las cepas presentaron síntomas de marchitamiento por *Fusarium* en mayor o menor proporción. Se determinó la eficiencia fotosintética e índice de verdor en plántulas observando cambios significativos ($P \leq 0.05$) entre las cepas inoculadas y el control. Estos resultados sugieren que la cepa de *F. solani* T-ICA03 presenta mayores niveles de patogenicidad comparada con las otras tres cepas y el testigo. Las cuatro cepas evaluadas presentaron ser patogénicas para las semillas y plántulas de algodón transgénico, sin embargo, la cepa de *F. solani* T-ICA08 fue la que presentó menor porcentaje de patogenicidad.

Palabras clave: *Fusarium*, severidad, patogenicidad, algodón, eficiencia fotosintética.

3.2 Abstract

The production of cotton cultivation in the Mexicali Valley is primarily affected by diseases that cause wilt and root rot, which are mainly associated with species of the fungus *Fusarium* spp. These pathogens cause roots with, pinpoint red or reddish brown, linear lesions causing a decrease in the transport of water and nutrients from the plant, giving resulted in the death of it. This study aims to evaluate the effect of inoculation with four strains of *F. solani* in the germination percentage of transgenic cotton seeds and severity in both seeds and seedlings of transgenic cotton Bollargd. The germination percentage seed which were inoculated with strains of *F. solani*, showing a percent inhibition of 30% and 10% in the germination of seeds inoculated with *F. solani* was evaluated ICA03 and T-T-ICA08, respectively. Moreover, the percentage of severity was evaluated by the scale of Adorada where T-ICA03 strain showed 90% of severity percentage and most points of infection (9) T-ICA03; while the lowest point value of infection was observed in strain T-ICA08, with 3 points. The roots and seeds inoculated with strains showed symptoms of *Fusarium* wilt greater or lesser extent. photosynthetic efficiency and greenness index seedlings observing significant changes ($P \leq 0.05$) between the inoculated and control strains was determined. These results suggest that strain *F. solani* T-ICA03 presents higher levels of pathogenicity compared to the other three strains and the control. The four strains tested showed to be pathogenic for seeds and seedlings of transgenic cotton, however, the strain of *F. solani* T-ICA08 was the one with less poercentage pathogenicity.

Keywords: *Fusarium*, severity, pathogenicity, cotton, photosynthetic efficiency.

3.3 Introducción

Las plagas y agentes patógenos de los cultivos, han causado grandes pérdidas económicas y humanas a lo largo de la historia. Las enfermedades causadas por hongos son una de las causas más importantes de pérdidas en cultivos de algodón. Entre los agentes fúngicos que las producen se desatacan aquellos que lesionan directamente el sistema radicular, invadiendo en ocasiones hasta el cuello de la planta o actúan segregando toxinas que alteran la permeabilidad de la membrana celular tales, en donde dentro de estos agentes patógenos encontramos al hongo fitopatógeno *Fusarium* (Lozano, 2008).

La incidencia, el porcentaje de severidad de la pudrición de raíz y los daños que ocasiona, son distintos entre los diferentes tipos de cultivo, así como del patógeno causante de la enfermedad (Fuch *et al.*, 1997). Esta variabilidad en la severidad, sintomatología y daños, resulta de los efectos directos o indirectos de las condiciones del suelo, del ambiente, del número y tipo de patógenos presentes y activos durante la enfermedad bajo condiciones específicas (Abawi y Pastor-Corrales, 1990). El hongo fitopatógeno *Fusarium* spp., produce lesiones lineales puntiformes de color rojizo o café en las raíces, también pueden presentar manchas café rojizas sin forma definida; los haces vasculares de la raíz presentan manchas rojas y sufren obstrucción al flujo de nutrientes y agua, ocasionando que las raíces se agrieten (Pérez *et al.*, 2005). *Fusarium* spp. puede penetrar en las raíces a través de heridas y continúan hacia el xilema o por los tejidos conductores de agua. La infección del patógeno es activada solamente cuando las raíces de la planta huésped entran en contacto con el micelio o clamidosporas las cuales entonces, invaden las células radicales causando la enfermedad. Esta infección depende de factores como el tiempo de la infección inicial, la virulencia y condiciones climáticas, en donde dependiendo de la tasa de velocidad de infección, el hongo puede ocasionar pudrición radicular y muerte, incluso en plantas muy jóvenes (Agrios, 2002). La enfermedad que causa *Fusarium* es un marchitamiento debido a la presencia y actividad del patógeno en los tejidos vasculares xilemáticos de las plantas; en pocas semanas el patógeno puede ocasionar la muerte de las plantas y de sus órganos que se localizan arriba del punto del

invasión vascular en la mayoría de las plantas anuales y algunas perennes, aunque algunas plantas de este último grupo no mueren sino hasta después de varios años a partir del momento en que fueron infectadas por el hongo (Agrios, 2002).

Fusarium puede reducir fuertemente el rendimiento en campo donde la incidencia de este hongo es alta. Éste sobrevive por muchos años en el suelo, la enfermedad es favorecida por climas cálidos y suelos con textura arenosa. En regiones templadas es muy severo en cultivos desarrollados bajo condiciones de invernadero. Los daños se presentan con mayor severidad cuando la planta es sometida a periodos de estrés en la etapa de floración y fructificación (Fischer *et al.*, 2005).

Con el fin de establecer la patogenicidad de *Fusarium solani* en plantas de algodón transgénico, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inoculación con cuatro cepas de *F. solani* en el porcentaje de germinación en semillas, así como la severidad tanto en semillas como en plántulas de algodón transgénico Bollgard.

3.4 Material y Métodos

3.4.1 Pruebas de germinación de plántulas de algodón transgénico

Se colocaron 10 semillas de algodón transgénico Bollgard en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 5 min para desinfectarlas, posteriormente se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril con el fin de eliminar el fungicida presente en la semilla. Una vez desinfectadas las semillas estas se sumergieron por 30 min en una solución que contenía 1×10^7 esporas·mL⁻¹ de cada una de las cepas de *Fusarium solani* T-ICA01, T-ICA03, T-ICA04 y T-ICA08 en 30% de glucosa con el fin de que las esporas se queden impregnadas en la semilla.

Las semillas fueron secadas en una campana de flujo laminar Lumistell LV-120 y posteriormente sembradas en medio SNA. Las semillas se incubaron a una temperatura de 28 °C y un fotoperiodo de 12:12 (luz/oscuridad) durante 4 días.

Una vez terminado el periodo de tiempo se procedió a contabilizar el porcentaje de germinación para cada una de las cepas evaluadas, así como el porcentaje de severidad reportado por Adorada *et al.* (2000).

3.4.2 Pruebas de patogenicidad, porcentaje de severidad en plántulas de algodón inoculadas con *F. solani*.

Con el fin de evaluar si las diferentes cepas aisladas estaban en estado patogénico y si la planta de algodón era susceptible a las diferentes cepas de *F. solani* se realizaron pruebas de patogenicidad en donde el inóculo usado fueron cuatro cepas de *F. solani* (T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03 y T-ICA08). Se preparó una suspensión que contenían 1×10^7 esporas/mL con 30% de glucosa, las cuales fueron contabilizadas por un contador de células automático TC22 (Biorad), (Biorad). Las raíces de las plántulas de algodón transgénico fueron sumergidas en la suspensión por 30 min con el fin de que las esporas de las cepas de *F. solani* se adhirieran a la raíz (figura 10).

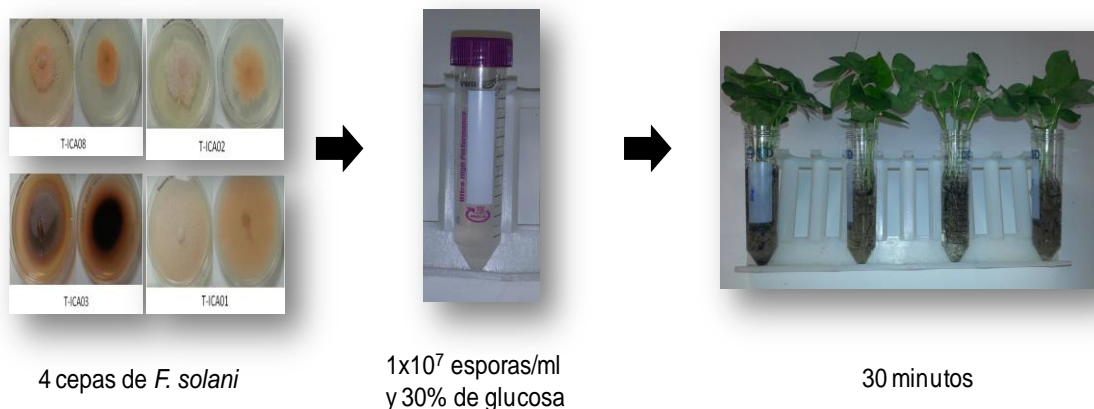


Figura 10. Diagrama de flujo de la inoculación de las 4 cepas de *F. solani* en plantas de algodón transgénico Bollgard.

Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad en las plántulas de algodón transgénico Bollgard, usando la escala propuesta por Adorada *et al.* (2000), con pequeñas modificaciones las cuales se basan principalmente en la longitud de la raíz afectada con necrosamiento en relación con la longitud total de la raíz (cuadro 2). Se realizaron 5 evaluaciones a los 0, 3, 6, 9 y 12 días, después de la inoculación con el patógeno. Colocando un total de 6 plantas por medición.

Cuadro 2. Valores correspondientes a los diferentes porcentajes de lesión presentes en las plántulas.

Valor escala	% de lesión
0	Sin lesión
1	Inicio de lesión
2	1 al 5% de lesión
3	6 al 25% de lesión
4	26 al 50% de lesión
5	51 al 60% de lesión
6	61 al 70% de lesión
7	71 al 80% de lesión
8	81 al 90% de lesión
9	91% de lesión o muerte

La severidad de la enfermedad (SE) se expresó como porcentaje de la altura total de la planta, de acuerdo con la fórmula propuesta por Adorada *et al.* (2000):

$$\text{Severidad} = \frac{\text{Suma de los valores de la enfermedad}}{(\text{Número total de valores} * \text{Valor máximo de la enfermedad})} * 100$$

3.4.3 *Determinación de la eficiencia fotosintética e índice de verdor en plántulas de algodón transgénico inoculadas con F. solani.*

Se determinó el índice de verdor en hojas completamente extendidas por medio de un clorofilómetro Spad 502 plus (Minolta). Del mismo modo se determinó la eficiencia fotosintética en un fluorómetro portátil Chlorophyll Fluorometer OS-30p (OPTI-SCIENCE, USA) usando una intensidad de luz actínica de $2100 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad por un período de 2 s se obtuvo la eficiencia fotosintética en 4 plantas por tratamiento, previamente aclimatadas a oscuridad por 2 minutos con pinzas de exclusión de luz para dilatar los centros de reacción. Se realizaron 3 mediciones por planta para cada cepa aislada tomándose las lecturas a los días 0, 3, 6, 9 y 12 posteriores a la inoculación con las cepas de *F. solani* (González *et al.*, 2008).

3.4.4 *Determinación de la arquitectura radicular y puntos de infección de F. solani en plántulas de algodón transgénico.*

La arquitectura de las plántulas de algodón transgénico Bollgard fue evaluada contabilizando el número de raíces (1er, 2do y 3er orden). Así mismo se contabilizaron los puntos de infección del patógeno realizándose las evaluaciones a los días 0, 3, 6, 9 y 12 posteriores a la inoculación con las diferentes cepas de *F. solani* (Norman *et al.*, 1996).

3.4.5 *Diseño experimental*

Se utilizó un diseño completamente al azar para los datos de eficiencia fotosintética e índice de verdor con 4 repeticiones para cada medición, se analizó un análisis de varianza (ANOVA) y los datos fueron comparados con una prueba de Tukey ($P \leq 0.5$) en el paquete estadístico NCSS versión 2007. Las gráficas fueron elaboradas en el paquete Sigma Plot 10.0.

3.5 Resultados y Discusión

3.5.1 Efecto de *F. solani* en germinación de semilla de algodón transgénico

En los ensayos de patogenicidad sobre semillas de algodón transgénico Bollgard, se pueden observar diferentes daños causados por las 4 cepas estudiadas (figura 11). Los resultados mostraron que *F. solani* T-ICA03, inhibió la germinación causando pudrición de la semilla, en donde, se observó el crecimiento de micelio sobre la cutícula y planta (Figura 11d). En el caso de la cepa de *F. solani* TICA-04, esta mostró un menor crecimiento de micelio sobre la cutícula. Sin embargo, inhibió la germinación en un 30% de las semillas y se observó poco desarrollo de la plántula (Figura 11c). En el caso de las cepas *F. solani* T-ICA08 y T-ICA01, éstas mostraron mínimos efectos sobre la germinación, 10 y 20% de inhibición sobre las semillas, y no hubo crecimiento de micelio sobre la cutícula (Figura 11a y 11b). Además se observó la formación de hojas en las plántulas en comparación con las semillas inoculadas con las demás cepas de *F. solani*.

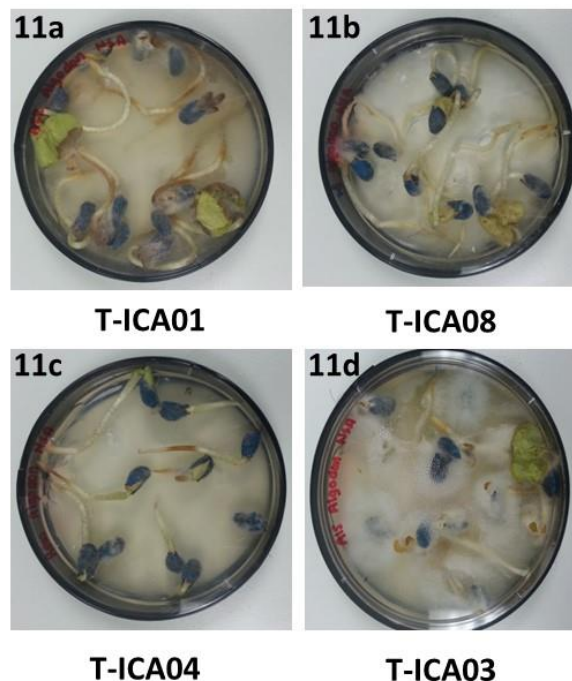


Figura 11. Pruebas de patogenicidad en el proceso de germinación de semillas de algodón transgénico Bollgard inoculadas con cuatro cepas de *F. solani*.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Morales *et al.*, (2007), donde evaluaron en maíz los daños que ocasiona *Fusarium* en el proceso de germinación encontrando que en semilla, el micelio puede invadir y ocasionar manchas en las cubiertas externas, causando además disminución de la germinación por la muerte del embrión.

3.5.2 Porcentaje de severidad en plántulas de algodón transgénico inoculadas con *F. solani*.

Una vez que transcurrieron 12 días desde la inoculación, la sintomatología presente en las plantas fue un necrosamiento en el tejido radicular, observándose un mayor porcentaje de severidad del patógeno en las plántulas inoculadas con la cepa T-ICA03 con valores cercanos al 50% en comparación con las otras tres cepas en los cuales el necrosamiento presentado era mínimo (figura 12).

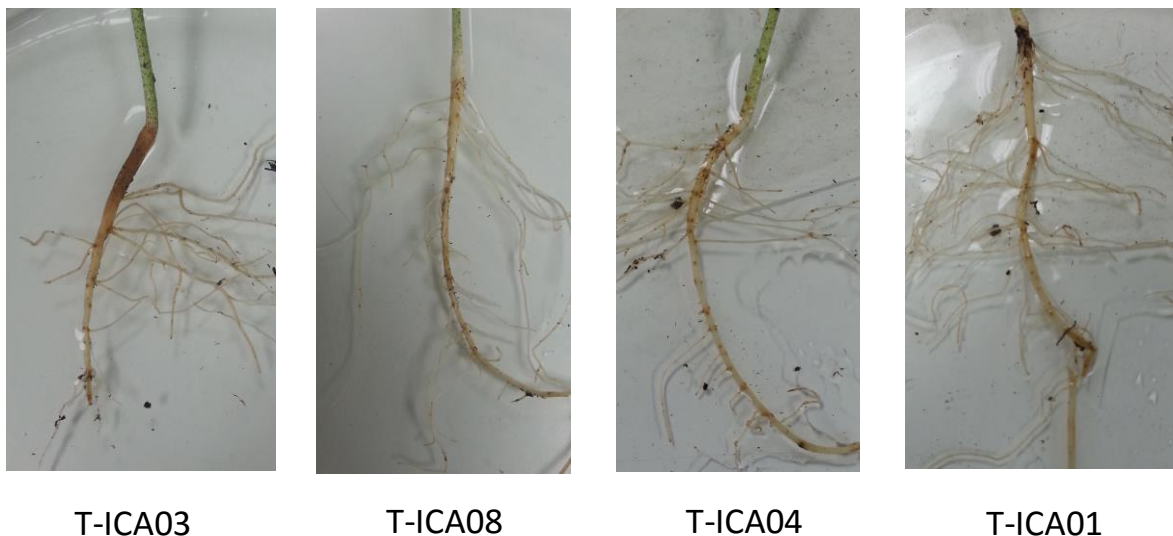


Figura 12. Sintomatología presente en plantas de algodón transgénico inoculadas con *F. solani* 12 días después de la inoculación.

Las raíces de las plantas inoculadas con las diferentes cepas de *F. solani*. presentaron lesiones provocadas por el hongo reduciendo la proliferación de raíces y especialmente, la formación de pelos absorbentes, dando como resultado un sistema radicular poco

profuso, menor área de contacto con las partículas del suelo y lógicamente, una menor capacidad de absorción de agua y nutrientes (Leslie *et al.*, 2005). Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las medias de los tratamientos en las evaluaciones correspondientes a los 0, 3, 6, 9 y 12 días después de inoculado el patógeno con respecto al porcentaje de severidad (figura 13). Los valores más altos de severidad (90%) se observaron con las cepas T-ICA03 y T-ICA01, ambas cepas siguieron la misma tendencia durante el tiempo evaluado. En cambio, la cepa T-ICA08 presentó el menor porcentaje de severidad con 40% a los 12 días posteriores a la inoculación (anexo7). Se ha visto que *Fusarium solani* ha sido reportado como el agente causal de la podredumbre de raíz y tallo en cultivo de tomate, en la cual esta infección causa una lesión necrótica de color pardo en el tejido cortical de la base que asciende en forma unilateral a lo largo del tallo, con la consecuente defoliación. También causa podredumbre en las raíces secundarias provocando que éstas se sequen (Herrera, 2005).

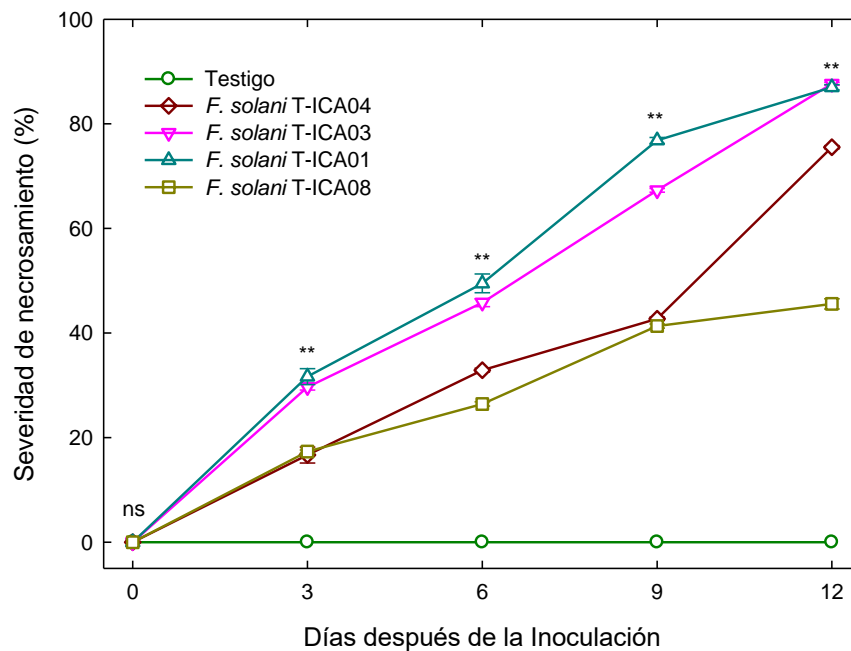


Figura 13. Porcentaje de severidad en plántulas de algodón transgénico Bollgard a los 3, 6, 9 y 12 días de inoculado el patógeno. Cada símbolo es la media de cuatro repeticiones \pm el error estándar (ns, no significativo; *, significativo; **, altamente significativo).

A los 6 días después de la inoculación, las raíces primarias y secundarias de las plantas inoculadas mostraron pequeños cambios en la coloración, así como puntos de infección marcados (figura 14). Las plantas control mostraron un mayor número de raíces tanto secundarias como terciarias, mientras que las raíces de las plantas de algodón inoculadas con las cuatro cepas de *F. solani* presentaron un menor número de raíces. Las raíces de las plantas inoculadas con la cepa de *F. solani* T-ICA03 mostraron un mayor número de puntos de infección que se veía reflejado en pequeños rompimientos de las raíces.

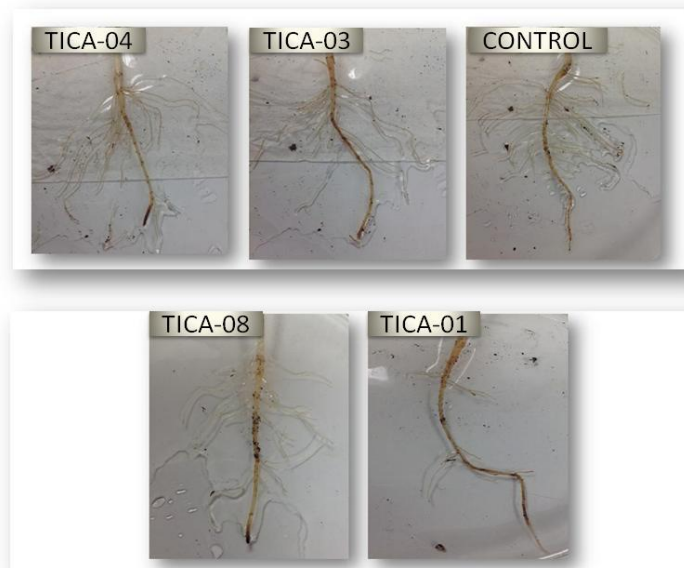


Figura 14. Síntomas de las cuatro cepas aisladas de *F. solani* en cultivo de algodón transgénico Bollgard.

Se ha visto que a nivel de plántula *F. solani* muestra manchas de color café en las raíces principales acompañada de fisuras longitudinales provocando que la epidermis de la raíz se desprenda con mayor facilidad (Giron, 1990), lo cual fue observado en el presente estudio.

Se observó que la cepa de *F. solani* T-ICA03 presentó un promedio de 9 puntos de infección en comparación con las demás cepas las cuales presentaron entre 4 y 5 puntos

de infección. Todas las cepas presentaron diferencias significativas con respecto al testigo (anexo 8), observando que conforme pasaban los días las plántulas de algodón presentaban un incremento en el número de puntos de infección (figura 15). Estos resultados se han observado en frijol en donde los síntomas iniciales de la pudrición de raíces por *Fusarium solani* en este caso f. sp. *phaseoli* son la presencia de estrías longitudinales rojizas en el hipocotilo y en la raíz primaria de las plántulas y conforme progresa la infección todo el sistema radicular puede cubrirse de lesiones café rojizas superficiales, presentándose en ocasiones fisuras haciendo la raíz hueca. Si la raíz primaria muere, la planta se observa marchita, achaparrada y con defoliación prematura (Abawi, 1989).

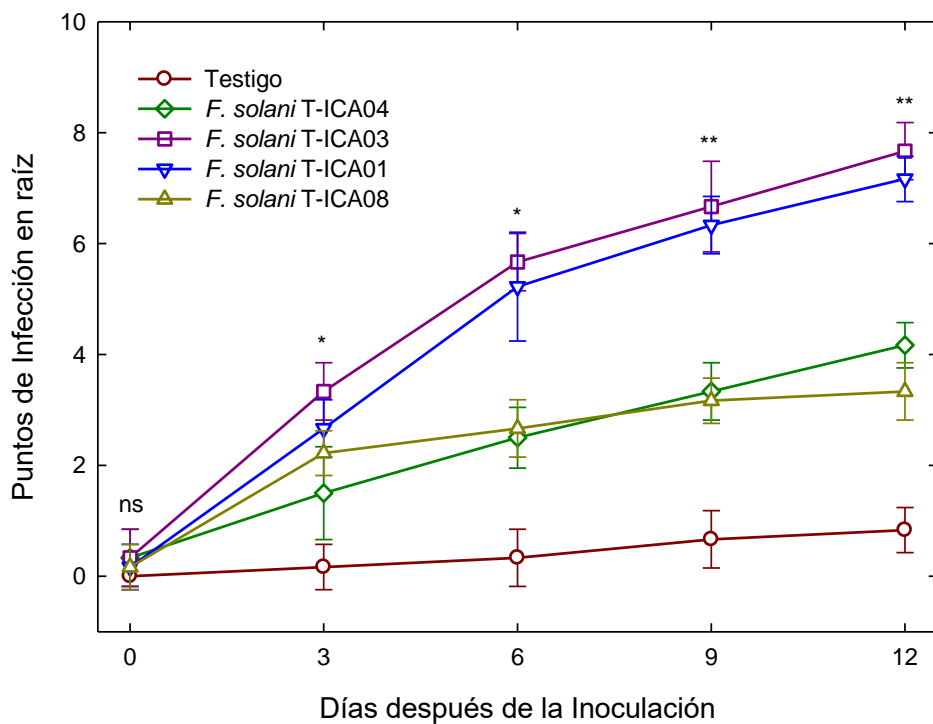


Figura 15. Puntos de Infección presentes en plántulas de algodón transgénico Bollgard a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de inoculado *F. solani*. Cada uno de los símbolos es la media de cuatro repeticiones \pm el error estándar (ns, no significativo; *, significativo; **, altamente significativo).

Es importante mencionar que, aunque *F. solani* ingresa a la planta a través de la raíz produciendo lesiones, el crecimiento del patógeno continua principalmente hacia el interior de la planta, permitiendo, que el sistema radicular siga manteniendo el mismo tamaño y características durante la mayor parte del período de incubación (Tello y Lacasa, 1988). Sin embargo, llega un momento en el cual el conjunto de procesos alternativos que enfrenta la planta (disminución de la tasa fotosintética, obstrucción de vasos xilemáticos, toxinas elicidadas por el hongo, fotorespiración incrementada, presencia de especies reactivas de oxígeno, etc.) terminan por afectarla por completo, incluyendo también el sistema de raíces, ante lo cual hay que resaltar que esto sucede en etapas tardías del proceso (Lushchak, 2011).

3.5.3 Cambios en la eficiencia fotosintética e índice de verdor en plántulas de algodón transgénico inoculadas con *F. solani*

En la mayoría de los casos de estrés, los procesos fotosintéticos se ven alterados de forma significativa (Pociecha *et al.*, 2008). En la figura 16 se muestra la eficiencia fotosintética de las plantas inoculadas con las diferentes cepas de *F. solani* con respecto al testigo, en donde se puede observar que hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) con respecto al testigo (anexo 9). Las plantas inoculadas con la cepa T-ICA 03 presentaron una clara reducción en la eficiencia fotosintética, en donde la disminución fue de 0.78 hasta 0.64 del primer día hasta el día 12 después de la inoculación. Esto puede explicarse debido a que se ha reportado que ante un ataque fúngico de tipo vascular, se produce una disminución en las tasas de asimilación fotosintética ligado a un descenso en el contenido de agua foliar como consecuencia de la baja absorción de agua producida por la presencia del hongo dentro del sistema vascular (Chekali *et al.*, 2011).

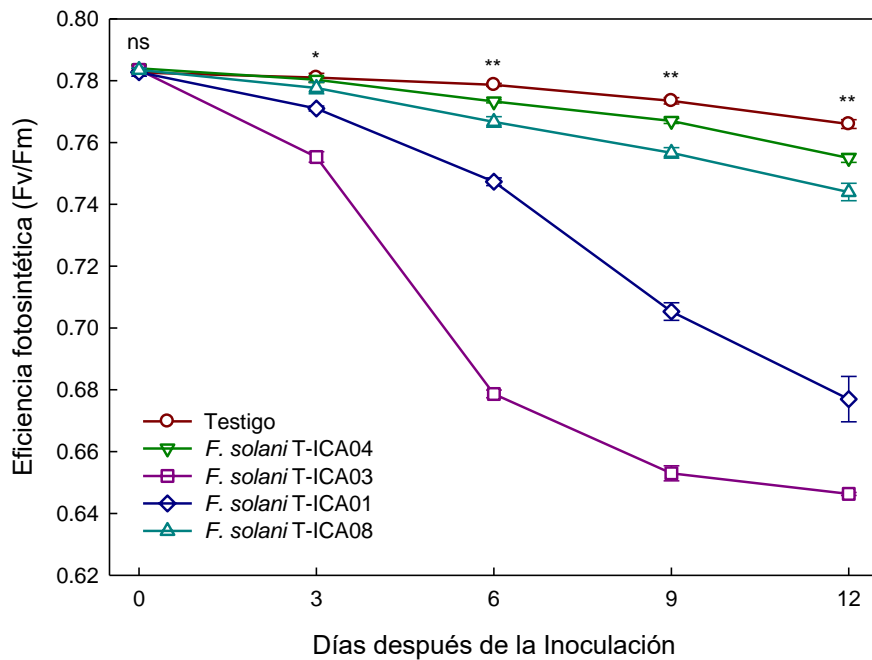


Figura 16. Eficiencia fotoquímica del Fotosistema II en plántulas de algodón transgénico Bollgard inoculadas y no con cuatro cepas de *F. solani* durante 12 días después de la inoculación, muestreo y un testigo. Cada uno de los símbolos es la media de cuatro repeticiones \pm el error estándar (ns, no significativo; *, significativo; **, altamente significativo).

Las plántulas inoculadas con *F. solani* muestran valores de Fv/Fm que empiezan a ser inferiores a 0.78 a partir del día 3 dpi presentándose diferencias significativas. Estos resultados nos indican que el parámetro de eficiencia fotosintética sirve como un indicador del efecto de un factor estresante para la planta, siendo en este caso por la presencia del hongo fitopatógeno (Chang-Hyo *et al.*, 2012).

En cuanto al índice de verdor los datos no muestran diferencia significativa con respecto al testigo para el primer día de medición, estos valores fueron disminuyendo mientras pasaba el tiempo, para que al tercer día de muestreo las plantas testigo, las inoculadas con la cepa de *F. solani* T-ICA01 y T-ICA04 no mostraron diferencias entre ellas manteniéndose así hasta el día 9 después de inoculado el patógeno, donde los valores

decaer para todas las plantas (figura 17). El día 12 de muestreo los valores mas bajos de índice de verdor fueron para las plantas inoculadas con la cepa T-ICA03 con valores cercanos a las 10 unidades SPAD, mostrando diferencias significativas ($P \leq 0.05$) con todos los demás tratamientos (anexo 10).

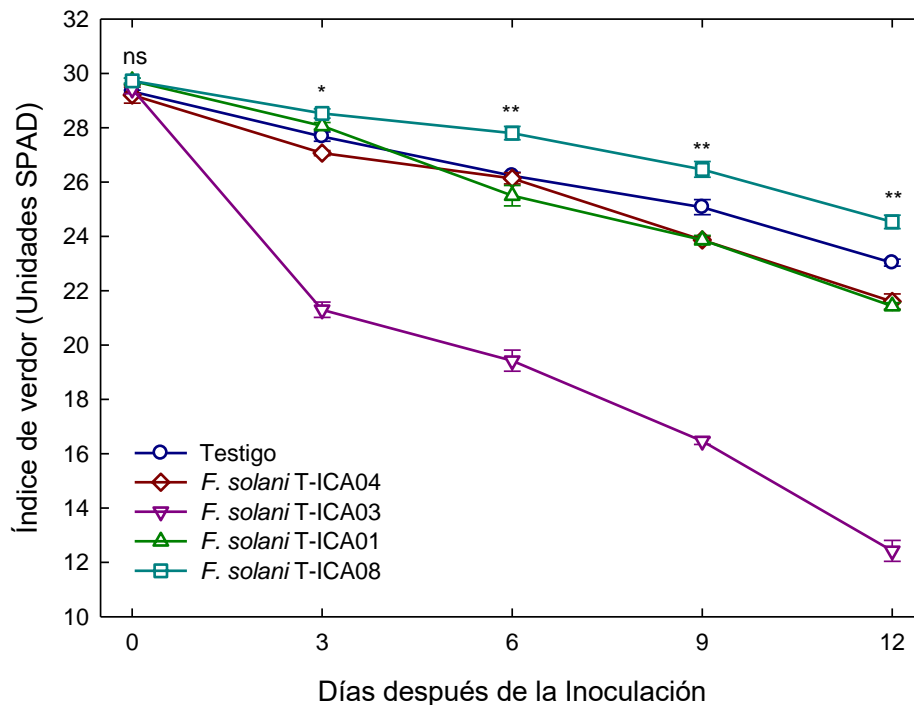


Figura 17. Comportamiento del índice de verdor para plántulas de algodón transgénico Bollgard inoculadas con cuatro cepas de *F. solani* para cada día de muestreo y un testigo. Cada uno de los símbolos es la media de 4 repeticiones \pm el error estándar (ns, no significativo; *, significativo; **, altamente significativo).

La exposición de la planta a condiciones desfavorables provoca un estrés oxidativo (Arbona *et al.*, 2008). El proceso de infección por fitopatógenos está modulado específicamente por las condiciones lumínicas de crecimiento de la planta (Karpinski *et al.*, 2003). Durante el fotoperiodo, en condiciones naturales, el cloroplasto ha de adaptarse a las altas y bajas intensidades lumínicas para optimizar el uso de la luz absorbida durante la fotosíntesis, mantener un estado energético óptimo, un correcto balance NADPH/ATP y minimizar la formación de especies reactivas de oxígeno que se derivan de estos procesos. Esto implica el establecimiento de un equilibrio entre los

llamados mecanismos fotoprotectores, que tratan de disipar la energía de excitación en exceso, no utilizable en fotosíntesis y los mecanismos fotoinhibidores que se activan cuando se excede la capacidad de fotoprotección y antioxidante de la planta (Arbona *et al.*, 2009).

3.6 Conclusiones

Los resultados de este capítulo indican que las plantas de algodón transgénico pueden ser dañadas considerablemente por las diferentes cepas aisladas de *F. solani*, sin embargo, se observó mayor severidad del daño en las raíces y semillas inoculadas con la cepa de *F. solani* T-ICA03, la cual causó mayores efectos en las plantas y semillas inoculadas en comparación con las otras tres cepas y el testigo. Por otra parte se observó que a los 12 días de inoculado el patógeno las plantas presentan síntomas de necrosamiento en raíz, así como puntos de infección marcados en raíz con respecto al testigo, de igual manera una disminución considerada en la eficiencia fotosintética e índice de verdor, esto puede deberse a que al hacer contacto el patógeno con las raíz este daña y va penetrando el tejido radicular provocando estas lesiones de necrosamiento en la raíz de la planta de algodón transgénico, además de que al haber una disminución en la eficiencia fotosintética e índice de verdor que es provocada cuando las hifas del patógeno crecen sobre el tejido vascular de la planta afectando el transporte de nutrientes y por consiguiente se ve afectado el aparato fotosintético de la planta.

3.7 Literatura citada

Chekali S., Gargouri S., Paulitz T., Nicol J., Rezgui M. and Nasraoui B. 2011. Effects of *Fusarium culmorum* and water stress on durum wheat in Tunisia. *Crop Protection* 30: 718-725.

Lushchak V. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C.* 153: 175–190.

Tello J. y Lacasa A. 1988. "La podredumbre del cuello y de las raíces", causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, nueva enfermedad en los cultivos de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) españoles. Bol. San. Veg. Plagas. 14: 307-312.

Abawi G. 1989. Root rots. In: Schwartz, H. F., and M. A. Pastor-Corrales (eds.). Bean production problems in the tropics. 2nd Ed. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 105-158

Leslie J., Zeller K., Lamprecht S., Rheeder J. and Marasas W. 2005. Toxicity, Pathogenicity, and Genetic Differentiation of Five Species of *Fusarium* from Sorghum and Millet. Phytopathology. 95: 275–283.

Chang-Hyo G., Suk-Min K., Seokchan K., Young-Joo K. and Hyeun-Jong B. 2012. Photosynthesis and Environments: Photoinhibition and Repair Mechanisms in Plants. Journal Plant Biology. 55: 93–101.

Morales–Rodríguez I., Yañez–Morales M., Silva–Rojas H., García–Santos G. and Guzmán–Peña D. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. Mycopathologia. 163:30–31.

Herrera R. 2005. Control biológico de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium solani* en tomates bajo invernaderos. Título para optar a Magíster en ciencias agronómicas. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile.

Abawi G. and Pastor-Corrales M. 1990. Root Rots of Beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research Methodologies, and Management Strategies. CIAT. Cali, Colombia. 114.

Adorada D., Biles C., Liddell C., Fernandez-Pavia S., Waugh K. and Waugh M. 2000. Disease development and enhanced susceptibility of wounded pepper roots to *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol.* 49:719–726.

Agrios G. 2002. *Fitopatología*. Segunda edición. Limusa. Grupo Noriega Editores. México. 425-431.

Arbona V., Hossain Z., López-Climent M., Pérez-Clemente R. and Gómez-Cadenas A. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to water logging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum.* 132: 452-66.

Arbona V., Iglesias D., Talón M. and Gómez-Cadenas A. 2009. Plant Phenotype Demarcation Using Nontargeted LC-MS and GC-MS Metabolite Profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57:16: 7338-7347.

Barrera J. y Gómez S. 1995. Determinación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthide* clavel en ocho 77 fincas del grupo Chía localizadas en la Sabana de Bogotá. Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá, Colombia. 57.

Fischer G., Miranda D., Piedrita W. y Romero J. 2005. Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva *Physalis peruviana* L. en Colombia. UNIBIBLOS. Universidad Nacional de Colombia, facultad de Agronomía. Primera edición. 1- 221.

Giron J. 1990. Diagnóstico de la Clorosis Típica en café In: Primer encuentro Regional de consulta sobre factores condicionantes de la marchitez lenta del cafeto. Mestepeque, Nicaragua. Memoria. IICA-PROMECAFE. 38.

Fuchs I., Moenne-Loccoz Y. and Defago G. 1997. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain F047 induces resistance to *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* 81: 492-496.

González M., Perales V. y Salcedo A. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev. Educación Bioquímica*. 27:4:119-129.

Karpinski S., Gabrys H., Mateo A., Karpinska B. and Mullineaux P. 2003. Light perception in plant disease defence signalling. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 390-396.

Lozano M. 2008. Manual del manejo preventivo de la Secadera (*Fusarium* sp) en el Cultivo de Maracuyá, Producción sostenible., Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, C.I. Nataima, (Huila). 1era Ed.

Medrano H., Bota J., Cifre J., Flexas J., Ribas-Carbó M. y Gulías J. 2007. Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*. 43:63–84.

Norman K., Polyn S., Detre G. and Haxby. 2006. Beyond mind-reading: multi-voxel pattern analysis of fMRI data. *Trends Cogn. Sci.* 10:424–430.

Pérez V., Yañez M., Alvarado R., Cibrian T. y García D. 2005. Hongos asociados a eucalipto. *Agrociencia*. 39: 311- 318.

Pociecha E., Koscielniak J. and Filek W. 2008. Effects of root flooding and stage of development on the growth and photosynthesis of field bean (*Vicia faba* L. *minor*). *Acta Physiol. Plant.* 30:529-535.

CAPÍTULO IV

EFECTO ANTAGÓNICO DE *Trichoderma* ICA-4 CON EL HONGO FITOPATÓGENO *F. solani*

4.1 Resumen

Fusarium solani es un hongo fitopatógeno que está relacionado a la marchitez del algodón, afectando su rendimiento y causando la muerte de la planta. Se han buscado diversas alternativas para el control de este hongo fitopatógeno, sin lograrlo hasta el momento, por lo que en este capítulo se plantea el objetivo de evaluar la capacidad antagonica y el mecanismo de acción de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4 sobre 3 cepas distintas de *F. solani* aisladas previamente de un cultivo de algodón. Se realizaron pruebas *in vitro* empleando la técnica de cultivo dual en caja petri con agar dextrosa de papa. Se evaluaron parámetros como la competencia por nutrientes y espacio, y micoparasitismo por medio de técnicas microscópicas durante un período de 7 días a 28 °C. Dos de las 3 cepas evaluadas con *Trichoderma* ICA-4 superaron en crecimiento a *F. solani* con diámetros de 6.5 cm y 7.2 cm en cultivo dual. Mientras que la cepa de *F. solani* T-ICA03 mostró una detención del crecimiento de *Trichoderma* ICA-4 sobre él. Por otra parte, se evaluó el mecanismo de acción que desempeña la cepa de *Trichoderma* ICA-4 sobre el control biológico de *F. solani*, observando que el microorganismo benéfico causó la lisis de las células del fitopatógeno, en comparación con otros mecanismos de acción de diferentes especies de *Trichoderma* los cuales tienden a provocar un estrangulamiento de la hifa del hongo fitopatógeno enrollándose sobre la misma. De esta manera el mecanismo que ejerce *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4 es provocando la lisis de las células de *F. solani*.

Palabras claves: Control biológico, *Fusarium solani*, mecanismo de acción, *Trichoderma*, micoparasitismo.

4.2 Abstract

Fusarium solani is a plant pathogenic fungus that is related to cotton wilt, affecting their performance and killing the plant. They have sought various alternatives for controlling the phytopathogenic fungus without success so far, so the objective in this chapter was evaluate the antagonistic capacity and mechanism of action of a strain of *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4 on three different strains of *F. solani*. *In vitro* tests using the technique of dual culture Petri dish with potato dextrose Agar was performed. Parameters as competition for space and nutrients and microscopic techniques micoparasitism medium were evaluated for a period of 7 days at 28° C. Two of the 3 strains evaluated to *Trichoderma* ICA-4 growth exceeded the radio to *F. solani* with 6.5 cm and 7.2 cm in dual culture, while the strain of *F. solani* T-ICA03 showed stunting to *Trichoderma* ICA-4. Moreover, the mechanism of action plays *Trichoderma* ICA-4 on biological control of *F. solani* was evaluated, noting that beneficial microorganism tends to cause lysis of the cells of the pathogen compared with other mechanisms of action of different *Trichodermas* which tend to cause a constriction of the phytopathogenic fungus hyphae winding thereon. Hereby the mechanism that there exercises *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4 is provoking the lisis of the cells of *F. solani*.

Keywords: Biological control, *Fusarium solani*, mechanism of action, *Trichoderma*, micoparasitism.

4.3 Introducción

Trichoderma spp. pertenece a la clase Deuteromycota (Hyphomycetes), caracterizada por formas miceliales que poseen esporas asexuales o conidias, que nacen de células conidiogénicas especializadas y no directamente de la hifa, por ejemplo de conidióforos, esterigmas ó vesículas, algunas de éstas libres o en forma micelial (Alatorre-Rosas, 2007). Las especies del género *Trichoderma* son consideradas organismos cosmopolitas de diversos medios de hábitats y muchas veces están asociados con raíces de plantas atribuyéndoles la diversa capacidad metabólica y la naturaleza competitiva que posee, haciéndolo un microorganismo de fácil adaptación (Harman *et al.*, 2004).

Este hongo ha sido estudiado a través de los años por la capacidad que tiene para atacar a diversos hongos, además de promover el crecimiento de la planta, la productividad y rendimiento de la planta, ayudando por otra parte a la supresión de enfermedades en diversos cultivos (Hjeljord y Tronsmo, 1998; Vinale *et al.*, 2007). Se ha observado la competencia efectiva por nutrientes en la superficie de semillas de algodón entre *Trichoderma* y *R. solani*, donde el antagonista termina por desplazar al fitopatógeno (Howell, 2003).

En cuanto al mecanismo que posee *Trichoderma* spp. para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos está en que primeramente detecta a su hospedante y crece hacia él, posteriormente activa la expresión secuencial de enzimas degradadoras de la pared celular (Harman *et al.*, 2004), donde estas enzimas catalizan la lisis de compuestos como quitina de la pared celular del hongo hospedero iniciando el ataque antes de que el patógeno haga contacto con la planta, así como también tiene la capacidad de producir compuestos con propiedad antimicrobiana (Brunner *et al.*, 2003).

Abordando un tema como el micoparasitismo este primeramente es definido como un proceso de simbiosis antagónica entre organismos, el cual implica un amplio complejo de enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas y glucanasas las cuales están encargadas de descomponer la pared celular del hongo hospedero (Lorito *et al.*, 1990).

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico (Carsolio *et al.*, 1999), que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno. Es por eso que es importante conocer el tipo de micoparasitismo que posee *Trichoderma* ICA-4 sobre el hongo *F. solani*, evaluando diversos factores como pruebas de antagonismo por cultivo dual, así mediante técnicas microscópicas para evaluar dichos parámetros.

4.4 Material y Métodos

4.4.1 Pruebas de antagonismo de Trichoderma ICA-4 con F. solani

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la UABC. La cepa de *Trichoderma* ICA-4 fue obtenida del mismo laboratorio donde se realizaron las evaluaciones, la cual corresponde a *Trichoderma longribraquiatum*. Las cepas de *F. solani* fueron provistas del experimento anterior clasificadas como *F. solani* T-ICA03, T-ICA01 y T-ICA04. Ambos fitopatógenos y antagonista fueron mantenidos por separado en cajas petri con PDA a 28 °C. Para evaluar el control biológico in vitro se realizaron pruebas de enfrentamiento empleando la técnica de cultivo dual en cajas petri, las cuales contenían aproximadamente 20 mL de agar dextrosa de papa. En un extremo de la caja se colocó un disco de agar de 8 mm con micelio de la cepa del hongo fitopatógeno, posteriormente se incubó durante dos días a 20 °C. Terminado este tiempo de incubación se colocó en el otro extremo un disco de agar de 8 mm con micelio del antagonista (*Trichoderma* ICA-4) y se incubaron durante siete días a 25±1 °C, 12 h continuas en luz, seguido de 12 h de oscuridad realizándose mediciones de diámetro cada 24 h (Howell, 2003).

Para evaluar el mecanismo de acción de *Trichoderma* sobre *F. solani*, se realizaron observaciones macroscópicas de los cultivos duales, tomándose como índice de micoparasitismo, el crecimiento del antagonista sobre la superficie del micelio patógeno, utilizando la escala reportada por Elías y Arcos (1984) (cuadro 3).

Cuadro 3. Escala para evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo), de acuerdo a la medida de la invasión de la superficie, colonización y esporulación (Elías y Arcos, 1984)

Grado	Capacidad Antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
1	Invasión de $\frac{1}{4}$ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de $\frac{1}{2}$ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella.

Para determinar el mecanismo de micoparasitismo se realizó un cultivo por la técnica de Ridell, la cual consistió en colocar sobre un portaobjetos un disco de agar de 1 cm de diámetro. En un extremo se inoculó al microorganismo antagonista y en el otro extremo al hongo fitopatógeno, se incubó a 25 °C por 24 horas. Se realizaron observaciones con ayuda de un microscopio binocular ZEISS con aumento de 100x, se fotografiaron las interacciones de las hifas del microorganismo antagonista con las del hongo fitopatógeno.

4.5 Resultados y Discusión

4.5.1 Efecto de *Trichoderma* ICA-4 sobre el crecimiento de *F. solani*

Para las pruebas de antagonismo en cultivo dual se confrontaron tres cepas de *F. solani* (T-ICA01, T-ICA03 y T-ICA04) contra la cepa de *T. longibrachiatum* ICA-4, en donde se pudo observar que al dar 48 h de ventaja a las cepas del patógeno estas no alcanzaron el diámetro alcanzado por la cepa de *T. longibrachiatum* ICA-4 (figura 16), por lo que éste presentó las tasas de crecimiento más altas. Asimismo, se evaluó el nivel de antagonismo mediante la escala de Elías y Arcos (1984) citada por Ezziyyani *et al.*, (2004), en donde la cepa de *F. solani* T-ICA03 mostró una disminución en el crecimiento de la cepa del antagonista, mientras que éste último invadió el crecimiento de las cepas de *F. solani* T-

ICA01 y T-ICA04. Los grados de la escala propuesta para cada cepa, así como el crecimiento del cultivo dual se presentan en la figura 18. Al hacer la comparación diaria del crecimiento antagonista (RCA), con el crecimiento del fitopatógeno (RCP) de cada cultivo dual, se determinó la competencia por nutrientes y espacio. Se pudo observar que la cepa de *T. longibrachiatum* ICA-4 presentó una velocidad de crecimiento superior a las de las tres cepas de *F. solani*. El diámetro final alcanzado de *T. longibrachiatum* ICA-4 fue aproximadamente de 6 cm, mientras que los diámetros finales de las cepas de *F. solani* fueron alrededor de 2 cm, aun con la ventaja de 48 h de incubación del patógeno. Por otra parte, es importante mencionar que *T. longibrachiatum* ICA-4 no pudo crecer sobre la superficie de la cepa de *F. solani* T-ICA03, lo que puede sugerir, que este microorganismo antagonista no posee capacidad de micoparasitar a este patógeno, pudiéndose deber a que la pared celular de esta cepa posee un mecanismo enzimático cubierto por una capa proteica que tiende a evitar la degradación de la misma por enzimas como quitinasas y β -1-3-glucanasas (Inbar y Chet, 1997). Sin embargo, es necesario investigar esta cepa con el fin de conocer cuál es el mecanismo de defensa de este fitopatógeno que evita el contacto con *T. longibrachiatum* ICA-4.

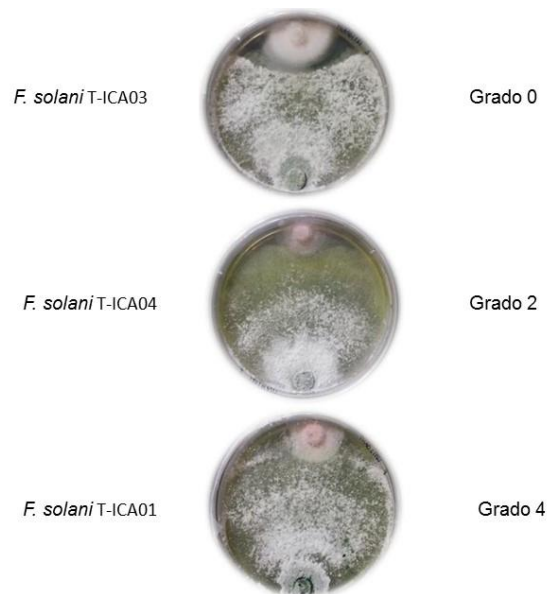


Figura 18. Inhibición del crecimiento micelial (PICR) en cultivos duales de las tres cepas de *F. solani* con *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4, así como el grado obtenido a partir de la escala de Elías y Arcos (1984).

Por otra parte, al realizar las observaciones al microscopio se pudo observar que *T. longibrachiatum* ICA-4 se adhieren a las hifas de *F. solani* mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos los cuales penetran el interior de la hifa causando el rompimiento de ésta (figura 19). Según Elad y Chet (1983), la adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno. Por otra parte, Adams (1990) planteó que el micoparasitismo termina con la pérdida del contenido citoplasmático de las células del patógeno, los cuales causan una disgregación y disminución en la actividad patogénica del mismo.

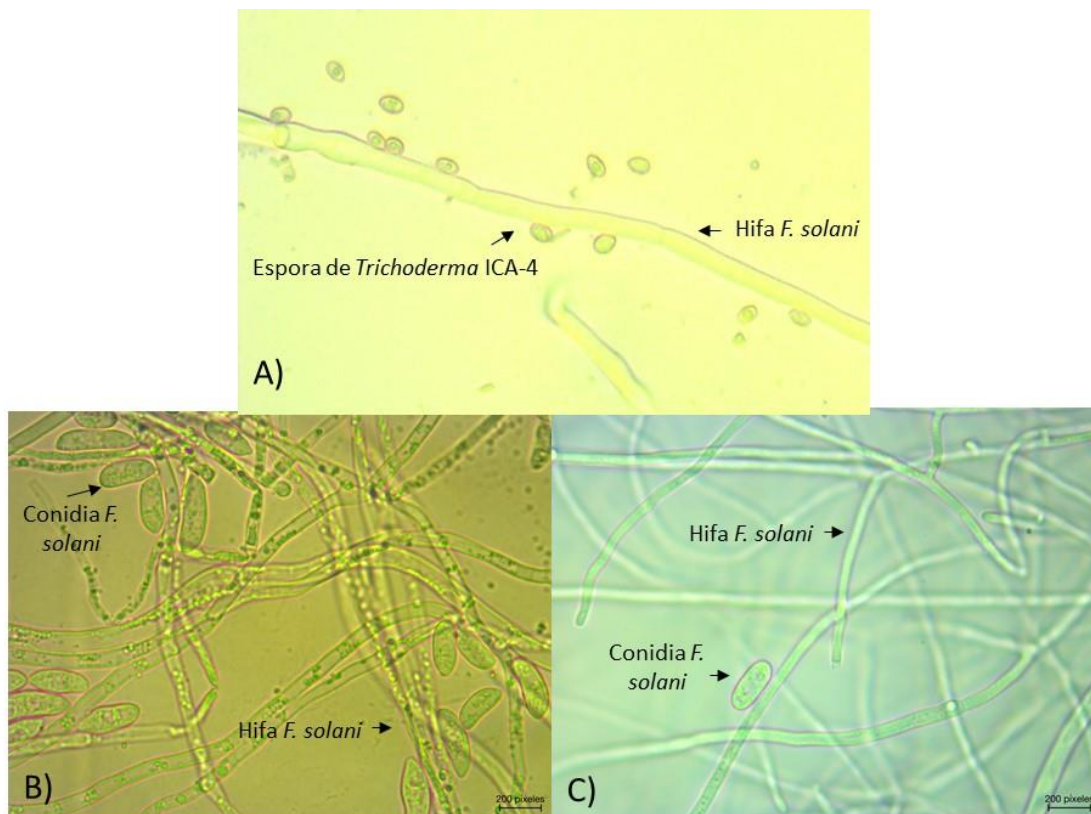


Figura 19. Micoparasitismo de *T. longibrachiatum* ICA-4 contra el hongo fitopatógeno *Fusarium solani*. (A) Esporas de *T. longibrachiatum* ICA-4 adhiriéndose a las hifas de *F. solani* (B) Las hifas de *F. solani* invadidas por las esporas de *T. longibrachiatum* ICA-4 (C) Hifa sin inocular de *F. solani*.

Lo anterior nos permite establecer que *Trichoderma* tiene un efecto controlador sobre *F. solani* reprimiendo el crecimiento del hongo, así como invadiendo las células del mismo causando la lisis. Por lo anterior, se sugiere que *T. longibrachiatum* ICA-4 puede llegar a ser un agente de biocontrol eficaz contra ciertas especies de hongos entre ellas encontramos a *F. solani*, ya sea aplicándose al suelo de forma preventiva con el fin de inducir en la planta la activación de mecanismos de defensa, estimular la colonización de la rizósfera de las plantas impidiendo el desarrollo de otros microorganismos que pueden llegar a ser patógenos para la planta, además de saber que este organismo es de fácil adaptación a las condiciones del suelo (Bernal *et al.*, 2000). Sin embargo, es necesario realizar estudios a nivel de invernadero o campo, para ver su efecto en condiciones no controladas.

4.6 Conclusiones

La cepa de *T. longibrachiatum* ICA-4 presenta un modo de acción favorable por competencia de espacio con las cepas de *F. solani* T-ICA01 y T-ICA04, superando el crecimiento del fitopatógeno, así como inhibiendo más del 75% su desarrollo. Se sugiere que *T. longibrachiatum* ICA-4 puede utilizarse como agente de biocontrol para estas cepas, el cual actúa lisando las células del fitopatógeno evitando así su crecimiento y desarrollo.

4.7 Literatura citada

Adams P. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:59-72.

Alatorre-Rosas R. 2007. Hongos entomopatógenos. In: Rodríguez B., L. A., y H. C. Arredondo B. (eds). *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México. 127-143.

Bernal A., Andréu C., Moya M., González M y Fernández O. 2000. Utilización de *Trichoderma* spp como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp cubense (e.f. Smith) Snyder & Hans.

Brunner K., Peterbauer C., Mach R., Lorito M., Zeilinger S. and Kubicek C. 2003. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current Genetics*. 43:289- 295.

Carsolio C., Benhamou N., Haran S., Cortés C., Gutierrez A., Chet I. and Herrera-Estrella A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Appl Environ Microbiol*. 65:929-935.

Elad Y. and Chet I. 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica*. 11: 55-58

Ezziyyani M., Pérez S., Requena M., Rubio L. y Candela M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. 26:69-78

Harman G., Howell C., Viterbo A. and Chet I. 2004. *Trichoderma* spp.-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review*. 2:43-56.

Hjeljord L. and Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). 2:131-151.

Howell C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87:1: 4-10.

Inbar J. and Chet. 1997. The role of recognition in the induction of specific chitinases of during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Microbiology. 141: 2823-2829.

Lorito M., Harman G., Prieto A. and Hayes C. 1990. Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. Phytopathol. 82:10:10-77.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalverti L., Marra R., Woo L. and Lorito M. 2007. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Elsevier. Soil Biology & Biochemistry. 40:1-10.

CAPÍTULO V.

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS E INDUCCIÓN DE ENZIMAS DE DEFENSA EN PLANTAS DE ALGODÓN TRANSGÉNICO PREINOCULADAS CON *Trichoderma* ICA-4 BAJO CONDICIONES DE CAMPO

5.1 Resumen

El cultivo de algodón es afectado por el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp. causando el marchitamiento de la planta y por consiguiente su muerte. Se han buscado alternativas para el control de este hongo fitopatógeno y los daños que causa, entre ellos está el uso de microorganismos como control biológico para reducir la incidencia y severidad de la enfermedad. Dentro de estos microorganismos se encuentra el hongo *Trichoderma* spp. el cual se sabe que actúa como agente inductor del mecanismo de defensa en plantas, por lo que el objetivo que se planteó en este capítulo es evaluar los cambios en el perfil de compuestos fenólicos así como la inducción de enzimas de defensa en plantas de algodón transgénico como respuesta a la preinoculación con *Trichoderma* ICA-4 a nivel campo. Como resultado obtuvimos que la pre inoculación de *Trichoderma* ICA-4 en plantas de algodón transgénico incrementa el contenido de ciertos ácidos fenólicos, así como de flavonoides, al ser comparados con el testigo. Por otra parte, se midió la actividad de dos enzimas de estrés oxidativo presentando cambios significativos, es decir que existió un aumento en la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), así como de la enzima peroxidasa (POD). También se evaluaron enzimas de defensa tales como quitinasas y glucanasas, encontrando diferencias significativas entre las plantas preinoculadas con *Trichoderma* y las plantas control. Esto sugiere que el hongo *Trichoderma* ICA-4 puede ser utilizado como un agente de biocontrol, actuando de manera preventiva sobre los cultivos de algodón transgénico, ya que tiene la capacidad de inducir e incrementar el contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides, así como de aumentar la actividad de las enzimas PAL, POD, quitinasa y glucanasas, confiriéndole protección a las plantas frente al ataque por fitopatógenos.

Palabras claves: Enzimas de estrés oxidativo, PAL, *Trichoderma*, Algodón, quitinasa y glucanasa.

5.2 Abstract

The cotton crop is affected by the phytopathogenic fungus *Fusarium* spp. causing wilting of the plant and therefore his death. They have sought alternatives for controlling the phytopathogenic fungus and the damage it causes, among them is the use of microorganisms as biological control to reduce the incidence and severity of disease. Within these microorganisms is the fungus *Trichoderma* spp. which it is known to act as inducing agent of the defense mechanism in plants, so the objective raised in this chapter is to assess changes in the profile of phenolic compounds as well as the induction of defense enzymes in plants transgenic cotton in response to the pre-inoculation with *Trichoderma* ICA-4 to field level. As a result, we obtained the pre inoculating *Trichoderma* ICA-4 in transgenic cotton plants increases the content of certain phenolic acids and flavonoids, when compared with the control. Moreover, the activity of two enzymes having significant changes oxidative stress, ie that there was an increase in enzyme activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and the peroxidase enzyme (POD) was measured. Defense enzymes such as chitinases and glucanases were also evaluated, finding significant differences between preinoculadas with *Trichoderma* plants and plants control. This followeth that the fungus *Trichoderma* ICA-4 can be used as a biocontrol agent, acting preventively on transgenic cotton crops, as it has the ability to induce and increase the phenolic content and flavonoids, as well as to increase the activity of PAL enzymes, POD, chitinase and glucanase, conferring protection to plants against attack by phytopathogenic.

Keywords: oxidative stress enzymes, PAL, *Trichoderma*, Cotton, chitinase and glucanase.

5.3 Introducción

La manifestación de las respuestas de las plantas frente a unas condiciones ambientales adversas implica la puesta en marcha de una secuencia compleja de acciones, en donde en primer lugar se produce la percepción por la planta del estímulo estresante, seguida del procesamiento de la señal de estrés percibida que implica tanto su amplificación como su integración en la ruta o rutas de transmisión de la información, y finalmente tiene lugar la regulación de la expresión génica (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Las condiciones adversas inducen cambios transitorios en los niveles de determinados iones como el calcio y moléculas como lípidos, especies reactivas de oxígeno, especies antioxidantes, óxido nítrico, entre otras que advierten a la célula de que ha sido detectada una señal de estrés (Toumi *et al.*, 2010).

Las plantas están expuestas a un gran número de fitopatógenos, sin embargo, a pesar de ser sésiles y de carecer de un sistema inmune, la muerte de las plantas por enfermedad es una situación excepcional (Whenham *et al.*, 1986). Ello hace pensar que han desarrollado sistemas de defensa altamente efectivos para detener o contrarrestar la infección. Estos mecanismos son de dos tipos: constitutivos e inducidos por la presencia del fitopatógeno. Éstos pueden ser además subdivididos en defensa estructural, basada en características anatómicas de la pared celular y defensa química, basado en compuestos biológicamente activos de altos o bajos pesos moleculares (Blanco-Labra y Aguirre, 2002).

Los mecanismos de defensa constitutivos actúan deteniendo la entrada de los patógenos en los tejidos de la planta, funcionando de forma constante por medio de estrategias químicas como la producción por parte de la planta de sustancias tóxicas como los alcaloides, fenoles, polifenoles, aceites esenciales entre otros, así como de la formación de barreras estructurales por medio del engrosamiento de la cutícula de los tejidos vegetales (Mauch-Mani y Slusarenko, 1996).

Por otra parte, al estar expuesta la planta al fitopatógeno el funcionamiento de las cadenas de transporte electrónico pueden sufrir alteraciones originando las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Halliwell, 1999). Las ERO dan lugar a reacciones de oxidación indeseadas por lo que las plantas han tenido que desarrollar defensas antioxidantes para balancear las especies reactivas de oxígeno cuando existe un desbalance producido por un patógeno (Sies, 1993). Estas especies reactivas de oxígeno puede provocar en las plantas la inhibición de enzimas que sean susceptibles al actuar con ellas, modificando ciertos aminoácidos y rompiendo las cadenas polipeptídicas. Por otra parte, estas también tienen la capacidad de degradar la clorofila, llevar a cabo la peroxidación de lípidos, la fragmentación del DNA entre otros problemas en la planta (Mano, 2002).

La planta ha desarrollado mecanismos de defensa antioxidantes a través de la activación de enzimas de estrés oxidativo como lo son peroxidasas (POD), catalasas (CAT), superóxido dismutasa (SOD) entre otras. En este capítulo se abordará a la enzima peroxidasa la cual desempeña un papel determinante en diversos procesos fisiológicos necesarios para el funcionamiento de las plantas, incluida la lignificación (Esteban-Carrasco *et al.*, 2001). La participación de esta enzima en los mecanismos de defensa ha sido ampliamente documentada para diversas especies (Loren-Kukula *et al.*, 2007). Entre los procesos que involucran la participación de la enzima están, la regulación hormonal, mecanismos de defensa, control de elongación celular, polimerización de extensina, entrecruzamiento de los polisacáridos de la pared celular, biosíntesis de lignina y procesos de suberización (Ayyappan *et al.*, 1996).

La planta tiene la capacidad de producir ciertos compuestos como mecanismos de defensa ante el estrés ocasionado por el patógeno, como lo es la producción de fitoalexinas las cuales son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, con propiedades antimicrobianas y se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos (Paxton, 1981). La producción de fitoalexinas se ha correlacionado con la resistencia a patógenos y se asocia con la inducción de una serie de genes que codifican para enzimas específicas responsables de su síntesis, entre las que se

encuentran la fenilalanina amonio liasa (PAL), la chalcona sintasa (CHS) y la chalcona isomerasa (CHI) (Cuypers *et al.*, 1988). Entre las fitoalexinas más estudiadas se encuentran aquellas derivadas del metabolismo de los fenilpropanoides que tienen como base el aminoácido fenilalanina.

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como resistencia inducida, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno (Collinge *et al.*, 1994). La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson, 1998).

El manejo de hongos fitopatógenos se puede lograr con un grupo de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos. Esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre estos microorganismos se encuentran algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, y hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma* (Fernández-Larrea, 2001), los cuales se han visto que les confieren protección a las semillas y plántulas contra el ataque de hongos fitopatógenos, entre los que se encuentra *Fusarium* (Corrêa *et al.*, 2007).

Entre los hongos más utilizados para control biológico está *Trichoderma* spp. por su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación. *Trichoderma* tiene efecto antagonista sobre hongos del suelo como *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium* spp., entre otros (Sempere y Santamarina, 2007). Se ha visto que el tratamiento con *Trichoderma* spp. en pepino, induce la defensa local y sistémica (Segarra *et al.*, 2007), lo cual ocurre también en cebolla (Guzmán, 2012) y otros cultivos agrícolas de importancia económica, tales como el algodón, el tabaco, lechuga, maíz, garbanzo y pimiento (De Meyer *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2008).

Hay tres clases de compuestos que se conoce que son producidos por las cepas de *Trichoderma* y que inducen resistencia en la planta. Los compuestos son proteínas con funciones enzimáticas (quitinasas, glucanasas), además de proteínas Avr codificadas por los genes de avirulencia y también existe la producción de oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular (Harman *et al.*, 2004). De éstas moléculas, las más importantes son las enzimas quitinasas y glucanasas las cuales se conoce que están involucradas en el control biológico de fitopatógenos. Con base en lo anterior, y debido a la gran variabilidad de especies del género *Trichoderma* y sus posibles efectos sobre diversos cultivos, así como las condiciones climáticas de donde se aísla, el objetivo de este capítulo fue evaluar los compuestos fenólicos, así como la inducción de enzimas de defensa en plantas de algodón transgénico inoculadas antes de su siembra con la cepa *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4.

5.4 Material y Métodos

Se inocularon semillas de algodón transgénico Bollgard con un inóculo ajustado de 1×10^8 esporas por ml de la cepa de *T. longibrachiatum* ICA-4, la cual estaba contenida en medio de cultivo adicionado con una solución adherente. Se inocularon las semillas y éstas fueron sembradas por medio de la maquinaria necesaria. Las coordenadas de ubicación del terreno fueron 32°63'43"-114°96'66" en el Ejido Vicente Guerrero, Mexicali, B. C. con una superficie de siembra de 7.4 ha. Las muestras se recolectaron una semana antes de aplicar el defoliante aplicando otra inoculación a los 56 días posteriores a la siembra mediante el agua de riego, se tomaron 10 plantas por tratamiento y éstas fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California para las posteriores mediciones.

5.4.1 Determinación de fenoles totales en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4.

Las muestras fueron analizadas en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. en Hermosillo, Sonora, México. Se preparó un extracto para la

evaluación del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de acuerdo al método descrito por Aparicio (2010). Las plantas secas se pusieron a secar a temperatura ambiente y se maceraron en un mortero hasta obtener un polvo fino, de donde se tomaron 0.25 g que se colocaron en un tubo Falcon y se les adicionó 5 mL de etanol, se homogenizaron por 2 minutos a velocidad media y el homogenizado se sonicó por 30 minutos. Al término se colectó el sobrenadante y se añadieron 5 ml de solución extractora (anexo 11) sonicando la muestra por 60 min a baja temperatura. Al término del sonicado se decantó y se mezclaron los dos sobrenadantes. Se dejó reposar por 2 horas y se tomó una alícuota, para posteriormente centrifugar a 13,000 rpm, utilizando el sobrenadante para las mediciones.

El contenido de compuestos fenólicos totales se evaluó de acuerdo al método reportado por Shohael *et al.*, (2006) con ligeras modificaciones. Se tomaron 40 μ L del extracto, y se les adicionaron 60 μ L de etanol, 400 μ L de agua desionizada, 5 mL de solución de NaOH 0.1N y 500 μ L del reactivo de Folín-Ciocalteu, se mezcló en un vórtex y se dejó reposar por 6 min. Posteriormente se añadieron 500 μ L de carbonato de sodio al 20%, se mezcló y se dejó reposar por 30 min. La absorbancia se leyó a 724 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic, modelo Genesys 2). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por gramo de peso seco (g PS). Los mE AG se calcularon con la ecuación de regresión que se obtuvo de la curva patrón construida a partir de concentraciones de 0 a 100 μ g de ácido gálico \cdot mL (anexo 12).

5.4.2 *Determinación de flavonoides totales en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4.*

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante el ensayo de Zhishen *et al.*, (1999). Para la determinación del contenido de flavonoides se realizaron dos mezclas, la mezcla A consistió en añadir 300 μ L de NaNO₂ al 5% y 4 mL de agua desionizada, mientras que la mezcla B consistió en 2 mL de NaOH al 1M y 2.4 mL de agua desionizada. Se pesaron 0.25 g de cada muestra en tubos falcon forrados con papel aluminio y se

adicionan 5 mL de metanol al 80% en completa oscuridad. Se agitaron las partículas de la muestra con ayuda de un sonicador “BRANSON modelo 2210”. Se tomó una alícuota en tubos eppendorf forrados con papel aluminio y se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 minutos. Se tomó 1 mL del extracto y posteriormente se le adicionó la mezcla A dejándola reposar por 5 min en total oscuridad. Se añadieron 300 μL de AlCl_3 al 10%, se reposó la mezcla por 1 min para terminar con la adición de la mezcla B, se agitó vigorosamente, y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro “HACH, modelo DR5000 UV-Vis” a una longitud de onda de 425 nm. Para cuantificar el contenido total de flavonoides en las muestras, se utilizó como estándar al flavonoide quercetina, con el que se construyó una curva patrón a concentraciones desde 0 hasta 100 μg de quercetina $\cdot\text{mL}^{-1}$ (anexo 13). Los resultados se reportaron como mg equivalentes de quercetina $\cdot\text{g}$ peso seco (mg EQ $\cdot\text{g}$ p.s.).

5.4.3 *Determinación de compuestos fenólicos por HPLC en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4.*

Para la extracción de ácidos fenólicos se pesaron 0.25 g de muestra en oscuridad y se añadieron 5 ml de metanol al 80% suplementado con 0.2 g $\cdot\text{L}^{-1}$ de hidroxianisol butilado (BHA). Se agitaron las partículas de la muestra durante 1 hora con ayuda de un sonicador “BRANSON modelo 2210”, agregándose hielo para evitar la degradación de los compuestos. Posteriormente se tomó una alícuota y se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 min a 4°C, para finalizar con el filtrado de la muestra a través de filtros Millipore de 13 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0.2 μm en viales de vidrio de 2 mL color ámbar. Para la determinación de los flavonoides se tomó una alícuota del sobrenadante obtenido y se hidrolizó con 5 mL de HCl 5M en baño maría “PRECISION modelo 280” a 80 °C durante 1 hora, posterior a eso se tomó una alícuota, se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 min a 4 °C y se filtró bajo las condiciones anteriores.

Para el análisis cromatográfico, se inyectaron 20 μL de la extracción de ácidos fenólicos en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian modelo ProStar 230, equipado con una columna C_{18}ODS Beckman Coulter de 25 cm de largo, 4.6 mm de diámetro y un

tamaño de partícula de 5 μm con una bomba de gradiente ternario HPLC, acoplado a un detector UV y Vis ProStar 310 (Walnut Creek California, USA).

Se utilizó un gradiente de elución para la separación de los ácidos fenólicos empleando metanol grado HPLC (Solución A) y ácido fórmico al 5% con agua grado HPLC (Solución B) (anexo 14). Se utilizó una velocidad de flujo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y se detectó a una longitud de onda de 280 nm. Los ácidos fenólicos se identificaron comparando los tiempos de retención con los obtenidos para los estándares comerciales de ácido gálico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido hidroxibenzoico y ácido *p*-cumárico.

En cuanto al análisis de flavonoides se utilizó un gradiente de elución (anexo 15) empleando 95% de metanol grado HPLC más 5% de acetonitrilo (Solución elución A) y ácido fórmico al 5% mas 95% de agua grado HPLC (solución B). Se utilizó una velocidad de flujo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y se detectaron a una longitud de onda de 270 nm. Los flavonoides se identificaron comparando sus tiempos de retención con los obtenidos para los estándares comerciales de naringenina, naringenina 7-O-glucósido, rutina, kaempferol-3-O-glucósido, Kaempferol-3-O-rutinósido y quercetina. Ambas técnicas fueron descritas por Ruelas *et al.*, (2006).

5.4.4 *Determinación de enzimas de defensa en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4*

Cada una de las determinaciones de actividad enzimática se realizó de acuerdo a la metodología descrita en las siguientes secciones. Además, se determinó el contenido de proteína en cada extracto obtenido por la técnica de Bradford (1976) la cual consiste en tomar 15 μL del extracto, 785 μL de agua destilada y 200 μL de reactivo de Bradford. Se incluyó un blanco de reacción, el cual consistió en 800 μL de agua destilada y 200 μL de reactivo de Bradford. La mezcla se agitó suavemente y se dejó reposar por 5 min, leyéndose la absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. Para conocer la concentración de proteína en las muestras, los valores de absorbancia se extrapolaron

en una curva patrón de proteína que se obtuvo con suero de albumina bovina (BSA) a una concentración de 0 a 150 μg de proteína·mL⁻¹ (anexo 16).

5.4.4.1 Determinación de la actividad enzimática fenilalanina amonio-liasa (PAL)

La actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa se evaluó de acuerdo a la metodología propuesta por Paynet *et al.*, (1975), el cual mide la conversión de L-fenilalanina en ácido transcinámico y amonio por un método discontinuo. Para lo cual se tomaron 0.4 g de la muestra, se le añadió 15 mL del buffer de borato de sodio 0.1 M pH 8.8 + 0.2 M de mercaptoetanol y se pusieron a agitar durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente se filtró y se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4 °C y se midió el volumen de sobrenadante precipitando con sulfato de amonio (27g·100 mL⁻¹) y se agitó por 30 min a 4°C, terminado el tiempo se procedió a centrifugar 20 min a 12,000 rpm y el precipitado se resuspendió en 4.5 mL de acetato de amonio 0.1M con mercaptoetanol. Se leyó la absorbancia a 290 nm y posteriormente se incubó a 40 °C por un periodo de 2 h para volver a reportar la absorbancia pasado el tiempo de incubación. Para los cálculos de la actividad de PAL se utilizó la siguiente ecuación, donde una unidad de enzima (U) se define como lo cantidad de μM ácido transcinámico·h·mg⁻¹ proteína.

$$P = \frac{(B-A)(33.75)}{(G)(T_i - T_f)(V)(F)}$$

Donde:

V= volumen que se le añade de sulfato de amonio

G= peso de la muestra

Cte.= 33.75 U/ml, factor de corrección

A= Abs inicial

B=Abs final

T_i= Tiempo inicial

T_f= Tiempo final

F= Factor polvo acetona (peso fresco/peso seco)

5.4.4.2 Determinación de la actividad enzimática de peroxidasa (POD)

La actividad de la enzima peroxidasa se realizó por la técnica descrita por Frick (1976) mediante el método continuo usando como sustrato guayacol y peróxido de hidrógeno. La extracción de la enzima consistió en 0.2 g de muestra seca a la cual se le añadió 5 mL del buffer de extracción (anexo 17) y se homogenizó por 30 seg, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se usó para el ensayo, en el cual se colocaron 2.60 mL de buffer de ensayo (anexo 18), 50 µL del sobrenadante, 250 µL de guayacol directamente en la celda espectrofotométrica y dentro de ahí se le añadieron 100 µL de peróxido de hidrógeno, mezclando rápidamente y midiendo a 470 nm. Para el blanco se colocaron 2.60 mL de buffer de ensayo (anexo 19), 250 µL de guayacol directamente en la celda espectrofotométrica y dentro de ahí se le añadieron 100 µL de peróxido de hidrógeno. Se tomó la variación de densidad óptica en el tiempo ($\Delta D.O./(\Delta t)$), durante 3 min a intervalos de 15 segundos. El cálculo de la actividad enzimática para este método continuo se realizó según la siguiente ecuación, donde se definió como una unidad de actividad enzimática equivalente a la producción de 1 mmol de ácido transcinámico producido por minuto por mg de proteínas.

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta DO}{\Delta T} * \frac{1}{K} * \frac{V_{\text{ens}}}{V_{\text{enz}}} * \text{dil}$$

Donde:

K=Coeficiente de extinción molar del guayacol que es $5570 \times 10^{-6} \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$

Vens= Volumen del ensayo

Venz= Volumen de enzima

Dil= Dilución de la muestra.

DeltaDO = Diferencia entre la densidad óptica inicial y final

Delta T= Diferencia entre el tiempo inicial y final

5.4.4.3 Determinación de la actividad enzimática de glucanasa

La actividad de la enzima glucanasa se determinó por el método del ácido 3,5-nitrosalicílico (DNS) reportado por Abeles (1970) y Chaplin (1986) con modificaciones. Este método se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo). Se pesaron 0.01 g de muestra con 2 mL de buffer de extracción (anexo 20) el cual fue centrifugado a 10,000 rpm por 5 min. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se filtró con un filtro de 2 µm, tomando 250 µL del filtrado y se le agregaron 250 µL de laminarina al 0.5%. La mezcla se incubó por 1.5 h a 40°C, y se les agregaron 1000 µL de DNS, y nuevamente se calentó a 100°C por 5 min. Posterior al cambio de color amarillo a rojo, se enfriaron los tubos en agua y se detuvo la reacción agregándoles 80 µL de tartrato de sodio y potasio, y se leyó la absorbancia a 540 nm. Se realizó una curva estándar con glucosa (anexo 21) utilizando concentraciones de 10, 20, 30 y 40 mg·mL⁻¹. La actividad se expresó como µmoles de Glucosa· mg⁻¹ de proteína, usando la siguiente ecuación:

$$\text{enzimática} = \frac{\text{D.O.} * \text{Cot} * \frac{\text{Vens} * \text{dil}}{\text{Venz}}}{\text{T.inc}}$$

Donde:

D.O.= densidad óptica

Vens= Volumen del ensayo

Venz= Volumen de enzima

T. inc= Tiempo de incubación del ensayo

Cot= cotangente de la curva patrón

Dil= Dilución

5.4.4.4 Determinación de la actividad enzimática de quitinasas

La actividad de la enzima quitinasa se determinó según el método fluorométrico descrito por Cota *et al.*, (2007), donde se utiliza como sustrato el 4-Metilumbeliferona β-D-N, N', N'' triacilquitotriósido (4-Mu). El sustrato se preparó a partir de una solución madre del cual se hace una dilución de trabajo en buffer fosfato, pH 7, para obtener una

concentración final de 1.3 μM . Para la extracción se pesaron 0.2 g de muestra seca y se le añadieron 10 mL de buffer de extracción (anexo 22) y se homogenizó, posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm por 20 min a 4 °C. Para la preparación de la muestra se colocaron 5 mL de sustrato, 10 μL del extracto y 35 μL del buffer de fosfato (anexo 23), colocándose en un baño maría durante 5 min a 37 °C. Después se le añadieron 150 μL de carbonato de sodio 0.2M y se midió en un fluorómetro discreto (TBS-380), en UV usando una longitud de onda de excitación de 325 nm y de emisión 446 nm. La actividad de la enzima se midió colocando 10 μL del sustrato más 1 μL de la enzima más 39 μL del buffer de fosfato y se midió en el fluorómetro en modo continuo cada 5 seg hasta llegar a las 80 mediciones. Para realizar la curva patrón se utilizó una solución de 4-MU (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), a partir de la cual se prepararon las diluciones, a las que se les realizó el mismo procedimiento (anexo 24). Posteriormente, la actividad se calculó con la misma ecuación utilizada para la enzima glucanasa. Los resultados se reportaron como $\mu\text{moles de 4-MU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

5.4.5 *Diseño experimental*

Se utilizó un diseño completamente al azar con 6 repeticiones para cada medición, se analizó un análisis de varianza (ANOVA) y los datos fueron comparados con una prueba de Tukey ($P\leq 0.5$) en el paquete estadístico NCSS versión 2007. Las gráficas fueron realizadas en el paquete Sigma plot 10.0.

5.5 **Resultados y Discusión**

5.5.1 *Contenido total de fenoles y flavonoides en plantas de algodón transgénico inoculadas con Trichoderma ICA-4*

La inoculación con *T. longibrachiatum* ICA-4 indujo cambios en el contenido de compuestos fenólicos en las plantas de algodón transgénico. Se observó en la figura 20 que las plantas preinoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4 presentaron un aumento en

el contenido de compuestos fenólicos totales (26%) en comparación con las plantas de algodón transgénico sin inocular. Se registraron diferencias significativas ($P \leq 0.5\%$) entre las plantas inoculadas con la cepa de *Trichoderma* con un promedio de $42.8 \text{ mg EAG} \cdot \text{g}^{-1} \text{ P.S.}$ ¹ p.s. y las plantas testigo con 33.75 mg de $\text{EAG} \cdot \text{g}^{-1} \text{ P.S.}$ (anexo 25).

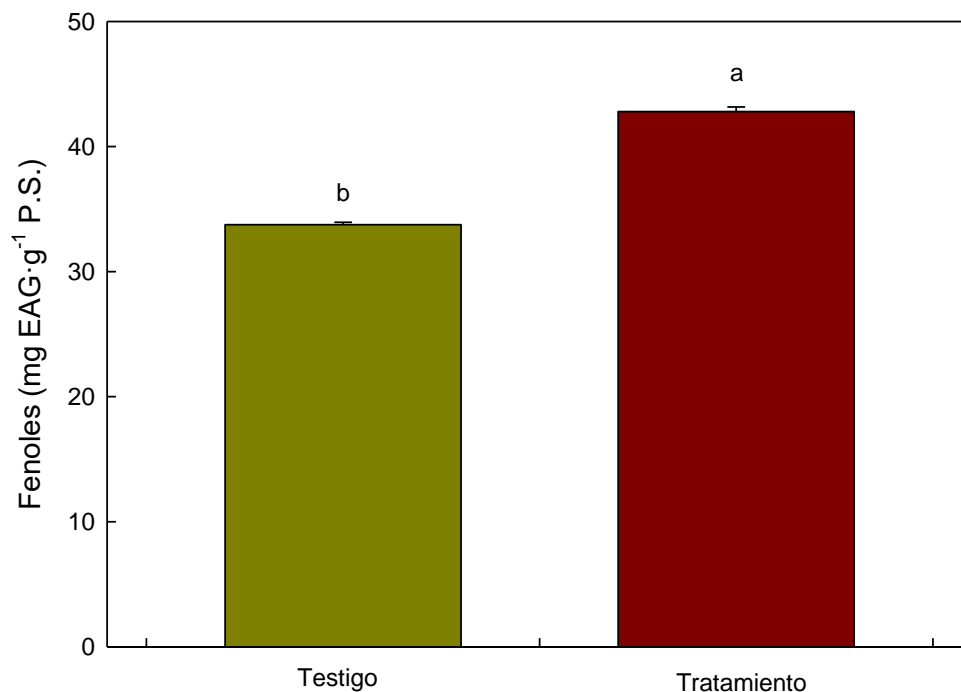


Figura 20. Contenido de fenoles totales en plantas de algodón transgénicas inoculadas y no con *T. longibrachiatum* ICA-4. Cada barra representa la media de cuatro determinaciones independientes \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Por otra parte, se evaluó el contenido de flavonoides totales en las plantas preinoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4 y las plantas testigos observando diferencias significativas con un 95% de confianza (anexo 26) Los valores promedio de las plantas sin tratar oscilaron en valores cercanos a $900 \text{ mg EQ} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco, mientras que para las plantas preinoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4 aumentaron cerca del 50% obteniendo un promedio cercano a los $1,400 \text{ mg EQ} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco (figura 21).

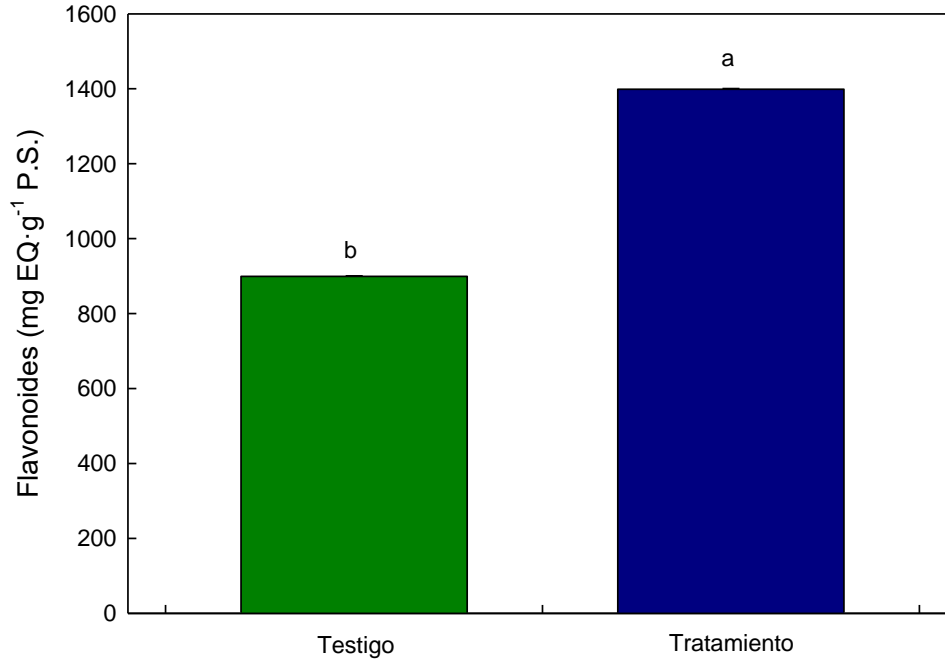


Figura 21. Contenido de flavonoides totales en plantas de algodón transgénico inoculadas o no (testigo) con *T. longibrachiatum* ICA-4. Cada barra representa la media de cuatro determinaciones independientes \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Estos resultados concuerdan con los reportados en plantas de girasol preinoculadas con *T. harzianum*, en donde observaron un incremento en la producción de compuestos fenólicos y flavonoides (Singh *et al.*, 2011), lo que sugiere que estos compuestos podrían estar relacionados con la reducción del estrés oxidativo, así como la inducción de mecanismos de defensa en respuesta a la presencia de hongos fitopatógenos.

Por otra parte, se ha visto que además de inducir las proteínas relacionadas con la defensa, la inoculación de *Trichoderma* spp. en pepino y coco induce la producción de compuestos fenólicos con efectos fungitóxicos (Yedidia *et al.*, 2003; Karthikeyan *et al.*, 2006). Asimismo, concuerda con un estudio realizado en garbanzo, en donde cepas de

T. harzianum indujo la acumulación de compuestos fenólicos, lo que provocó una disminución de la mortalidad de la planta, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* y *Sclerotium rolfsii* (Singh *et al.*, 2007).

Se observó también que en 3 variedades de cebolla la aplicación de *Trichoderma harzianum* incrementó significativamente el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides relacionados con una disminución de los síntomas de enfermedad causada por *S. rolfsii* (Aparicio, 2010). Si bien los compuestos fenólicos y flavonoides están relacionados directamente como respuesta a la activación de los mecanismos de defensa de la planta, dando lugar a la producción de metabolitos secundarios los cuales pueden ser polifenoles, tánicos, entre otros. Además, se ha reportado que una planta que acumule fenoles en sus hojas produce compuestos que provocan efectos y olores desagradables como parte del mecanismo de defensa (Beart, 1985).

5.5.3 Principales compuestos fenólicos en plantas de algodón transgénico inoculadas con *Trichoderma* ICA-4.

Los cromatogramas correspondientes a los diferentes compuestos fenólicos en plantas inoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4 y las plantas testigo, se presentan en la figura 22. Se puede observar que en ambos casos se detectaron los mismos ácidos fenólicos, los cuales fueron identificados como ácido gálico, ácido hidroxibenzoico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido vanílico, y ácido cumárico. Esta identificación se realizó comparando los tiempos de retención de cada compuesto con respecto a los tiempos de retención presentado por los estándares comerciales (anexo 27). Además, en la figura 26 se puede apreciar que se registraron cambios muy pequeños en cuanto a la altura de los picos (la cual está relacionada con la concentración de los compuestos). Por ejemplo, en el algodón tratado con *T. longibrachiatum* ICA-4 se observó que el ácido gálico disminuyó con respecto al testigo; mientras que los ácidos clorogénico y cumárico se incrementaron 1.5 y 1.1 veces respectivamente, con respecto al testigo.

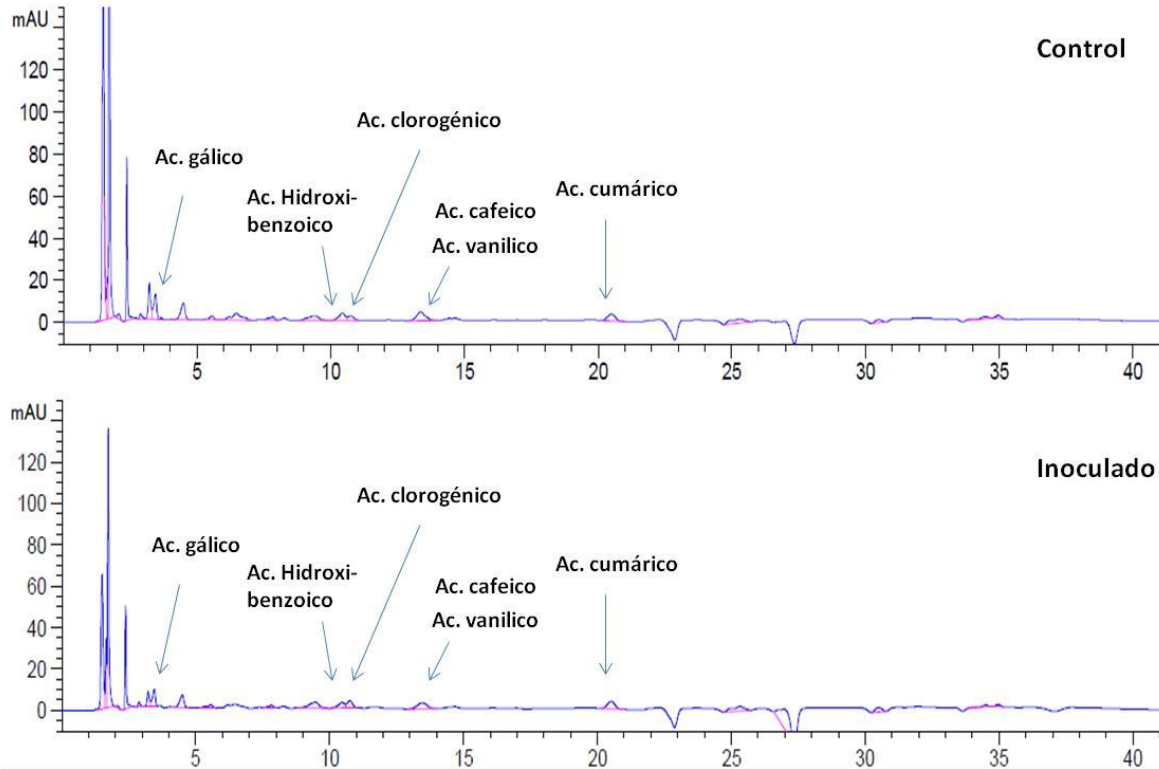


Figura 22. Perfiles cromatográficos de ácidos fenólicos en plantas de algodón transgénico inoculadas o no (testigo) con la cepa *T. longibrachiatum* ICA-4.

En cuanto a los flavonoides, el análisis cromatográfico reveló la presencia de varios picos claramente definidos, los cuales al comparar sus tiempos de retención con los de los estándares comerciales (anexo 28) se logró identificar la presencia de los flavonoides naringenina, quercetina, kaempferol-rutinósido y kaempferol-glucósido (figura 23). Al comparar los dos cromatogramas se observaron cambios muy pequeños en estos compuestos. Por ejemplo, en el algodón transgénico preinoculado con *T. longibrachiatum* ICA-4 se observó que naringenina se incrementó ligeramente (1.22 veces) con respecto al testigo; mientras que kaempferol rutinósido y kaempferol glucósido incrementaron en un 1.57 y 1.54 veces con respecto al testigo. En el anexo 20 se presentan los tiempos de retención, así como los cromatogramas para cada una de las muestras correspondientes al testigo y a las plántulas de algodón transgénico preinoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4.

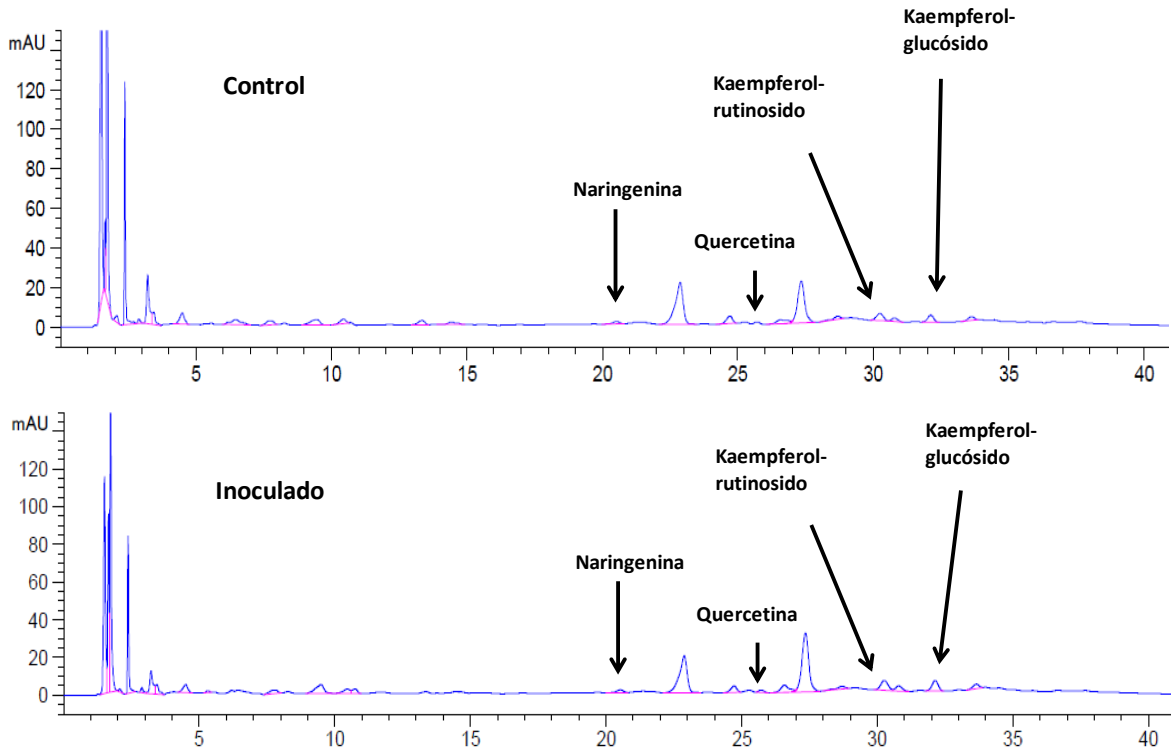


Figura 23. Perfiles cromatográficos de flavonoides en plantas de algodón transgénico testigo (sin inocular *T. longibrachiatum* ICA-4) y en plantas inoculadas con la cepa *T. longibrachiatum* ICA-4.

Así mismo, los resultados preliminares de los perfiles cromatográficos indican que el tratamiento con *T. longibrachiatum* ICA-4 induce cambios en el contenido de cada uno de los compuestos de naturaleza fenólica, así como flavonólica. Teniendo en cuenta esto se ha visto que en algunos trabajos se correlaciona la síntesis de determinados compuestos fenólicos con la resistencia a la enfermedad. Pero sólo unos pocos proporcionan evidencias genéticas directas de la formación de un compuesto fenólico particular de defensa, esto sugiere que la esterificación de compuestos fenólicos como el ácido ferúlico o el ácido *p*-cumárico (Hartley y Ford, 1989; Fry, 1983) a la pared celular es un fenómeno común en la expresión de resistencia (Fry, 1987). Se conoce que los compuestos fenólicos juegan un papel importante en la modificación de las propiedades mecánicas de la pared celular (Parker y Waldron, 1995), limitando la degradación de polisacáridos de la pared celular mediante enzimas exógenas (Grabber *et al.*, 1998;

Hatfield, 1993) e incrementando la rigidez de ésta mediante la unión de polisacáridos y lignina (Ralph *et al.*, 1994).

5.5.4 Actividad enzimática de PAL en plantas de algodón transgénico inoculadas con *Trichoderma* ICA-4

Los resultados obtenidos sobre el efecto de la inoculación con *T. longibrachiatum* ICA-4 en la actividad de la enzima PAL en plantas de algodón transgénica, se presentan en la figura 24. Como se puede apreciar, hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las plantas tratadas y el testigo; en las plantas inoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4 la actividad de la enzima registró un promedio de $0.0215 \mu\text{M}$ ácido cinámico·mg proteína, mientras que para las plantas testigo esta actividad fue menor con un promedio de $0.0077 \mu\text{M}$ ácido cinámico·mg⁻¹ proteína (anexo 29).

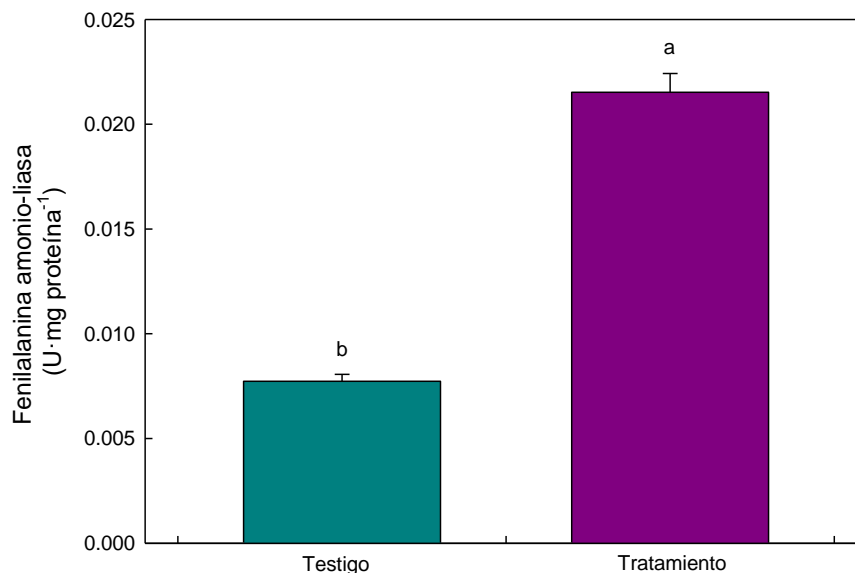


Figura 24. Actividad del enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) en plantas de testigo (sin inocular con *T. longibrachiatum* ICA-4) y en plantas inoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4. Cada barra representa la media de cuatro determinaciones independientes \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

La enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) es la primera enzima de la ruta de síntesis de fenilpropanoides y cataliza la transformación de la L-fenilalanina a ácido transcinámico. Este compuesto es el primer intermediario para la biosíntesis de compuestos fenólicos, muchos de ellos con actividad antimicrobiana (Dixon y Paiva, 1995). Después de una infección microbiana se induce la activación de la ruta de síntesis de los fenilpropanoides que conduce a una mayor deposición de lignina y de compuestos fenólicos en sitios lejanos donde ocurrió la infección (Shoresh *et al.*, 2010).

La producción de metabolitos secundarios en respuesta a un factor elicitor es un fenómeno fisiológico de respuesta donde existe un incremento en compuestos fenólicos y estos a su vez están asociadas a un incremento en la actividad de la enzima PAL, ya que esta enzima es la encargada de catalizar la formación de ciertos compuestos fenólicos y metabolitos secundarios tales como las antocianinas y otros ácidos orgánicos. (Grassmann *et al.*, 2002)

Esta enzima también está involucrada en la síntesis directa del ácido salicílico por la vía del ácido benzoico que es considerado una importante señal en la amplificación de las respuestas sistémicas defensivas de las plantas (Yalpani *et al.*, 1993).

5.5.5 Actividad enzimática de peroxidasa en plantas de algodón transgénico inoculadas con *Trichoderma ICA-4*

La actividad enzimática específica de peroxidasas mostró diferencia significativa en plantas tratadas con *Trichoderma* con respecto al testigo (anexo 30). Estos datos muestran un incremento un 50% más en las plantas tratadas con *T. longibrachiatum* ICA-4 con respecto al testigo (figura 25). Estos resultados son similares a los reportados por Guzmán (2012), quien evaluó 3 variedades de cebolla y observó que al ser inoculadas con *T. asperellum* tanto al momento de semilla como al trasplante de la plántula, aumentó la actividad enzimática de peroxidasas y otras enzimas relacionadas a los mecanismos de defensa, partiendo de una respuesta tanto local como sistémica.

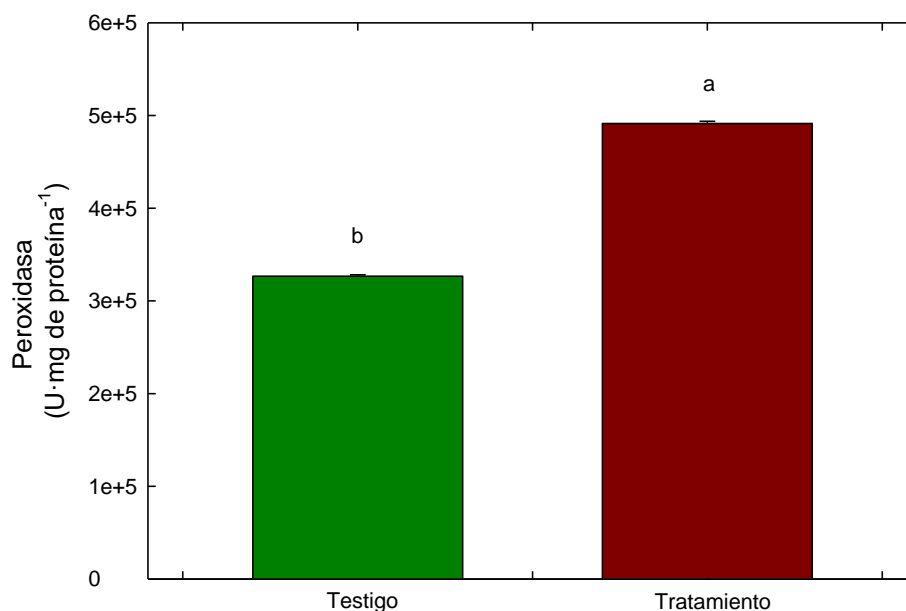


Figura 25. Actividad del enzima peroxidasa (POD) en plantas de testigo (sin inocular con *T. longibrachiatum* ICA-4) y en plantas inoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4.

Cada barra representa la media de cuatro determinaciones independientes \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Se ha visto que la enzima POD está implicada en procesos fisiológicos y de desarrollo y esta puede ser detectada desde la germinación hasta la senescencia, actuando en procesos de suberización (Bernards *et al.*, 1999), polimerización de extensinas (Brownleader *et al.*, 1995); dimerización de ferulatos (Ikegawa *et al.*, 1996); oxidación de fenoles (Lagrimini, 1991) y especialmente en la lignificación (Quiroga *et al.*, 2000), los cuales son mecanismos que se pueden ver activados en la defensa frente a patógenos (Kristensen *et al.*, 1999). Estos resultados pueden discutir de cierta manera los cambios ocurridos en los compuestos fenólicos, ya que al incrementar la actividad de POD, así como la producción de compuestos fenólicos existe una relación directa ya que esta enzima está relacionada con la formación de dímeros, utilizando mezclas equimolares de pares de ácidos hidroxicinámicos, concretamente de ácido p-cumárico, ácido ferúlico,

ácido sinápico y ácido cafeico (Arrieta-Baez y Stark, 2006), actuando en diferentes procesos del mecanismo de defensa de la planta.

5.5.6 Actividad enzimática de glucanasas en plantas de algodón transgénico inoculadas con *Trichoderma* ICA-4

Las enzimas glucanasas (EC 3.2.1.39) catalizan el rompimiento hidrolítico tipo endo de los enlaces β -1,3 glucosídico en los β -1,3 glucanos, que es uno de los componentes principales de la pared celular de muchos hongos fitopatógenos (Van Loon, 1999). El principal interés en la β -1,3 glucanasa es su posible función en la respuesta de plantas a patógenos microbianos, es por eso que este estudio trata de evaluar las respuestas de *T. longibrachiatum* ICA-4 como un agente inductor de estas enzimas, de tal manera que la planta se encuentre de cierta manera pre-immunizada por futuros ataques por patógenos.

La actividad de enzimas glucanasas se vio incrementada al inocularse con *T. longibrachiatum* ICA-4 en un 26% con respecto al testigo, encontrándose diferencias significativas entre ambos tratamientos (figura 26). Estos valores muestran una diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento (anexo 31). Se ha visto que la inoculación con cepas de *Trichoderma*, en el caso del estudio reportado por Harman *et al.* (2004) vieron que la inoculación con *T. harzianum* T22 en semillas de maíz genera en brotes y raíces de las plántulas un incremento de los niveles de proteínas; así como de los niveles de la actividad de quitinasa y β -1,3-glucanasa, incrementando aún más cuando fueron infectadas con el hongo *Pythium ultimum*.

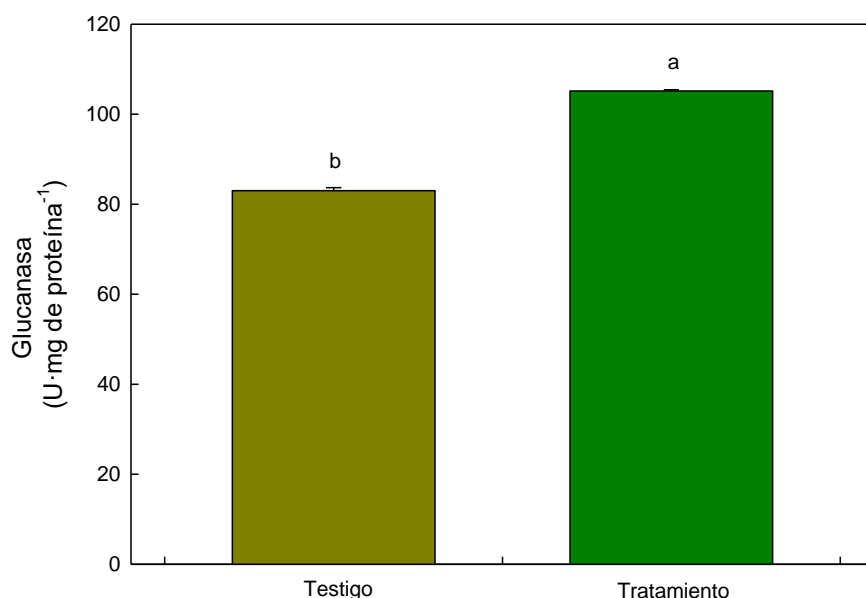


Figura 26. Actividad del enzima glucanasa (GLU) en plantas de testigo (sin inocular con *T. longibrachiatum* ICA-4) y en plantas inoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4. Cada barra representa la media de cuatro determinaciones independientes \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Es posible que el potencial enzimático de *Trichoderma* para detener el proceso infeccioso de los patógenos sea mucho mayor, pues este controlador biológico secreta más de 70 metabolitos, entre ellos: sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas. Según Harman *et al.* (2004), durante muchos años se supo de la habilidad de estos hongos para estimular el crecimiento de las plantas, en especial el sistema radicular, sin embargo, aún no se conocen con certeza los mecanismos involucrados.

Adicionalmente, se observó que los genes de defensa en tomate (chitinasa, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductasa y β -1,3 glucanasa) durante la interacción con las cepas de *Trichoderma*, se indujeron en mayor grado en las plantas tratadas con las cepas transformadas, que en aquellas que recibieron la cepa silvestre, y en menor grado en las plantas sin inocular (Jaworska y Dluzniewska, 2007).

5.5.7 Actividad enzimática de quitinasas en plantas de algodón transgénico inoculadas con *Trichoderma* ICA-4

La inoculación con la cepa de *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4 indujo cambios significativos (anexo 32) en la actividad de la enzima quitinasa en plantas de algodón transgénico. Estas presentaron un promedio de 516 $\mu\text{moles de 4-MU} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, el cual fue 90% mayor significativamente con respecto al testigo (272 $\mu\text{moles de 4-MU} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) (figura 27). Estos resultados nos indican que la cepa de *T. longibrachiatum* ICA-4 sirve como agente inductor para incrementar la actividad de la enzima quitinasa.

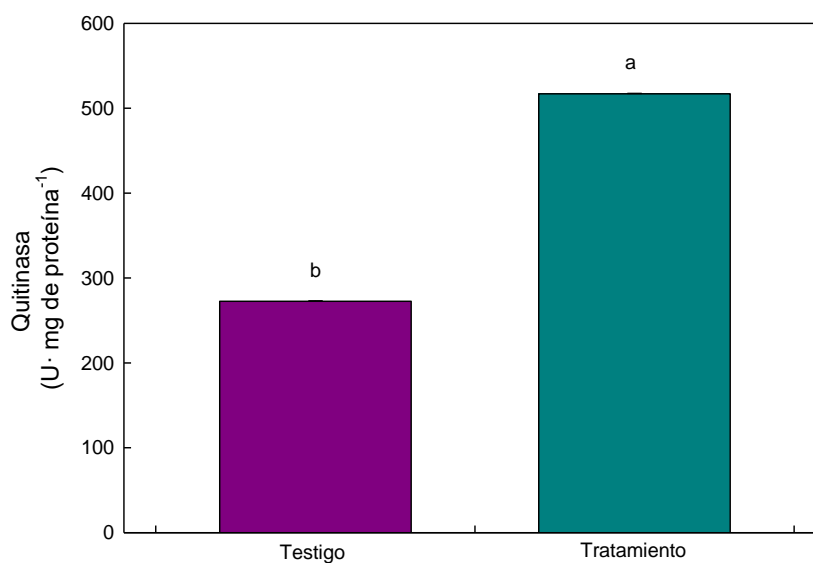


Figura 27. Actividad del enzima quitinasa (QUI) en plantas de testigo (sin inocular con *T. longibrachiatum* ICA-4) y en plantas inoculadas con *T. longibrachiatum* ICA-4. Cada barra representa la media de cuatro determinaciones independientes \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según test de Tukey ($P \leq 0.05$).

Si bien las quitinasas (EC 3.2.1.14) son las enzimas encargadas de cortar el enlace entre el C1 y C4 de dos N-acetilglucosaminas consecutivas del polímero de quitina, estas han sido consideradas como enzimas de defensa de las plantas contra la infección de patógenos principalmente, observando que son acumuladas alrededor del hongo fitopatógeno provocando la lisis de las hifas y por consiguiente reduciendo los daños que éstos causan en las plantas (Broglie *et al.*, 1991).

El sistema quitinolítico de *Trichoderma* comprende muchas enzimas y la lista de estos componentes inicia con la activación de nuevas enzimas y genes reportados. Las quitinasas son divididas dentro de 1,4- α -acetylglucosaminidasas (glucanasas), endoquitinasas y exoquitinasas. De igual forma las (glucanasas) β -1,3-glucanasas, así como las quitinasas actúan sinérgicamente e inhiben la germinación de la espora y el crecimiento de algunos patógenos (El-Katatny *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha observado que muchas cepas de *Trichoderma* son capaces de inducir resistencia sistémica en las plantas, ya que, aplicadas en la rizósfera, producen protección contra patógenos del suelo o foliares, debido a que esta resistencia aumenta la actividad de enzimas como las quitinasa y peroxidasas en zonas distantes a la raíz de la planta (Yedidia *et al.*, 1999).

La pared celular de los hongos está compuesta principalmente de glucanos y quitina, se considera que entre un 50-60% de la pared celular de los hongos está constituida de glucanos y un 1% lo constituye la quitina, estos polisacáridos, son los encargados de darle forma y rigidez a la célula fúngica (Bowman y Free, 2006). La inducción de estas enzimas utilizando *Trichoderma* se ha estudiado con plantas de pepino (*Cucumis sativus*) (Alizadeh *et al.*, 2013) y cebolla (*Allium cepa*) (Guzmán-Valle *et al.*, 2014; Camacho, 2014), observando una mayor inducción de estas enzimas en los tratamientos con *Trichoderma*.

5.6 Conclusiones

Se observó en general al aplicar la cepa de *T. longibrachiatum* ICA-4 en plantas de algodón transgénico, este tiende a aumentar el contenido de compuestos fenólicos totales así como flavonoides. De igual manera al evaluar los ácidos fenólicos y flavonoides por HPLC, estos tienden a aumentar en las plantas inoculadas. Si bien se sabe que estos compuestos son producidos por rutas del metabolismo secundario en plantas como parte de la activación de sus mecanismos de defensa, se observó que varias de las principales enzimas involucradas en estos procesos tal como PAL, POD, QUI y GLU presentaron diferencias significativas con respecto a las plantas control, lo que sugiere que este microorganismo benéfico podría ser utilizado como agente biocontrol, así como un inductor de los mecanismos de defensa de la planta actuando de cierta manera al inmunizar a la planta y activar los mecanismos de defensa o protección contra posibles futuros ataques por patógenos.

5.7 Literatura citada

Ahmed S., Sanchez C. and Candela M. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 106:817–824.

Alizadeh H., Behboudi K., Ahmadzadeh M., Javan-Nikkhah M., Zamioudis C., Pieterse M. and Bakker A. 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control*. 65:14–23.

Aparicio B. 2010. Efecto de *Trichoderma harzianum* en la respuesta de defensa de tres variedades de cebolla. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Yautepec Morelos México.

Arrieta-Baez D. and Stark R. 2006. Using trifluoroacetic acid to augment studies of potato suberin molecular structure. *J Agric Food Chem.* 54:9636 -9641.

Ayyappan R., Showalter N. and Showalter A. 1996. Purification and characterization of wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 226: 254-260.

Azcón-Bieto J. y Talón M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal. Fisiología de las plantas y el estrés.* 2nd ed. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.29: 577-597.

Beart J., Lilley T. and Haslan E. 1985. Plant poliphenols. Secondary plant metabolism and chemical defense: some observations. *Phytochem.* 24:33-38.

Bernards M., Fleming W., Llewellyn D., Priefer R., Yang X., Sabatino A. and Plourde G. 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol.* 121: 135-145.

Blanco-Labra A. y Aguirre c. 2002. Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de Plantas. *Acta Universitaria.* 12:3:3-28.

Boller T. 1987. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance *Phytophthora parasitica* En: *Plant-microbe interactions molecular genetic perspectives* (T. Kosuge; E. Nester, eds.). New York, MacMillan Press. USA. 2:385-414.

Boller T., Geheri A., Mauch F. y Vogeli U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta.* 157: 22-31.

Bowman S. and Free S. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays.* 28:799–808.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 73: 248-250.

Brogliè K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle P., Knowlton S., Mauvals C. and Brogliè R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.

Brownleader M., Ahmed N., Trevan M., Chaplin M. and Dey P. 1995. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiol.* 109: 1115-1123.

Camacho L. 2014. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. Sobre *Alternaria porri* y su efecto en la actividad enzimática de cebolla. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec Morelos.

Chen J., Harman G., Comis A. and Cheng G. 2005. Proteins related to the biocontrol of *Pythium* damping-off in maize with *Trichoderma harzianum* Rifai. *Journal of Integrative Plant Biology* 47:988–997.

Collinge D., Gregersen P. and Thordal-Christensen H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In: Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern appro.

Corrêa S., Mello M., Ávila-Zila R., Minaré-Braúna L., Pàdu y R. and Gómez D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad.* 11:1.

Cuypers H., Dash S., Peterson P., Saedler H. and Gierl A. 1988. The defective En-1102 element encodes a product reducing the mutability of the En/Spm transposable element system in *Zea mays*. *EMBO J.* 7:2953-2960.

De Meyer G., Bigirimana J., Elad Y. and Hofte M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104:279–286.

Dixon R. and Paiva N. 1995. Stress induced propanoid metabolism. *The Plant Cell*.7:1085- 1097.

El-Katatny M., Gudelj K., Robra M., Elnaghy G. and Gubitz G. 2001. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:137–143.

Esteban-Carrasco A., López-Serrano M., Zapata J., Sabater B. and Martin M. 2001. Oxidation of phenolic compounds from *Aloe barbadensis* by peroxidase activity: Possible involvement in defence reactions. *Plant Physiol. Bioch.*39: 21-527.

Fernández–Larrea V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).* 62: 96–100.

Frick F. 1976. Oxidative enzymes. *Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Pathology.* Ed. Heitefuss, R. y Williams, P.H. New Series 4: 617-627.

Fry S. 1983. Feruloyled pectins from the primary cell wall: their structure and possible functions. *Planta.* 157: 11-123.

Fry S. 1987. Intracellular feruloylation of pectic polysaccharides. *Planta.* 171: 205-211.

Grabber J., Ralph J. and Hatfield R. 1998. Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferylaldehyde. *J Sci Food Agric.* 78: 81-87.

Graassmann J., Hippeli S. and Elstner E. 2002. Plants defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 471–478.

Guzmán V. 2012. Inducción de la resistencia a *Sclerotium rolfsii* en cebolla por la aplicación de *Trichoderma asperellum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos México.

Guzmán-Valle P., Bravo-Luna L., Montes-Belmont R., Guigón-López C. and Sepúlveda-Jiménez G. 2014. Induction of resistance to *Sclerotium rolfsii* in different varieties of onion by inoculation with *Trichoderma asperellum*. *European Journal of Plant Pathology*. 138 223–229.

Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*. 31: 261-272.

Harman G., Howell C., Viterbo A., Chet I. and Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*. 2:43-56.

Hartley R. and Ford C. 1989. Phenolic constituents of plant cell walls and biodegradability. En: *Plant Cell Wall Polymers Biogenesis and Biodegradation*. Lewis, NG, Paice, MG, eds. American Chemical Society, Washington USA. 137-145.

Hatfield R. 1993. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. En. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. Jung HJ, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J. eds. ASA-CSSA-SSSA: Madison, WI, USA. 285-313

Howell C., Hanson L., Stipanovic R. and Puckhaber L. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90:248–252.

Hutcheson S. 1998. Current concepts of active defense in plants. Annual Review of Phytopathology. 76: 3554-3557.

Ikegawa T., Mayama S., Nakayashiki H. and Kato H. 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. Physiol Mol Plant Pathol. 48: 245-255.

Jaworska J. and Dluzniewska J. 2007. The Effect of Manganese ions on development and antagonism of *Trichoderma* Isolates. Polish J of Environ Stud. 16:4:549-553.

Karthikeyan M., Prasad D., Poojary B., Bhat K., Holla B. and Kumari N. 2006. Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety. Bioorg. Med. Chem. 14:7482–7489.

Kristensen B., Bloch H. and Rasmussen S. 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. Plant Physiol. 120: 501-512.

Lagrimini L. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. Plant Physiol. 96: 577-583.

Loren-Kukula K., Wrobel-Kwiat-kowska M., Starzycki M. and Szopa J. 2007. Engineering flax with increased flavonoid content and thus *Fusarium* resistance. Physiol. Mol. Plant P. 70: 38-48.

Mano J. 2002. Early events in environmental stresses in plants-induction mechanisms of oxidative stress. En: Oxidative stress in plants. Ed: Inzé, D., Van Montagu, M. Taylor & Francis, London. UK. 217-246.

Mauch-Mani B. and Sluzarenko L. 1996. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinases and β -1,3 glucanases in bean leaves. *Plant Cell*. 1: 447-456.

Mauch-Mani B. and Mauch F. 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interaction *Current Opinion in Plant Biology*. 8:4: 409-414.

Parker M. and Waldron K. 1995. Texture of chinese water chestnut: involvement of cell wall phenolics. *J Sci Food Agric*. 68: 337-346.

Paxton J. 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology Z*. 101:106-109.

Paynet M., Martin C. and Girand M. 1971. Activité phenylalanine ammoniae lyase et hypersensibilite an virus de la mosaique du tabac. *Acad. Sci. Paris*. 273: 537-539.

Quiroga M., Guerrero C., Botella M., Barceló A., Amaya I., Medina M., Alonso F., Milrad de Forchetti S., Tigier H. and Valpuesta V. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol*. 122: 1119-1127.

Ralph J., Hatfield R., Quideae S., Helm R., Grabber J. and Jung H. 1994. Pathway of p-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J Am Chem Soc*. 116: 9448-9456.

Ruelas C., Tiznado-Hernandez M., Sanchez-Estrada A., Robles-Burgueno M. and Troncoso-Rojas R. 2006. Changes in Phenolic Acid Content During *Alternaria alternate* Infection in Tomato Fruit. *J. Phytopathology*. 154: 236–244.

Segarra G., Casanova E., Bellido D., Odena M., Oliveira E. and Trillas I. 2007. Proteome, salicylic acid and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* T34. *Proteomics* 7: 3943–3952.

Sempere F. and Santamarina M. 2007. In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia* 163:3:183-90.

Shohael A., Chakrabarty D., Ali M., Yu K., Hahn E., Lee H. and Paek K. 2006. Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose-induced osmotic stress. *Process Biochemistry*.41:512- 518.

Shoresh M., Harman G. and Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review Phytopathology* 48:21–43.

Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 215:2:213-219.

Singh A., Srivastava S. and Singh H. 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. *Bioresource Technology* 98:470–473.

Singh B., Sharma S. and Singh B. 2011. Antioxidant enzymes in cabbage: Variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Scientia Horticulturae*. 124: 9-13.

Toumi I., Moschou P., Paschalidis K., Bouamama B., Ben Salem-Fnayou A., Ghorbel A., Mliki A. and Roubelakis-Angelakis K. 2010. Abscisic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. *Journal of Plant Physiology*. 167: 519-525.

Van Loon L. 1999. Occurrence and properties of pathogenesis-related proteins. En: *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press. 193.

Whenham R., Fraser R., Brown L. and Payne J. 1986. Tobacco mosaic virus induced increase in abscisic acid concentration in tobacco leaves: intracellular location in light and dark-green areas, and relationship to symptom development. *Planta*. 168: 592-598.

Wilson P., Ketola E., Ahvenniemi P., Lehtonen M. and Valkonen J. 2008. Dynamics of soilborne *Rhizoctonia solani* in the presence of *Trichoderma harzianum*: effects on stem canker, black scurf and progeny tubers of potato. *Plant Pathology* 57:152– 161.

Yalpani N., Leon J., Lawton M. and Raskin I. 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiology*. 103: 315-321.

Yedidia I., Benhamou N. and Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the control agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and environmental microbiology*. 65:3: 1061-1070.

Yedidia I., Shores M., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y. and Chet I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl Environ Microbiol*. 69: 7343–7353.

CONCLUSIONES

Se logró la identificación de cuatro cepas de *F. solani* en la rizósfera de plantas de algodón transgénico en el Valle de Mexicali, donde observamos que este hongo fitopatógeno es el agente causal de la marchitez producida en los campos de algodón transgénico.

Por otra parte al evaluar la patogenicidad de las cuatro cepas aisladas (T-ICA01, T-ICA03, T-ICA04 y T-ICA08) se observó que la cepa de T-ICA03 presenta el mayor porcentaje de severidad en la planta, así como un mayor número de puntos de infección, lo que ocasiona que el patógeno al entrar a la planta causando un necrosamiento y que el desarrollo de las hifas de *F. solani* invadan los tejidos xilémicos de la planta evitando así el transporte de agua y nutrientes de la raíz hacia la parte aérea ocasionando clorosis y una disminución en las actividades fisiológicas de la planta, como lo es la eficiencia fotosintética.

Al evaluar la actividad antagonista de la cepa de *Trichoderma longibrachiatum* ICA-4, esta cepa presentó antagonismo con tres de las cepas evaluadas (T-ICA01, T-ICA04 y T-ICA08), sin embargo, *Trichoderma* ICA-4 detuvo el crecimiento de *F. solani* T-ICA03, donde se observó que el microorganismo antagonista invade las células de *F. solani* penetrando a la célula y causando la lisis de la misma causando la muerte de *F. solani*.

Al pre-inocular las plantas con *Trichoderma* ICA-4 se observó que este microorganismo antagonista tiene la capacidad de inducir la producción de compuestos fenólicos y flavonoides causando que la planta de cierta manera se encuentre en sistema de alerta para cuando un patógeno llegue a invadirla.

Dentro de los mecanismos de inducción de *Trichoderma* ICA-4 encontramos un incremento en las enzimas de estrés oxidativo tales como peroxidasa, así como de otras enzimas de defensa como lo son quitinasas y glucanasa existiendo diferencias

significativas con respecto a las plantas testigo (sin inocular). Una de las principales enzimas que catalizan la producción de compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios es PAL la cual mostró un incremento significativo al ser inoculada con *Trichoderma* T-ICA4, lo cual nos indica que la pre-inoculación de este microorganismo antagonista induce los mecanismos de defensa de la planta de algodón transgénico.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación del medio de cultivo mínimo de sales SNA

Compuesto	Reactivo
KH_2PO_4	1 g
KNO_3	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucosa	0.2 g
Sacarosa	0.2 g
Agar	23 g
NaOH 1M	0.6 mL

Estos compuestos son pesados y llevados a 1 litro de agua destilada, posteriormente se esteriliza en un autoclave a 120°C, 15 psi por un período de 15 min.

Anexo 2. Medio mínimo de sales de Kirk

Compuesto	Reactivo
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂	0.1 g
NH ₄ NO ₃	2 g
Glucosa	20 g

Estos compuestos son pesados y llevados a 1 litro de agua destilada, posteriormente se esteriliza en un autoclave a 120°C, 15 psi por un período de 15 min.

Anexo 3. Análisis de Anova para cinética de crecimiento de las cuatro cepas aisladas de
F. solani.

Análisis de Variancia: Cinética de Crecimiento para el Día 3

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	7.227	1.80675	103.24	0.000000*	1.00000
S(A)	15	0.2625	0.0175			
Total (Adjusted)	19	7.4895				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.0175 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	1.25	T-ICA01,T-ICA04,T-ICA03, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	1.975	Control, T-ICA08, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	2.975	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	2.525	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	1.75	Control, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Cinética de Crecimiento para el Día 6

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	53.327	13.33175	421.00	0.000000*	1.00000
S(A)	15	0.475	3.16667E-02			
Total (Adjusted)	19	53.802				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=3.16667E-02 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	2.85	T-ICA01,T-ICA04,T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	4.375	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	7.2	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	5.775	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	3.15	T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparison test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Cinética de Crecimiento para el Día 9

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	48.727	12.18175	580.08	0.000000*	1.00000
S(A)	15	0.315	0.021			
Total (Adjusted)	19	49.042				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

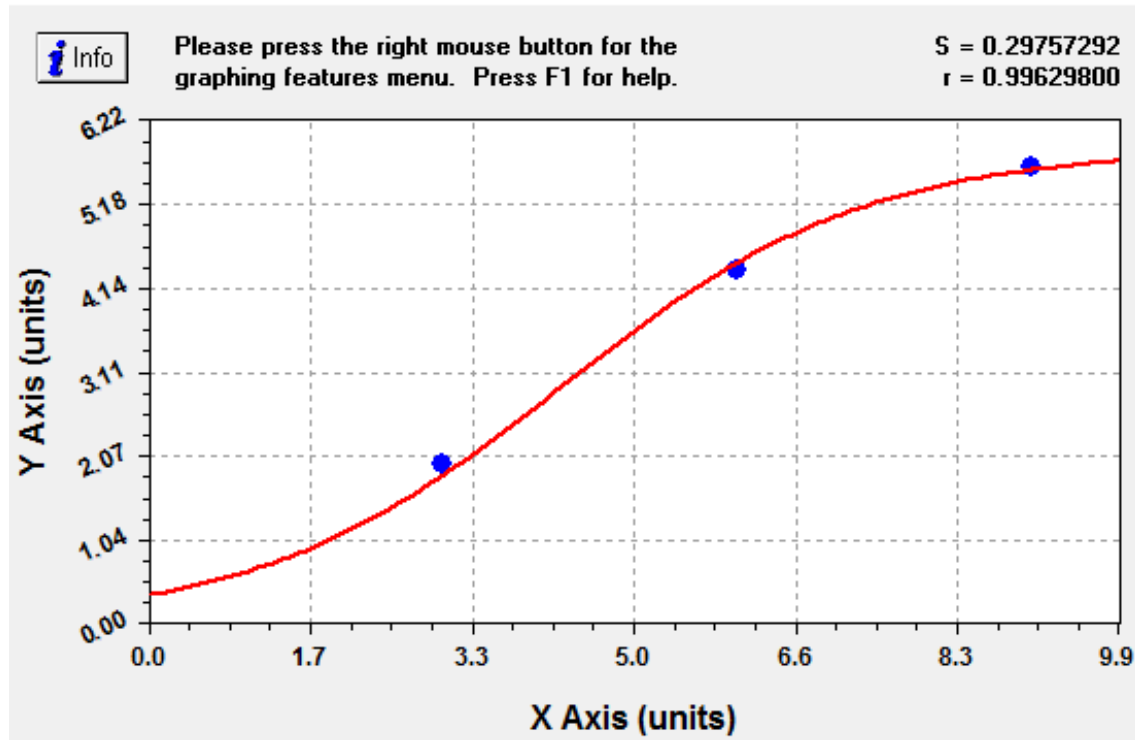
Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.021 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	4.15	T-ICA01,T-ICA04,T-ICA03, T-ICA08
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	5.65	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	8.1	Control, T-ICA08, T-ICA01
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	5.775	Control, T-ICA08, T-ICA01
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	5.075	T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparison test for all pairwise differences between the means.

Anexo 4. Modelos de cinética de crecimiento de las cuatro cepas de *F. solani*

F. solani T-ICA01



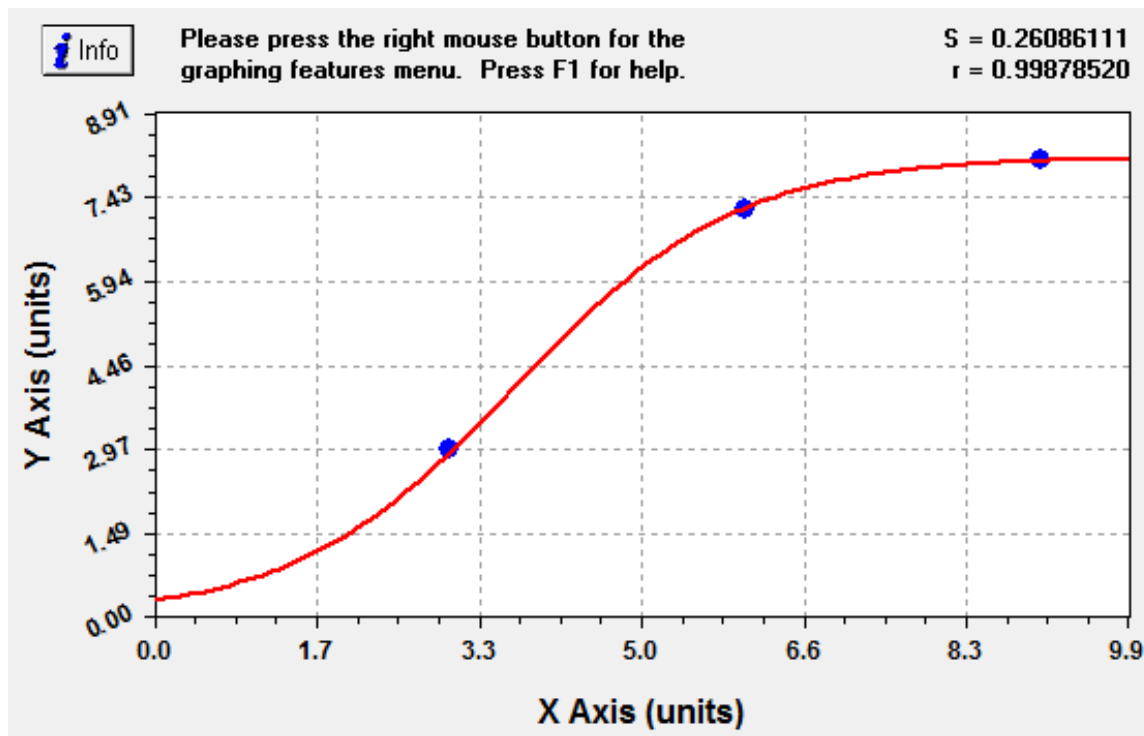
Logistic Model

$$y = \frac{a}{1 + be^{-cx}}$$

The parameters for the above model equation are given to the right in the coefficient list.

Coefficients:

a =	5.85286601084E+000
b =	1.51803395652E+001
c =	6.48442099254E-001



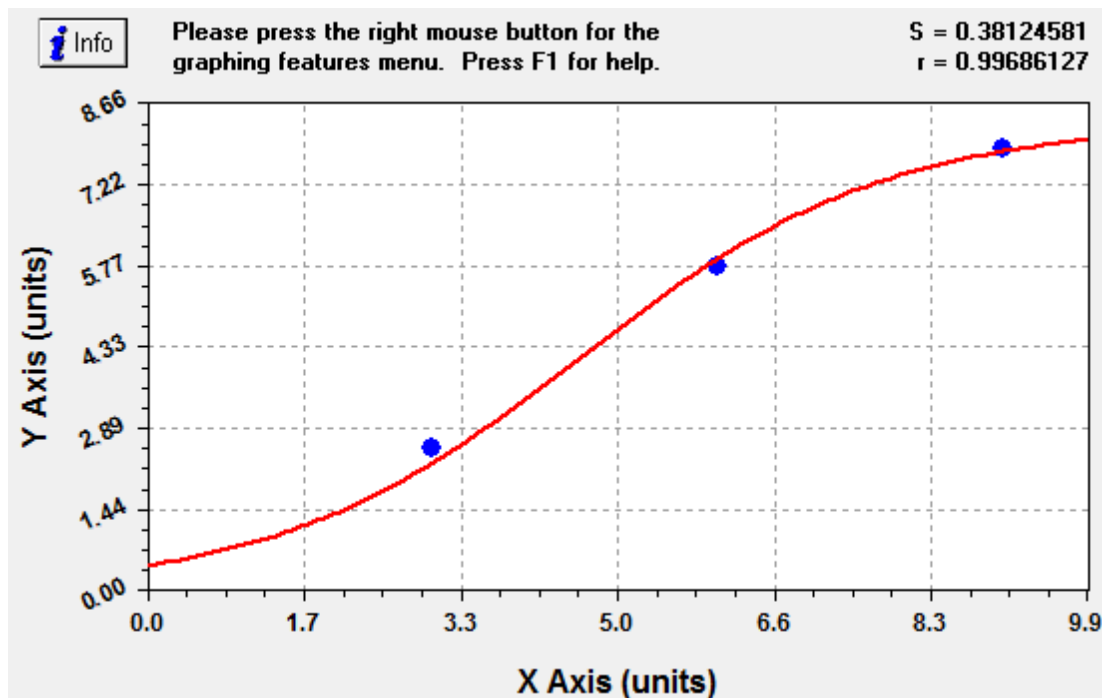
Logistic Model

$$y = \frac{a}{1 + be^{-cx}}$$

Coefficients:

- a = 8.13435723469E+000
- b = 2.55609377222E+001
- c = 8.90359590870E-001

The parameters for the above model equation are given to the right in the coefficient list.



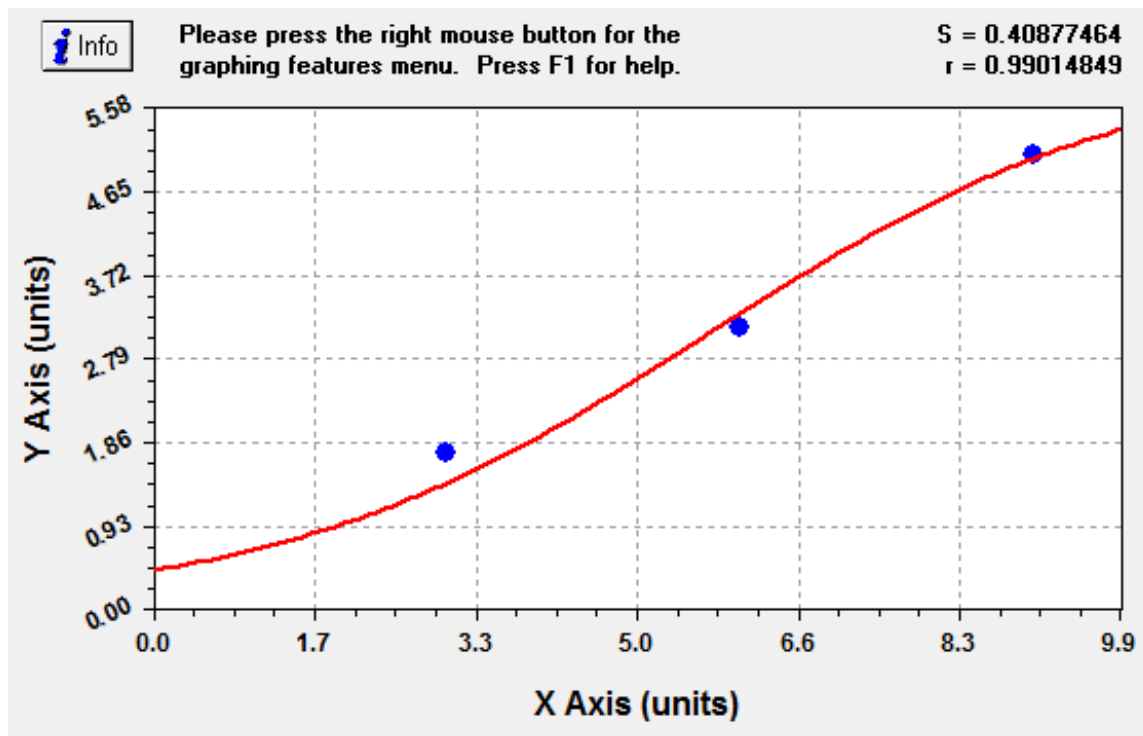
Logistic Model

$$y = \frac{a}{1 + be^{-cx}}$$

The parameters for the above model equation are given to the right in the coefficient list.

Coefficients:

a = 8.29751680255E+000
b = 1.70826172239E+001
c = 6.24499560746E-001



Logistic Model

$$y = \frac{a}{1 + be^{-cx}}$$

The parameters for the above model equation are given to the right in the coefficient list.

Coefficients:

a =	6.14320726002E+000
b =	1.28618034872E+001
c =	4.51382800775E-001

Anexo 5. Secuencias nucleotídicas de las cuatro cepas aisladas de cultivo de algodón trsngénico en el Valle de Mexicali, B.C.

F. solani T-ICA08

GenBank: KJ620371.1

TGGAAGTAAA AAGTCGTAAC AAGGTCTCCG TTGGTGAACC AGCGGAGGGA TCATTACCGA
GTTATACAAC TCATCAACCC TGTGAACATA CCTATAACGT TGCCTCGGCG GGAACAGACG
GCCCCGTAAC ACGGGCCGCC CCCGCCAGAG GACCCCTAA CTCTGTTTCT ATAATGTTTC
TTCTGAGTAA ACAAGCAAAT AAATTAAAAC TTTCAACAAC GGATCTCTTG GCTCTGGCAT
CGATGAAGAA CGCAGCGAAA TGCGATAAGT AATGTGAATT GCAGAATTCA GTGAATCATC
GAATCTTTGA ACGCACATTG CGCCCGCCAG TATTCTGGCG GGCATGCCTG TTCGAGCGTC
ATTACAACCC TCAGGCCCCC GGGCCTGGCG TTGGGGATCG GCGGAAGCCC CCTGCGGGCA
CAACGCCGTC CCCCAAATAC AGTGGCGGTC CCGCCGCAGC TTCCATTGCG TAGTAGCTAA
CACCTCGCAA CTGGAGAGCG GCGCGGCCAT CGCCGTAAAA CACCCAACCT GTGAATGCTG
TCATCGAATG CACGTGGAGC CTTCCAC

F. solani T-ICA01

GenBank: KJ620374.1

ACAGTAGGCT CAGAGTGAGA GTATTGTCGT GACATGGACA TATACTATAC ACGCTGGTAG
GAATAGCTAT AACGTTGCCT CGGCGGGAAC AGACGGCCCC GTAACACGGG CCGCCCCCGC
CAGAGGACCC CCTAACTCTG TTTCTATAAT GTTTCTTCTG AGTAAACAAG CAAATAAATT
AAAACTTTCA ACAACGGATC TCTTGGCTCT GGCATCGATG AAGAACGCAG CGAAATGCGA
TAAGTAATGT GAATTGCAGA ATTCAGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA CATTGCGCCC
GCCAGTATTC TGGCGGGCAT GCCTGTTCGA GCGTCATTAC AACCCCTCAGG CCCCCGGGCC
TGGCGTTGGG GATCGGCGGA AGCCCCCTGC GGGCACAACG CCGTCCCCCA AATACAGTGG
CGGTCCCGCC GCAGCTTCCA TTGCGTAGTA GCTAACACCT CGCAACTGGA GAGCGGCGCG
GCCACGCCGT AAAACACCCA ACTTCTGAAT GTTGACCTCG AATCAGGTAG GAATACCCCG
TGAACTTAAG CATATCAATA AGCGGAGGAA

F. solani T-ICA03

GenBank: KJ620372.1

CGCTGTGGGG TCAGAGTGAG TGTCAATTGTC GAGTTATGCA CACTACACTC TACCGCTGTA
GAACATACCT ATAACGTTGC CTCGGCGGGA ACAGACGGCC CCGTAACACG GGCCGCCCCC
GCCAGAGGAC CCCCTAACTC TGTTTCTATA ATGTTTCTTC TGAGTAAACA AGCAAATAAA
TTAAAAC TTTT CAACAACGGA TCTCTTGGCT CTGGCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAATGC
GATAAGTAAT GTGAATTGCA GAATTCAGTG AATCATCGAA TCTTTGAACG CACATTGCGC
CCGCCAGTAT TCTGGCGGGC ATGCCTGTTT GAGCGTCATT ACAACCCTCA GGCCCCCGGG
CCTGGCGTTG GGGATCGGCG GAAGCCCCCT GCGGGCACAA CGCCGTCCCC CAAATACAGT
GGCGGTCCCG CCGCAGCTTC CATTGCGTAG TAGCTAACAC CTCGCAACTG GAGAGCGGCG
CGGCCACGCC GTAAAACACC CAACTTCTGA ATGTTGACCT CGAATCAGGT AGGAATACCC
GCTGAACTTA AGCATATCAA TAAGCGGAGG A

F. solani T-ICA04

GenBank: KJ620371.1

TGGAAGTAAA AAGTCGTAAC AAGGTCTCCG TTGGTGAACC AGCGGAGGGA TCATTACCGA
GTTATACAAC TCATCAACCC TGTGAACATA CCTATAACGT TGCCTCGGCG GGAACAGACG
GCCCCGTAAC ACGGGCCGCC CCCGCCAGAG GACCCCCTAA CTCTGTTTCT ATAATGTTTC
TTCTGAGTAA ACAAGCAAAT AAATTAAAAC TTTCAACAAC GGATCTCTTG GCTCTGGCAT
CGATGAAGAA CGCAGCGAAA TGCGATAAGT AATGTGAATT GCAGAATTCA GTGAATCATC
GAATCTTTGA ACGCACATTG CGCCCGCCAG TATTCTGGCG GGCATGCCTG TTCGAGCGTC
ATTACAACCC TCAGGCCCCC GGGCCTGGCG TTGGGGATCG GCGGAAGCCC CCTGCGGGCA
CAACGCCGTC CCCCAAATAC AGTGGCGGTC CCGCCGCAGC TTCCATTGCG TAGTAGCTAA
CACCTCGCAA CTGGAGAGCG GCGCGGCCAT CGCCGTAAAA CACCCA ACTT GTGAATGCTG
TCATCGAATG CACGTGGAGC CTTCCAC

Anexo 6. Secuencias nucleotídicas para los alineamientos y construcción del árbol filogenético.

F. solani JN006817.1

GGAAGTAAAA AGTCGTAACA AGGTCTCCGT TGGTGAACCA GCGGAGGGAT CATTACCGAG
TTATACAACT CATCAACCCT GTGAACATAC CTATAACGTT GCCTCGGCGG GAACAGACGG
CCCCGTAACA CGGGCCGCC CCGCCAGAGG ACCCCCTAAC TCTGTTTCTA TAATGTTTCT
TCTGAGTAAA CAAGCAAATA AATTAAAAC TCAACAACG GATCTCTTGG CTCTGGCATC
GATGAAGAAC GCAGCGAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG
AATCTTTGAA CGCACATTGC GCCCGCCAGT ATTCTGGCGG GCATGCCTGT TCGAGCGTCA
TTACAACCCT CAGGCCCCCG GGCCTGGCGT TGGGGATCGG CGGAAGCCCC CTGCGGGCAC
AACGCCGTCC CCCAAATACA GTGGCGGTCC CGCCGCAGCT TCCATTGCGT AGTAGCTAAC
ACCTCGCAAC TGGAGAGCGG CGCGGCCACG CCGTAAAACA CCCAACTTCT GAATGTTGAC
CTCGAATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATCAT ACGGAGAA

F. solani JN006816.1

TGAAGTAAAA AGTCGTAACA AGGTCTCCGT TGGTGAACCA GCGGAGGGAT CATTACCGAG
TTATACAACT CATCAACCCT GTGAACATAC CTATAACGTT GCCTCGGCGG GAACAGACGG
CCCCGTAACA CGGGCCGCC CCGCCAGAGG ACCCCCTAAC TCTGTTTCTA TAATGTTTCT
TCTGAGTAAA CAAGCAAATA AATTAAAAC TCAACAACG GATCTCTTGG CTCTGGCATC
GATGAAGAAC GCAGCGAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG
AATCTTTGAA CGCACATTGC GCCCGCCAGT ATTCTGGCGG GCATGCCTGT TCGAGCGTCA
TTACAACCCT CAGGCCCCCG GGCCTGGCGT TGGGGATCGG CGGAAGCCCC CTGCGGGCAC
AACGCCGTCC CCCAAATACA GTGGCGGTCC CGCCGCAGCT TCCATTGCGT AGTAGCTAAC
ACCTCGCAAC TGGAGAGCGG CGCGGCCACG CCGTAAAACA CCCAACTTCT GAATGTTGAC
CTCGAATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC ATAGGCCGGG AAGGAA

F. solani KJ620369.1

GTGAAACGCC GCTATAACCT AACCCCGGA AAATGGAGGT GAAAGTGGTA AAAAGGGGAA
AACAAAAAAA AAGGAGAACC TGGAAGTAAA AATCGTAACA AGGTCTCCGT TGGTGAACCA
GCGGAGGGAT CATTACCGAG TTATACAACT CATCAACCCT GTGAACATAC CTATAACGTT
GCCTCGGCGG GAACAGACGG CCCCCTAAC CGGGCCGCC CCGCCAGAGG ACCCCCTAAC
TCTGTTTCTA TAATGTTTCT TCTGAGTAAA CAAGCAAATA AATTAAAAC TCAACAACG
GATCTCTTGG CTCTGGCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG
CAGAATTCAG TGAATCATCG AATCTTTGAA CGCACATTGC GCCCGCCAGT ATTCTGGCGG
GCATGCCTGT TCGAGCGTCA TTACAACCCT CAGGCCCCCG GGCCTGGCGT TGGGGATCGG
CGGAAGCCCC CTGCGGGCAC AACGCCGTCC CCCAAATACA GTGGCGGTCC CGCCGCAGCT
TCCATTGCGT AGTAGCTAAC ACCTCGCAAC TGGAGAGCGG CGCGGCCACG CCGTAAAACA
CCCAACTTCT GAATGTGACC TCGAATGCAC GTAGATCCCT CCAA

***F. solani* EU625405.1**

TTGGAAGTAA AAAGTCGTAA CAAGGTCTCC GTTGGTGAAC CAGCGGAGGG ATCATTACCG
AGTTATACAA CTCATCAACC CTGTGAACAT ACCTATAACG TTGCCTCGGC GGGAACAGAC
GGCCCCGTAA CACGGGCCGC CCCC GCCAGA GGACCCCTA ACTCTGTTTC TATAATGTTT
CTTCTGAGTA AACAAGCAAA TAAATTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGCTCTGGCA
TCGATGAAGA ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAATTC AGTGAATCAT
CGAATCTTTG AACGCACATT GCGCCCGCCA GTATTCTGGC GGGCATGCCT GTTCGAGCGT
CATTACAACC CTCAGGCCCC CGGGCCTGGC GTTGGGGATC GGCGGAAGCC CCCTGCGGGC
ACAACGCCGT CCCCCAAATA CAGTGGCGGT CCCGCCGAG CTTCATTGC GTAGTAGCTA
ACACCTCGCA ACTGGAGAGC GGCGCGGCCA CGCCGTAAAA CACCCA ACTT CTGAATGTTG
ACCTCGAATC AGGTAGGAAT ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCAAATTGGG GAGGGAAT

***F. solani* KP784419.1**

TTCCGTAGGG TGAACCTGCG GAGGGATCAT TACCGAGTTA TACA ACTCAT CAACCCTGTG
AACATACCTA TAACGTTGCC TCGGCGGGAA CAGACGGCCC CGTAACACGG GCCGCCCCCG
CCAGAGGACC CCCTAACTCT GTTTCTATAA TGTTTCTTCT GAGTAAACAA GCAAATAAAT
TAAA ACTTTC AACAACGGAT CTCTTGGCTC TGGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG
ATAAGTAATG TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACATTGCGCC
CGCCAGTATT CTGGCGGGCA TGCCTGTTTC AGCGTCATTA CAACCCTCAG GCCCCCGGGC
CTGGCGTTGG GGATCGGCGG AAGCCCCCTG CGGGCACAAC GCCGTCCCCC AAATACAGTG
GCGGTCCCGC CGCAGCTTCC ATTGCGTAGT AGCTAACACC TCGCAACTGG AGAGCGGCGC
GGCCACGCCG TAAAACACCC AACTTCTGAA TGTTGACCTC GAATCAGGTA GGAATACCCG
CTGAACTTAA GCATATCAAT AAGCGGAGGA A

***F. solani* KT366735.1**

TGGGTATCCG ATTTTACATC TCATCAACCC TGTGACATAC CTATAACGTT GCCTCGGCGG
GAACAGACGG CCCC GTAACA CGGGCCGCC CCGCCAGAGG ACCCCCTAAC TCTGTTTCTA
TAATGTTTCT TCTGAGTAAA CAAGCAAATA AATTAAA ACT TTCAACAACG GATCTCTTGG
CTCTGGCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG
TGAATCATCG AATCTTTGAA CGCACATTGC GCCCGCCAGT ATTCTGGCGG GCATGCCTGT
TCGAGCGTCA TTACAACCCT CAGGCCCCCG GGCTGGCGT TGGGGATCGG CGGAAGCCCC
CTGCGGGCAC AACGCCGTCC CCCAAATACA GTGGCGGTCC CGCCGCAGCT TCCATTGCGT
AGTAGCTAAC ACCTCGCAAC TGGAGAGCGG CGCGGCCACG CCGTAAAACA CCCA ACTTCT
GAATGTTGAC CTCGAATCAG GTAGGAATAC CCGCTGAACT TAAGCATATC AATAAGCGGA
GGAA

Anexo 7. Análisis estadísticos y tabla de ANOVA para porcentaje de severidad en plantas inoculadas con cuatro cepas de *F. solani*.

Análisis de Variancia: Porcentaje de severidad para el Día 3

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	21611.95	1652.9875	803.68	0.000000*	1.00000
S(A)	15	12.1875	0.8125			
Total (Adjusted)	19	2624.137				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.8125 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0	T-ICA01,T-ICA04,T-ICA03, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	29.75	Control, T-ICA01, T-ICA03, T-ICA08
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	32	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	16.875	Control, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	17.25	Control, T-ICA01, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Porcentaje de severidad para el Día 6

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	6148.967	1537.242	2550.03	0.000000*	1.00000
S(A)	15	9.0425	0.602813			
Total (Adjusted)	19	6158.009				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.602813 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0	T-ICA01,T-ICA04,T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	45.6	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	49.375	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	32.925	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	26.325	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Porcentaje de severidad para el Día 9

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	14164.55	354.137	18802.5	0.000000*	1.00000
S(A)	15	2.825	0.188833			
Total (Adjusted)	19	14167.37				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.18833 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0	T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03, T-ICA08
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	66.975	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	76.875	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	42.8	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	41.25	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Porcentaje de severidad para el Día 12

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	22150.77	5537.692	19695.4	0.000000*	1.00000
S(A)	15	4.2175	0.2811667			
Total (Adjusted)	19	22154.99				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.28116667 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0	T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03, T-ICA08
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	87.5	Control, T-ICA08, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	87.25	Control, T-ICA08, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	75.4	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	45.675	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Anexo 8. Análisis estadísticos y tabla de ANOVA para puntos de infección en plantas inoculadas con cuatro cepas de *F. solani*.

Análisis de Variancia: Puntos de Infección para el Día 0

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	0.2	0.05	1.00	0.438001	0.242216
S(A)	15	0.75	0.05			
Total (Adjusted)	19	0.95				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.05 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0	
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	0	
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	0	
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	0	
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	0.25	

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Puntos de Infección para el Día 3

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	18.8	4.7	4.70	0.011680*	0.858790
S(A)	15	15	1			
Total (Adjusted)	19	33.8				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=1 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	2.85	T-ICA01,T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	4.375	Control
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	7.2	Control
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	5.775	
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	3.15	

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Puntos de Infección para el Día 6

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	82	20.5	12.95	0.000093*	0.999590
S(A)	15	23.75	1.583333			
Total (Adjusted)	19	105.75				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=1.583333 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	2.85	T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	4.375	Control, T-ICA08
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	7.2	Control, T-ICA08, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	5.775	T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	3.15	T-ICA01, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Puntos de Infección para el Día 9

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	97.3	24.325	18.95	0.000010*	0.999997
S(A)	15	19.25	1.283333			
Total (Adjusted)	19	116.55				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=1.283333 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0.5	T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	6	Control, T-ICA08, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	6.25	Control, T-ICA08, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	3.25	Control, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	2.25	T-ICA01, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Puntos de Infección para el Día 12

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	102.3	25.575	26.92	0.000001*	1.00000
S(A)	15	14.25	0.95			
Total (Adjusted)	19	116.55				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.95 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0.75	T-ICA01,T-ICA08,T-ICA03, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	6.25	Control, T-ICA08, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	7	Control, T-ICA08, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	3.75	Control, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	3	Control, T-ICA01, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Anexo 9. Análisis estadísticos y tabla de ANOVA para eficiencia fotosintética en plantas inoculadas con cuatro cepas de *F. solani*.

Análisis de Variancia: Eficiencia Fotosintética para el Día 0

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	0.000053	1.325E-06	1.30	0.313286	0.3099494
S(A)	15	0.000015	1.01666E-06			
Total (Adjusted)	19	0.000002				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=1.01666E-06 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0.78275	
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	0.78275	
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	0.7835	
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	0.78375	
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	0.784	

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Eficiencia Fotosintética para el Día 3

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	0.001832	4.58175E-04	227.19	0.000000*	1.00000
S(A)	15	3.02E-05	2.01666E-06			
Total (Adjusted)	19	1.86E-03				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=2.016667E-06 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0.781	T-ICA01, T-ICA08, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	0.771	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	0.75525	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	0.78025	T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	0.77775	Control, T-ICA01, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Eficiencia Fotosintética para el Día 6

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	0.026905	0.0067263	5108.58	0.000000*	1.00000
S(A)	15	1.97E-05	1.31666E-06			
Total (Adjusted)	19	2.69E-02				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=1.316667E-06 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0.77875	T-ICA01,T-ICA08,T-ICA03, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	0.74725	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	0.67875	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	0.77325	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	0.76675	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Eficiencia Fotosintética para el Día 9

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	0.042049	1.05123E-02	2790.88	0.000000*	1.00000
S(A)	15	0.000056	3.76666E-06			
Total (Adjusted)	19	0.042105				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=3.766667E-06 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0.7735	T-ICA01,T-ICA08,T-ICA03, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	0.70525	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	0.653	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	0.767	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	0.75675	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: Eficiencia Fotosintética para el Día 12

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	0.044709	1.11774E-02	843.58	0.000000*	1.00000
S(A)	15	1.98E-04	1.325E-05			
Total (Adjusted)	19	4.49E-02				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=1.325E-05 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0.766	T-ICA01,T-ICA08,T-ICA03, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	0.677	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	0.64625	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	0.755	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	0.744	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Anexo 10. Análisis estadísticos y tabla de ANOVA para índice de verdor en plantas inoculadas con cuatro cepas de *F. solani*.

Análisis de Variancia: índice de verdor para el Día 0

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	150.3836	37.59589	302.92	0.000000*	1.00000
S(A)	15	1.861667	0.1241111			
Total (Adjusted)	19	152.2452				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.1241111 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	28.325	T-ICA01,T-ICA08,T-ICA03, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	30.26675	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	23.9	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	29.2	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	32.125	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: índice de verdor para el Día 3

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	170.6252	42.65631	306.27	0.000000*	1.00000
S(A)	15	2.089167	0.1392778			
Total (Adjusted)	19	172.7144				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.1392778 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	27.925	T-ICA04,T-ICA08,T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	28.075	T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	21.3	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	27.06667	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	29.875	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: índice de verdor para el Día 6

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	167.743	41.93575	514.55	0.000000*	1.00000
S(A)	15	1.2225	0.0815			
Total (Adjusted)	19	168.9655				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=0.0815 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	26.225	T-ICA01,T-ICA08,T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	25.5	Control, T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	19.425	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	26.125	T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	27.8	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: índice de verdor para el Día 9

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	241.472	60.368	1377.22	0.000000*	1.00000
S(A)	15	0.6575	4.38333E-02			
Total (Adjusted)	19	242.1295				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=4.383333E-02 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	25.075	T-ICA01,T-ICA08,T-ICA03, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	23.875	T-ICA08, T-ICA04, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	16.475	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	23.875	T-ICA08, T-ICA01, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	26.475	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Análisis de Variancia: índice de verdor para el Día 12

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	4	359.19	89.7975	1388.62	0.000000*	1.00000
S(A)	15	0.97	6.46666E-02			
Total (Adjusted)	19	360.16				
Total	20					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=15 MSE=6.466667E-02 Critical Value=4.3670

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	23.025	T-ICA01,T-ICA08,T-ICA03, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA01	4	21.425	Control, T-ICA08, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA03	4	12.425	Control, T-ICA08, T-ICA01, T-ICA04
<i>F. Solani</i> T-ICA04	4	21.6	Control, T-ICA08, T-ICA03
<i>F. Solani</i> T-ICA08	4	24.525	Control, T-ICA01, T-ICA04, T-ICA03

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Anexo 11. Solución extractora para cuantificar compuestos fenólicos.

Solución extractora para fenoles

Etanol	80%
H ₂ O	20%

Soluciones necesarias para determinación de fenoles totales.

Se prepara NaOH 0.1N y se le añaden 2 gr de carbonato de sodio (Na₂CO₃) por cada 100 ml de NaOH 0.1N.

Folin-Ciocalteu: Se añade partes iguales de agua para tener una concentración final de (50-50 v/v).

Solución extractora para flavonoides

Metanol	80%
H ₂ O	20%

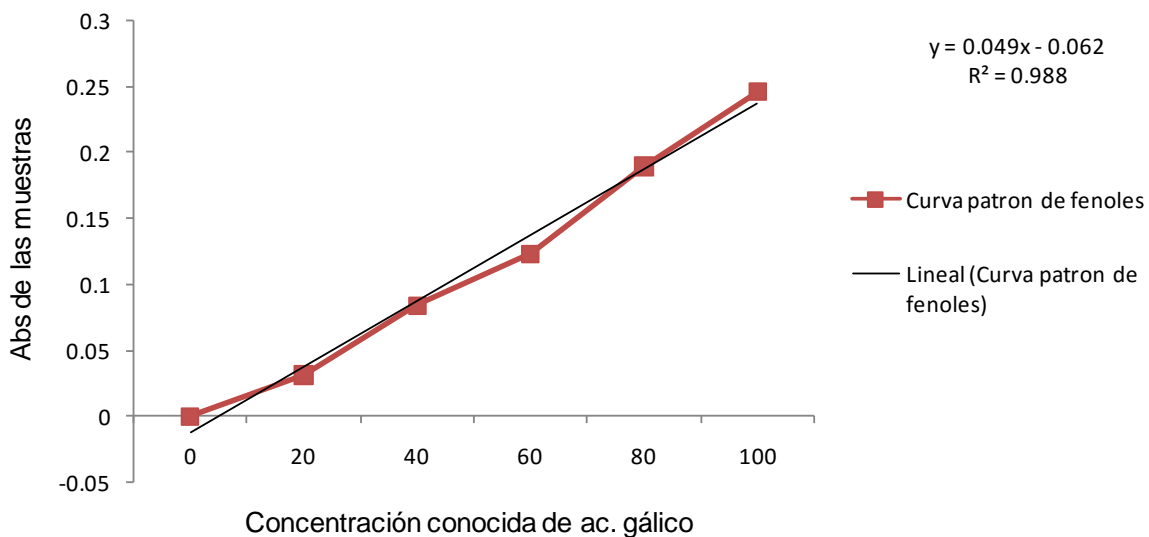
Soluciones necesarias para determinación de flavonoides totales.

Se prepara NaOH 0.1 M, NaNO₂ al 5% (w/v) con H₂O, AlCl₃ al 10% (w/v). Se prepara en campana de extracción con equipo de seguridad y oscuridad

Anexo 12. Curva patrón de ácido gálico utilizada para la cuantificación de fenoles totales por la técnica de Folin-Ciocalteu.

Para la preparación de la curva se toman 10 mg de ácido gálico y se diluyen en 10 ml de etanol ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), de ahí se diluye a la concentración requerida, se toman 100, 80, 60, 40, 20 y 0 μl de etanol mas 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μL de la solución madre con ácido gálico, posteriormente se añaden 0.4 mL de H_2O , 5 mL de NaOH y 0.5 mL de Folin-ciocalteu, al igual que las muestras se agita por vórtex y se espera 1 h para leer en el espectrofotómetro. Para hacer el cálculo se grafican los valores obtenidos de Abs en cada una de las concentraciones, se obtiene una curva y de despeja "x", se sustituyen los valores de Abs de las muestras en "y" y se obtiene el valor para corregir y obtener las unidades deseadas ($\text{mg de ac. gálico}\cdot\text{g}^{-1}$ de ps).

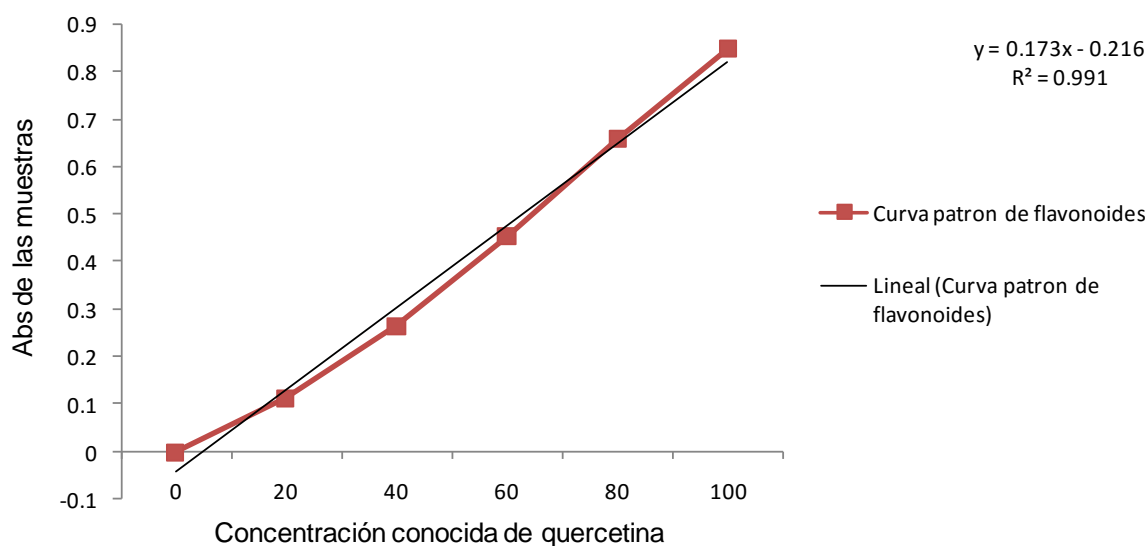
[] de ac. gálico	Curva patrón de fenoles
0	0
20	0.031
40	0.084
60	0.123
80	0.189
100	0.246



Anexo 13. Curva patrón de quercetina utilizada para la cuantificación de flavonoides totales por la técnica de Cloruro de Aluminio.

Para la preparación de la curva se toman 10 mg de quercetina y se diluyen en 10 mL de etanol ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), de ahí se diluye a la concentración requerida, se toman 100, 80, 60, 40, 20 y 0 μL de solución madre y 0, 920, 940, 960, 980 y 1000 μL de la solución de metanol, este se adiciona a la solución madre y se le añade la mezcla A como si fuera el extracto. Para hacer el cálculo se grafican los valores obtenidos de Abs en cada una de las concentraciones, se obtiene una curva y de despeja "x", se sustituyen los valores de Abs de las muestras en "y" y se obtiene el valor para corregir y obtener las unidades deseadas ($\text{mg de quercetina}\cdot\text{g}^{-1}$ de ps).

[] de quercetina	Curva patrón de flavonoides
0	0
20	0.114
40	0.266
60	0.454
80	0.659
100	0.847



Anexo 14. Gradiente de elución para la separación de ácidos fenólicos por HPLC.

Tiempo (min)	Solvente A (Metanol 100%)	Solvente B (Ácido fórmico 5% + Agua 95%)
0	12%	88%
8	24%	76%
22	24%	76%
32	36%	64%
33	36%	64%
42	48%	52%
43	12%	88%
50	12%	88%

Anexo 15. Gradiente de elución para la separación de ácidos flavonólicos por HPLC.

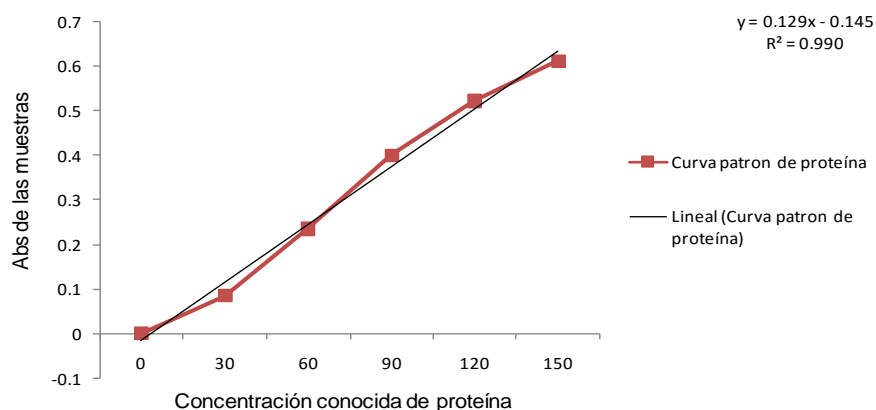
Tiempo (min)	Solvente A (Metanol 100%)	Solvente B (Ácido fórmico 5% + Agua 95%)
0	15%	85%
5	15%	85%
10	30%	70%
15	32%	68%
22	33%	67%
27	50%	50%
39	95%	5%
46	95%	5%
50	15%	85%

Anexo 16. Curva patrón para determinación de proteína total por BSA.

Para la curva estándar de proteína se prepara una solución madre de 10mg de albumina suero de bovino en 100 mL de agua destilada, posteriormente se realizan diluciones con la siguiente mezcla. Para hacer el cálculo se grafican los valores obtenidos de Abs en cada una de las concentraciones, se obtiene una curva y de despeja “x”, se sustituyen los valores de Abs de las muestras en “y” y se obtiene el valor para corregir y obtener las unidades deseadas ($\text{mg de proteína} \cdot \text{mL}^{-1}$).

μL de la solución madre de proteína	μL de agua destilada	μL de reactivo de Bradford
0	800	200
30	770	200
60	740	200
90	710	200
120	680	200
150	650	200

[] de proteína	Curva patrón de proteína
0	0
30	0.084
60	0.235
90	0.401
120	0.523
150	0.612



Anexo 17. Buffer de extracción para la determinación de la actividad enzimática de Peroxidasa (POD).

El buffer de extracción para la actividad enzimática de POD consistió en preparar una solución de Tris-HCl a 100 mM con 1% de polivinilpirrolidona, posteriormente se ajusta el pH a 7.1 (si el pH esta alcalino >7 se acidifica con HCl a 0.1M y si esta ácido <7 se alcaliniza con NaOH 0.1M), todo es preparado con agua desionizada.

Anexo 18. Buffer de ensayo para la determinación de la actividad enzimática de peroxidasa (POD)

El buffer de ensayo Tris-HCl se preparó a 100 mM con ajuste de pH 7.1.

Anexo 19. Soluciones usadas para la determinación de la actividad enzimática de peroxidasa (POD)

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se preparó al 25% (v/v) en agua desionizada.

El guayacol se preparó al 0.1M (Para diluirlo en agua hay que agitarlo intensamente hasta que las gotas de guayacol desaparezcan).

Anexo 20. Buffer de extracción DNS para la determinación de la actividad enzimática de Glucanasa (GLU).

Reactivos:

Hidróxido de sodio (NaOH) al 4%	25.4 mL
Acido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS)	0.744 g
Tartarato de sodio y potasio (TSP)	21.6 g

Se afora a 100 ml con agua destilada, desde el inicio de la preparación debe estar en constante agitación rápida (se disuelve como en 60 min).

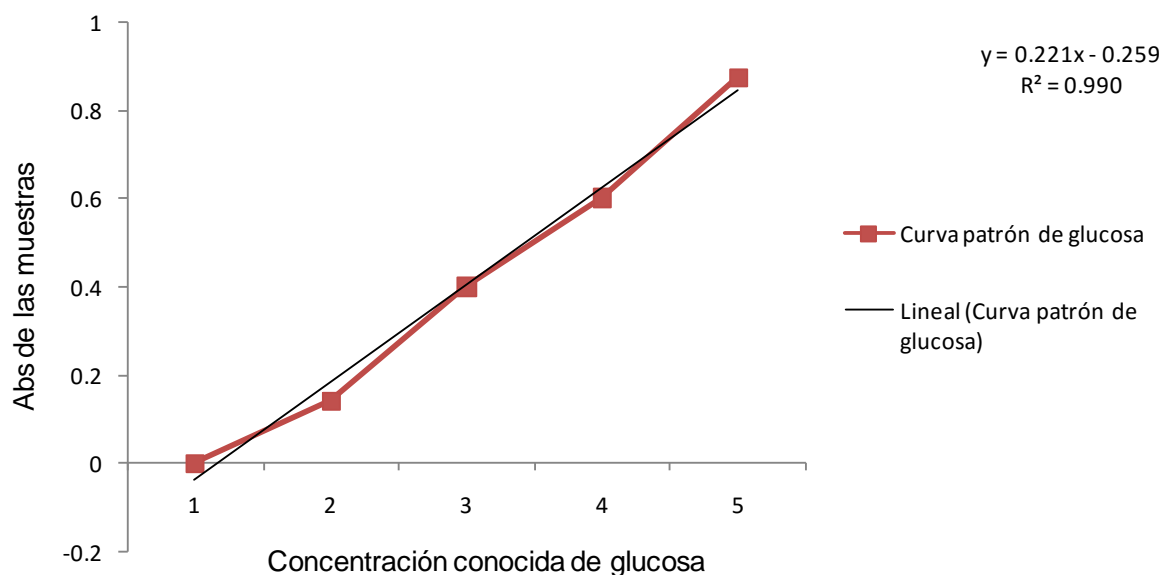
Para la mezcla primero es importante poner el DNS, posteriormente el NaOH y al final colocar el TSP.

Para la preparación del acetato de sodio 50 mM pH 5 (igual que para la medición) se toman 570 μ l de ácido acético glacial y se aforan a 50 ml. Se pesan 1.64 g de acetato de sodio y se aforan a 100 ml. Se toman 18.5 ml de la solución de ácido acético glacial y 44 ml de la solución de acetato de sodio, aforando finalmente a 250 ml.

Anexo 21. Curva estándar de glucosa para la determinación de azúcares reductores por DNS.

Para la curva estándar de glucosa se prepara una solución madre de 100 mg de glucosa en 100 mL de agua destilada (pesar 1 g de glucosa en 10 mL de agua), posteriormente se realizan diluciones tomando 20, 40, 60, 80 μL de la solución madre de glucosa mas 980, 960, 940, 920 μL de agua respectivamente. Se tomaron 250 μL + 750 μL de buffer de acetato, esta se incubó por 1.5 h a 40 °C, se detiene la reacción agregando 500 μL de DNS y se vuelve a incubar por 5 min a 100 °C, para registrar la lectura en el espectrofotómetro a 540 nm. Para hacer el cálculo se grafican los valores obtenidos de Abs en cada una de las concentraciones, se obtiene una curva y de despeja "x", se sustituyen los valores de Abs de las muestras en "y" y se obtiene el valor para corregir y obtener las unidades deseadas ($\text{mg de glucosa} \cdot \text{mL}^{-1}$).

[] de glucosa	Curva patrón de glucosa
0	0
20	0.142
40	0.401
60	0.602
80	0.875



Anexo 22 y 23. Buffer de extracción y soluciones para la determinación de la actividad enzimática de quitinasas (QUI).

El buffer de extracción consistió en acetato de sodio 100 mM ajustando el pH a 5.5, posteriormente se le añade β -mercaptoetanol al 0.1% y es preparado con agua desionizada.

El buffer de ensayo fue preparado con fosfato de sodio 50 mM con ajuste de pH.

El quitotriósido se disuelve en el buffer de fosfatos tomando 1 mL por cada 1,600 Unidades (chechar en el reactivo las unidades).

Todo el proceso se realiza en oscuridad y con hielo.

Anexo 24. Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática de quitinasa.



Anexo 25. Analisis estadístico de Fenoles totales, así como tabla de ANOVA.

Análisis de Variancia: Compuestos Fenólicos Totales

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	1	163.805	163.805	498.90	0.0000*	1.00000
S(A)	6	1.97	0.3283333			
Total (Adjusted)	7	165.775				
Total	8					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=6 MSE=0.3283333 Critical Value=3.4605

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	33.75	Tratamiento
Tratamiento	4	42.8	Control

Notes:

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Anexo 26. Análisis estadístico de Flavonoides totales, así como tabla de ANOVA.

Análisis de Variancia: Compuestos Flavonoides Totales

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	1	499560.6	499560.6	63223.53	0.0000*	1.00000
S(A)	6	47.40899	7.901497			
Total (Adjusted)	7	499608				
Total	8					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

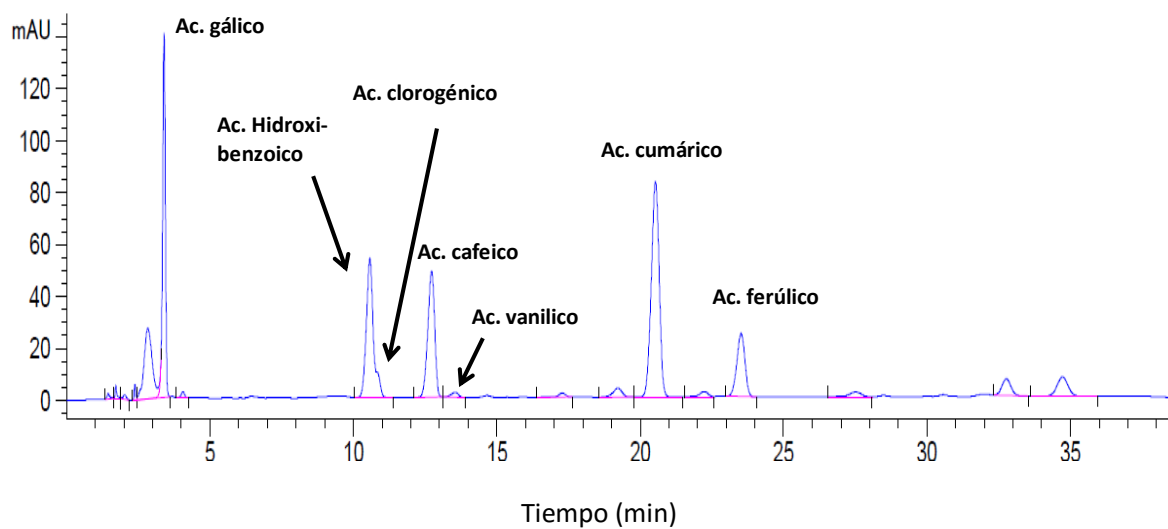
Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=6 MSE=7.901497 Critical Value=3.4605

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	899.25	Tratamiento
Tratamiento	4	1399.03	Control

Notes:

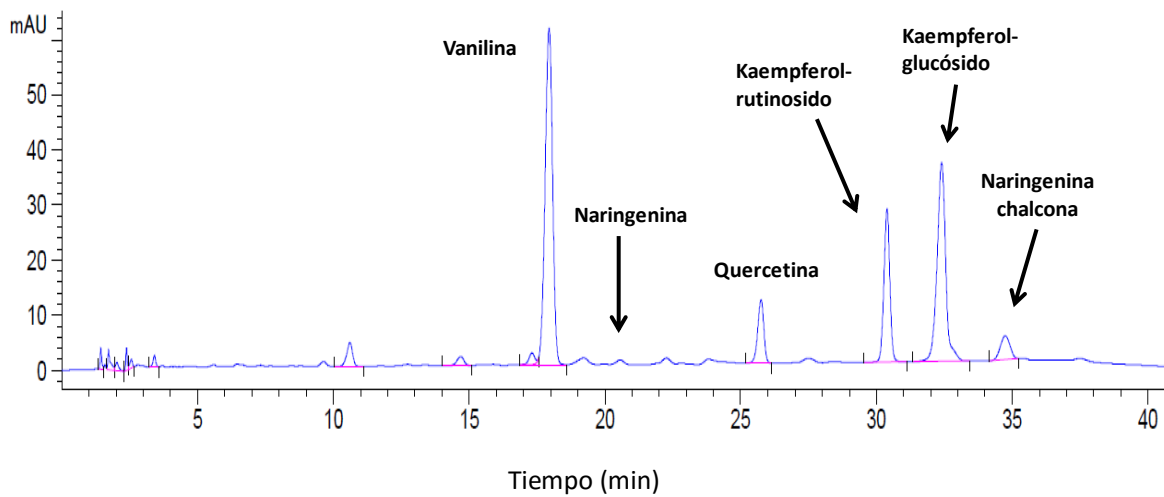
This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Anexo 27. Perfil cromatográfico y tiempos de retención de estándares de ácidos fenólicos.



Absorbancia: 280 nm

Anexo 28. Perfil cromatográfico y tiempos de retención de estándares de compuestos flavonoides.



Absorbancia: 270 nm

Anexo 29. Análisis estadísticos y tabla de ANOVA en la determinación de PAL en plantas de algodón transgénico con y sin inocular *T. longibrachiatum* ICA-4.

Análisis de Variancia: Actividad de PAL

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	1	3.82E-04	3.8226E-04	208.17	0.000000*	1.00000
S(A)	6	1.10E-05	1.83625E-06			
Total (Adjusted)	7	3.93E-04				
Total	8					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=6 MSE=1.83625E-06 Critical Value=3.4605

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	0.007725	Tratamiento
Tratamiento	4	0.02155	Control

Notes:

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Anexo 30. Análisis estadísticos y tabla de ANOVA en la determinación de POD en plantas de algodón transgénico con y sin inocular *T. longibrachiatum* ICA-4.

Análisis de Variancia: Actividad de Peroxidasas

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	1	5.45E+10	5.43905E+10	3682.90	0.000000*	1.00000
S(A)	6	8.86E+07	1.47683E+07			
Total (Adjusted)	7	5.44E+10				
Total	8					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=6 1.476838E+07 Critical Value=3.4605

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	326536.7	Tratamiento
Tratamiento	4	491446.5	Control

Notes:

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Anexo 31. Análisis estadísticos y tabla de ANOVA en la determinación de GLU en plantas de algodón transgénico con y sin inocular *T. longibrachiatum* ICA-4.

Análisis de Variancia: Actividad de Glucanasas

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: TRAT	1	980.647	980.647	991.68	0.000000*	1.00000
S(A)	6	5.93323	0.9888716			
Total (Adjusted)	7	986.5803				
Total	8					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=6 MSE=0.9888716 Critical Value=3.4605

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	83.01325	Tratamiento
Tratamiento	4	105.1565	Control

Notes:

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.

Anexo 32. Análisis estadísticos y tabla de ANOVA en la determinación de QUI en plantas de algodón transgénico con y sin inocular *T. longibrachiatum* ICA-4.

Análisis de Variancia: Actividad de Quitinasas

Analysis of Variance Table						
Source		Sum of	Mean		Prob	Power
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	(Alpha=0.05)
A: TRAT	1	119528.2	119528.2	115500.80	0.0000*	1.00000
S(A)	6	6.209216	1.034869			
Total (Adjusted)	7	119534.4				
Total	8					

*Term significant alpha=0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparasion Test

Alpha=0.05 Error Term=S(A) DF=6 MSE=1.034869 Critical Value=3.4605

Group	Count	Mean	Different From Groups
Control	4	272.5268	Tratamiento
Tratamiento	4	516.9938	Control

Notes:

This report provides multiple comparasion test for all pairwise differences between the means.