

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA
Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A. C**



POSGRADO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

TITULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

**MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE *Trichoderma* sp. Y
PATOGENESIS DE *Fusarium oxysporum* EN EL NARDO
(*Polianthes tuberosa*)**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

Presenta:

IPB. SAMUEL MEDINA FUENTES

Director de Tesis:

DR. JOAQUÍN ALEJANDRO QUI ZAPATA

LIBERACIÓN DIRECTOR DE TESIS



Guadalajara, Jalisco a 30 de Junio de 2016

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO PRESENTE

El que suscribe Joaquín Alejandro Qui Zapata director de tesis del estudiante Samuel Medina Fuentes, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE *Trichoderma* sp. Y PATOGENESIS DE *Fusarium oxysporum* EN EL NARDO (*Polianthes tuberosa*)**” aceptó que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmo la presente a los 30 días del mes de Junio del año 2016.

DIRECTOR DE TESIS

Joaquín Alejandro Qui Zapata

LIBERACIÓN DEL SÍNODO



Guadalajara, Jalisco a 30 de Junio de 2016

Dr. Ernesto Tapia Campos
Coordinador Académico de la Maestría
en Ciencias de la Floricultura
Guadalajara, Jalisco

Los que suscriben integrantes del jurado de examen de grado del estudiante **Samuel Medina Fuentes**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE *Trichoderma* sp. Y PATOGENESIS DE *Fusarium oxysporum* EN EL NARDO (*Polianthes tuberosa*)**” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 30 días del mes de Junio del año 2016.

Presidente

Secretario

Vocal

Vocal

Vocal

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo incondicional, en especial a mi madre Nancy Fuentes, gracias por todo.

A Joaquín Alejandro Qui Zapata mi director de tesis, por la orientación que me brindo en este periodo y por ser más que un asesor, un amigo.

A compañeros y amigos, que siempre estuvimos atentos para apoyarnos en los que fuera necesario, tanto en lo académico como en lo personal.

A CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco) por ser parte fundamental de estos logros gracias a las instalaciones de laboratorio y equipamiento necesario para elaborar las distintas pruebas.

A CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo académico y económico brindado durante este periodo.

DEDICATORIA

A mi familia, amigos, profesores y a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en este logro.

A CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco) que fué parte fundamente de mi formación en estos últimos años.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. NARDO (<i>Polianthes tuberosa</i>)	2
2.2. Importancia y usos	2
2.3. Problemas fitosanitarios	3
2.3.1. Plagas y enfermedades	3
2.4. <i>Fusarium oxysporum</i> y sus mecanismos de patogénesis	4
2.5. <i>Trichoderma</i> sp. y sus mecanismos de patogénesis	7
2.6. Interacción planta-patógeno-antagonista	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	13
5.1. Objetivo General	13
5.2. Objetivos Específicos	13
6. METODOLOGÍA	14
6.1. AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A LA RAÍZ Y BULBO DEL NARDO Y EN ESPECIES SILVESTRES DEL GENERO <i>Polianthes</i>	14
6.1.1. AISLAMIENTOS DE HONGOS ASOCIADOS A LA RAÍZ Y BULBO DEL NARDO	15
6.1.2. Identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> .	15
6.1.3. Aislamiento e identificación de <i>Phytophthora</i> spp.	16
6.2. Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. asociados a la rizósfera de especies silvestres del género <i>Polianthes</i> .	16
6.2.1. Aislamiento e identificación de <i>Trichoderma</i> spp.	16
6.3. Extracción de compuestos anti fúngicos de <i>Polianthes tuberosa</i>	17
6.3.1. Extracción de fitoanticipinas (saponinas) provenientes del bulbo y raíz del Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>).	17
6.3.2. Cuantificación de saponinas por espectrofotometría	17
6.4. Evaluación de los mecanismos de patogénesis de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> .	18
6.4.1. Evaluación de la colonización y penetración de raíces de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) por <i>Fusarium oxysporum</i> .	18

6.4.2. Evaluación de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal (Pectinasas).	19
6.4.3. Resistencia al estrés oxidativo por producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) de <i>F. oxysporum</i> frente a Paraquat (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) como indicador de oxidación-reducción en pruebas <i>in vitro</i> .	20
6.4.4. Tolerancia de <i>Fusarium oxysporum</i> frente fitoanticipinas (Saponinas) producidas por el Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>).	20
6.4.4.1. Evaluación de enzimas que inhiben la producción de fitoanticipinas (Saponinas) del Nardo .	21
6.4.5. Evaluación de mecanismos de patogénesis de <i>Fusarium oxysporum in planta</i> .	22
6.4.5.1. Tinción y observación de raíces de los tratamientos en pruebas de patogenicidad.	23
6.4.6. Evaluación del daño en raíces de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) por la producción de Fitotoxinas por <i>Fusarium oxysporum</i> .	23
6.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTECTORA DE AISLAMIENTOS DE <i>Trichoderma</i> sp.	24
6.5.1. Evaluación de los mecanismos de protección de aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp.	24
6.5.2. Prueba de colonización de raíces de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) por aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	24
6.5.3. Prueba de antagonismo directo (cultivos duales) <i>in vitro</i> .	25
6.5.4. Producción de enzimas antifúngicas de <i>Trichoderma</i> spp. (quitinasas y glucanasas).	26
6.5.4.1. Extracción de enzimas quitinasas y glucanasas de <i>Trichoderma</i> spp.	26
6.5.4.2. Viabilidad celular de <i>Fusarium oxysporum</i> frente a quitinasas y glucanasas producidas por aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp.	26
6.5.5. Producción de metabolitos antifúngicos de bajo peso molecular producidos por <i>Tichoderma</i> spp.	28
6.5.5.1. Viabilidad celular de <i>Fusarium oxysporum</i> frente a metabolitos antifungicos de bajo peso molecular producidos por aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp.	29
6.5.6. Evaluación de la actividad protectora de los aislamientos de <i>Trichoderma in planta</i> .	30
6.5.6.1. Observación de la colonización de las raíces recuperadas de las plantas utilizadas en la prueba de protección.	31
7. RESULTADOS	33
7.1 Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.	33
7.2. Evaluación de la colonización y penetración a la raíz del Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) por aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> .	35

7.3. Evaluación de la producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal (Pectinasas) por <i>Fusarium oxysporum</i> .	39
7.4. Evaluación de la resistencia de <i>Fusarium oxysporum</i> al estrés oxidativo <i>in vitro</i> .	42
7.5. Evaluación de la resistencia de <i>Fusarium oxysporum</i> a las fitoanticipinas de raíces y bulbo del nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>)	45
7.6. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>).	47
7.7. Producción de fitotoxinas por <i>Fusarium oxysporum</i> .	54
7.8. Correlación entre la evaluación de los mecanismos de patogénesis <i>in vitro</i> y la evaluación <i>in planta</i> .	56
7.9. Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp	58
7.10. Evaluación de antagonismo <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp. (Cultivo Duales)	60
7.11. Evaluación de la colonización de raíces de nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) por aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp.	64
7.12. Producción de enzimas antifúngicas (quitinasas y glucanasas) por aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	66
7.13. Producción de metabolitos secundarios de bajo peso molecular por aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	69
7.14. Evaluación de protección a la infección de <i>Fusarium oxysporum</i> de plantas de nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) de aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp..	71
7.15. Correlación entre la evaluación de los mecanismos de protección <i>in vitro</i> y la evaluación <i>in planta</i> .	77
8. DISCUSIÓN	80
8.1. Correlación entre los mecanismos de patogénesis de <i>Fusarium oxysporum</i> . evaluados <i>in vitro</i> con su patogenicidad <i>in planta</i>	80
8.2. Correlación entre los mecanismos de protección de <i>Trichoderma</i> evaluados <i>in vitro</i> con su protección <i>in planta</i>	84
9. CONCLUSIÓN	90
10. BIBLIOGRAFÍA	91

INDICE DE FIGURAS

Figura 7.1. Evaluación de la colonización y penetración a la raíz del Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) por aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> .	36
Figura 7.2. Evaluación de la colonización y penetración a la raíz del Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) por aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> .	37
Figura 7.3. Evaluación de la penetración de raíces de nardo de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> .	38
Figura 7.4. Evaluación de la producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal (Pectinasas) por <i>Fusarium oxysporum</i> .	40
Figura 7.5. Evaluación de la producción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal (Pectinasas) por <i>Fusarium oxysporum</i>	41
Figura 7.6. Evaluación de la resistencia de <i>Fusarium oxysporum</i> al estrés oxidativo <i>in vitro</i> .	44
Figura 7.7. Evaluación de la resistencia a fitoanticipinas del nardo de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> por medio de sensidiscos.	46
Figura 7.8. Evaluación de la resistencia de <i>Fusarium oxysporum</i> a las fitoanticipanas de raíces y bulbo del nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>).	47
Figura 7.9. Escala de severidad de la enfermedad de <i>F. oxysporum</i> en plantas de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>).	49
Figura 7.10. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) 30 días después de su inoculación.	50
Figura 7.11. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) 30 días después de su inoculación.	51
Figura 7.12. Desarrollo de la enfermedad de cada aislamiento después de 60 días de inoculado en plantas de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>).	52
Figura 7.13. Colonización de raíces de nardo por los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> .	53
Figura 7.14. Inducción de fitotoxicidad por el aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> POF1 en raíces de nardo.	55
Figura 7.15. Evaluación de antagonismo <i>in vitro</i> de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp. (Cultivos Duales).	62
Figura 7.16. Evaluación del antagonismo <i>in vitro</i> de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp. seleccionados (Cultivos Duales).	63

Figura 7.17. Evaluación de la colonización de raíces de nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) por aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp.	65
Figura 7.18. Efecto antifúngico de las quitinasas producidas por cada aislamiento de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i>	67
Figura 7.19. Efecto antifúngico de las glucanasas producidas por cada aislamiento de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i>	68
Figura 7.20. Efecto antifúngico de los metabolitos secundarios producidos por cada aislamiento de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i>	70
Figura 7.21. Escala de protección de aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp. contra <i>Fusarium oxysporum</i> .	72
Figura 7.22. Síntomas en plantas de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) durante la evaluación de la protección de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp. frente a <i>Fusarium oxysporum</i> a los 20 días después de la inoculación del patógeno.	73
Figura 7.23. Síntomas en plantas de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) durante la evaluación de la protección de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp. frente a <i>Fusarium oxysporum</i> a los 40 días después de la inoculación del patógeno.	74
Figura 7.24. Desarrollo de la protección de cada aislamiento de <i>Trichoderma</i> sp después de 40 días de confrontarse con <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>).	75
Figura 7.25. Colonización de raíces por <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Fusarium oxysporum</i> en raíces de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>) después de la evaluación de protección.	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 6.1. Sitios de colecta de especies silvestres y cultivos comerciales de <i>Polianthes</i> .	14
Tabla 6.2. Evaluación de la tolerancia de <i>Fusarium oxysporum</i> frente a fitoanticipinas (Saponinas).	21
Tabla 6.3. Pruebas de Patogenicidad de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de Nardo (<i>Polianthes tuberosa</i>).	23
Tabla 6.4. Tratamientos con quitinasas para prueba de viabilidad celular de <i>F. oxysporum</i> .	28
Tabla 6.5. Tratamientos con glucanasas para prueba de viabilidad celular de <i>F. oxysporum</i> .	28
Tabla 6.6. Tratamientos con Metabolitos antifungios de bajo peso molecular para prueba de viabilidad celular de <i>F. oxysporum</i> .	30
Tabla 6.7. Prueba de protección de aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp. contra un aislamientos patogénico seleccionado de <i>F. oxysporum</i> en plantas de Nardo (<i>Polianthes tubrosa</i>).	31
Tabla 7.1. Total de aislamientos pertenecientes al género <i>Fusarium</i> recuperados de diferentes sitios de colecta, rizósfera, material vegetal y medios selectivos.	33
Tabla 7.2. Índice de patogénesis <i>in planta</i> .	57
Tabla 7.3. Relación cualitativa entre la evaluación de los mecanismos de patogénesis <i>in vitro</i> y la evaluación <i>in planta</i> .	57
Tabla 7.4. Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. obtenidos a partir de <i>Polianthes tuberosa</i> y especies silvestres de <i>Polianthes</i> sp.	58
Tabla 7.5. Determinación del grado de antagonismo <i>in vitro</i> de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> seleccionados contra <i>Fusarium oxysporum</i> (POF1).	64
Tabla 7.6. Determinación del grado de producción de enzimas con actividad de quitinasas para cada aislamiento de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i> (POF1).	67
Tabla 7.7. Determinación del grado de producción de enzimas con actividad de glucanasas para cada aislamiento de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i> (POF1).	68
Tabla 7.8. Determinación del grado de producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica para cada aislamiento de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i> (POF1).	70
Tabla 7.9. Índice de protección de los aislamientos de <i>Trichoderma in planta</i> .	77
Tabla 7.10. Relación cualitativa entre la evaluación de los mecanismos de protección <i>in vitro</i> y la evaluación de protección <i>in planta</i> de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> sp.	78
Tabla 7.11. Relación cualitativa entre el antagonismo <i>in vitro</i> y la protección <i>in planta</i> .	79

RESUMEN

El nardo (*Polianthes tuberosa*) es una planta cuya flor es comercializada en distintas zonas de México y el mundo, siendo el estado de Morelos el mayor productor y exportador a nivel nacional. El nardo al igual que muchos cultivos de campo presenta problemas fitosanitarios, particularmente este cultivo presenta pudrición en sus órganos de reserva, ya que se trata de una planta bulbosa y sus bulbos permanecen en el suelo durante cierto tiempo para lograr alcanzar un calibre de cosecha, momento en el cual los microorganismos patógenos del suelo como *Fusarium oxysporum* son oportunistas e infectan a los bulbos. En el presente trabajo se estableció una prueba de patogenicidad utilizando aislamientos patógenos de *F. oxysporum* asociados a bulbos del nardo con problemas de pudrición y posterior a las pruebas de patogenicidad se realizó una prueba de protección donde el agente patógeno fue un aislamiento de *F. oxysporum* seleccionado de la prueba de patogenicidad previamente establecida y como control biológico se utilizaron 10 aislamientos de *Trichoderma* spp. asociados a especies silvestres del género *Polianthes* provenientes del estado de Jalisco y estados vecinos. Este trabajo fue realizado en condiciones de invernadero donde se mantuvo un control de temperatura y humedad relativa, como evaluación se tomaron muestras de bulbo y raíz cada 20 días hasta el día 60, tomando fotos de la parte foliar y la parte bulbosa de las plantas para la observación de marchitez foliar y daños en la zona vascular del bulbo y raíz con ayuda de un microscopio óptico para evidenciar la protección que mostraba cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* frente a *F. oxysporum*. La selección del patógeno y de los antagonistas se realizó mediante pruebas *in vitro*, en este caso para la selección del aislamiento patogénico de *F. oxysporum* se utilizó un medio selectivo para esta especie, posteriormente se realizó una prueba de patogenicidad donde se observó que el aislamiento F-2 fue el que mostró un mayor daño en el bulbo y raíces de las plantas tratadas. Para corroborar la patogenicidad de este aislamiento se realizaron pruebas de selección que consistieron en someter a distintos aislamientos de *F. oxysporum* a diferentes pruebas *in vitro*, en las cuales mostraron con una mayor certeza la capacidad de virulencia que mostraba cada aislamiento. Las pruebas realizadas fueron pruebas de producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal (pectinasas), pruebas de resistencia al estrés oxidativo, resistencia a saponinas producidas por el nardo y pruebas de colonización de raíz, de las cuales el aislamiento F-2 fue el que mostró una mayor capacidad para causar la enfermedad en pruebas *in vitro* relacionándolo de forma directa con la virulencia mostrada en pruebas *in vivo* con plantas de nardo ya que en pruebas de producción de enzimas que degradan la pared celular fue el tratamiento que mostro un crecimiento mayor al 60%. Por otra parte, en el caso de la selección de los aislamientos antagonistas de igual manera se realizaron pruebas *in vitro*, principalmente pruebas de antagonismo rápidas para la selección de 10 aislamientos. El primer filtro de selección fue con pruebas de colonización de raíz para seleccionar aislamientos que se colonizan y penetran las raíces del nardo, el segundo filtro consistió en confrontar los

aislamientos seleccionados de *Trichoderma* sp. con el aislamiento patogénico seleccionado en pruebas de confrontación directa (cultivos duales), prueba en la cual se seleccionaron los 10 aislamientos que mostraron un efecto antagónico contra *F.oxysporum*. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas, donde se procedió con la extracción de enzimas líticas (quitinasas y glucanasas) y metabolitos antifúngico de los aislamientos de *Trichoderma* sp. para utilizarlas directamente contra el aislamiento patogénico mediante pruebas *in vitro*, las cuales consistieron en someter a los conidios de *F. oxysporum* al efecto de las enzimas líticas y los metabolitos antifúngicos y posterior a este proceso observar la viabilidad celular mediante pruebas de tinción con sales de cloruro de tetrazolium (TTC) y de esta manera medir por espectrofotómetro qué tratamiento fue el que causó un mayor efecto en la viabilidad celular de *F. oxysporum*. En las pruebas de antagonismo *in vitro* contra *F. oxysporum* todos los aislamientos de *Trichoderma* sp. mostraron tener capacidad antagónica contra el fitopatógeno, ya que la evaluación se realizó de forma cualitativa por observaciones después de cinco días de confrontación. En el caso de las pruebas enzimáticas (quitinasas y glucanasas) y producción de metabolitos secundarios antifúngicos, los aislamientos de mayor relevancia fueron T2, T8 y T10 los cuales mostraron gran diferencia significativa con respecto al resto de los tratamientos en la mayoría de las pruebas bioquímicas. En las pruebas de quitinasas T2 fue el que mostró una mayor inhibición de *F. oxysporum* dando como resultado una viabilidad celular del 51% y T10 un 61%. En pruebas de Glucanasas fue T8 el que mostró un mayor efecto inhibitorio, mostrando como resultado una viabilidad celular del patógeno de 63%, menor a la viabilidad que mostraron los tratamientos T2 con un 80% y T10 con un 84%. En el caso de producción de metabolitos secundarios, de nueva cuenta T2 y T10 fueron los tratamientos que mostraron una mayor inhibición del patógeno, mostrando una viabilidad celular del patógeno de 65% en el tratamiento con T2 y del 68% en el tratamiento T10. En el caso de protección en planta, los tratamientos que mostraron el mayor grado de protección fueron T2, T6 y T10, mostrando un grado de protección de arriba del 90% de plantas vivas en los tratamientos.

Palabras clave: *Trichoderma* sp., patogenicidad, *Fusarium oxysporum*, antagonismo.

ABSTRACT

Nardo (*Polianthes tuberosa*) is a plant whose flower is marketed in different areas of México and the world, the state of Morelos being the largest producer and exporter nationwide. The nardo, like many field crops, presents phytosanitary problems, particularly this crop presents rot in its reserve organs, since it is a bulbous plant and its bulbs remain in the soil for a certain time to reach a caliber of harvest, at which point soil pathogens such as *Fusarium oxysporum* are opportunistic and infect bulbs. In the present work a pathogenicity test was established using pathogenic isolates of *F. oxysporum* associated with bulbs of the nard with rotting problems and after the pathogenicity tests a protection test was carried out where the pathogen was an isolation of *F. oxysporum* selected from the previously established pathogenicity test and as biological control were used 10 isolates of *Trichoderma* spp. associated with wild species of the genus *Polianthes* from the state of Jalisco and neighboring states. This work was carried out under greenhouse conditions where a control of temperature and relative humidity was maintained, as an evaluation of bulb and root samples were taken every 20 days until day 60, taking photos of the leaf part and the bulbous part of the plants for the observation of foliar wilt and damages in the vascular area of the bulb and root with the aid of an optical microscope to demonstrate the protection that showed each of the isolates of *Trichoderma* against *F. oxysporum*. The selection of the pathogen and the antagonists was performed by *in vitro* tests, in this case for the selection of the pathogenic isolation of *F. oxysporum* a selective medium was used for this species, later a pathogenicity test was carried out where it was observed that the isolation F-2 was the one that showed greater damage in the bulbs and roots of the treated plants. In order to corroborate the pathogenicity of this isolate, selection tests were carried out, which consisted in subjecting different isolates of *F. oxysporum* to different *in vitro* tests, in which they showed with greater certainty the virulence capacity of each isolate. The tests carried out were tests for the production of enzymes that degrade the plant cell wall (pectinase), oxidative stress resistance tests, resistance to saponins produced by the nardo and root colonization tests, of which the F-2 isolation was the which showed a greater capacity to cause the disease *in vitro* tests directly relating it to the virulence shown in tests *in vivo* with plants of nardo since in tests of production of enzymes that degrade the cell wall was the treatment that showed a greater growth to 60%. On the other hand, in the case of the selection of the antagonist isolates, *in vitro* tests, mainly rapid antagonism tests were carried out for the selection of 10 isolates. The first selection filter was with root colonization tests to select isolates that are associated and penetrate roots of the nardo, the second filter consisted of comparing the selected isolates of *Trichoderma* sp. with the pathogenic isolation selected in direct confrontation tests (dual cultures), in which the 10 isolates that showed an antagonistic effect against *F.oxysporum* were selected. Subsequently, biochemical tests were carried out, where lytic enzymes (chitinases and glucanases) and antifungal metabolites were extracted from the isolates of *Trichoderma* sp. to use them directly against the pathogenic isolation by *in vitro* tests which consisted in

subjecting the conidia of *F. oxysporum* to the effect of the lytic enzymes and the antifungal metabolites and after this process to observe the cellular viability by means of tests of staining with chloride salts of tetrazolium (TTC) and thus measure by spectrophotometer that treatment was the one that caused a greater effect on the cellular viability of *F. oxysporum*. In the tests of *in vitro* antagonism against *F. oxysporum* all isolates of *Trichoderma* sp. showed to have antagonistic capacity against the phytopathogen since the evaluation was carried out qualitatively by observations after five days of confrontation. In the case of enzymatic tests (chitinases and glucanases) and production of antifungal secondary metabolites, the most relevant isolates were T2, T8 and T10, which showed a significant difference with respect to the rest of the treatments in almost all the biochemical tests. In the T2 chitinase tests, it was the one that showed a greater inhibition of *F. oxysporum* resulting in a cell viability of 51% and T10 of 61%. In Glucanase tests, it was T8 that showed a greater inhibitory effect, resulting in a cellular viability of the pathogen of 63%, less than the viability shown by T2 treatments with 80% and T10 with 84%. In the case of the production of secondary metabolites of new count, T2 and T10 were the treatments that showed a greater inhibition of the pathogen, showing a cellular viability of the pathogen of 65% in the treatment with T2 and 68% in the T10 treatment. In the case of the protection test, treatments that showed the highest degree of protection were T2, T6 and T10 showing a degree of protection of above 90% of live plants in the treatments.

Key words: *Trichoderma* sp., Pathogenicity, *Fusarium oxysporum*, antagonis.

1. INTRODUCCIÓN

El nardo (*Polianthes tuberosa*) es una especie ornamental de origen Mexicano que hoy en día se comercializa y se cultiva en gran parte del mundo, por su capacidad de adaptación responde a climas en los que se reproduce. Sin embargo, el nardo sufre de problemas fitosanitarios causados por algunos patógenos que se encuentran en el suelo, debido principalmente a que el bulbo permanece en el suelo después del corte de la flor o vara florar, la principal explotación de esta planta de ornato.

Entre las principales enfermedades esta la pudrición de raíz y bulbo del nardo que se ha reportado asociada al oomiceto *Phytophthora* o al hongo *Fusarium oxysporum*. Este problema se ve reflejado en la baja producción florar del nardo, además de presentarse nuevamente en el siguiente ciclo del cultivo, debido a que el patógeno puede sobrevivir en el suelo o en residuos de tejido vegetal en descomposición. El control químico de esta enfermedad no ha sido muy eficiente, debido a la resistencia desarrollada por los patógenos a los ingredientes activos de fungicidas empleados. Provocando a su vez un aumento en el uso de los agroquímicos y en mayor cantidad afectando de esta forma al cultivo y al suelo, además del daño a la salud de los usuarios.

Una de las mejores alternativas para el control de enfermedades con un bajo impacto ambiental, es el uso de microorganismos antagonistas o de control biológico como Actinomicetos y hongos del genero *Trichoderma*. Estos microorganismos presentan diferentes mecanismos de acción entre los que se incluyen: antagonismo directo, inducción de mecanismos de defensa vegetal, competición por espacio y nutrientes, producción de metabolitos antimicrobianos, etc. En el caso de *Trichoderma*, una de sus principales funciones es colonizar la raíz de la planta y aportar señales para que la planta active sus mecanismos de defensa. También ayuda a la planta a tolerar el estrés hídrico ya que aumenta la masa radicular y de esta forma la planta puede asimilar de mejor manera los nutrientes para su óptimo desarrollo.

Por estos motivos, se considera que el aislamiento y evaluación de las cepas de *Trichoderma* asociadas a la raíz del nardo, pueden llegar a ser importantes microorganismos de control biológico, para una de las enfermedades más importantes del nardo y de difícil manejo como son las pudriciones de raíz y bulbo de esta planta.

2. ANTECEDENTES

2.1. NARDO (*Polianthes tuberosa*)

El Nardo (*Polianthes tuberosa*) es una planta perteneciente al grupo de las Aspargaseas, APG III (2009), nativa de América Meridional. El Nardo se cultiva en muchos países por su agradable fragancia (Solano y Feria, 2007). La planta crece con alargadas espigas que producen racimos de fragantes flores de color céreo que florecen desde la base hacia la parte superior de la espiga, hojas verdes agrupadas en la base de la planta y hojas más pequeñas, a lo largo del tallo. La planta suele multiplicarse por medio de bulbos y crece hasta alcanzar unos 90 cm de altura. Se usa como flor de corte y una sola vara floral puede perfumar durante semanas un ambiente. De las raíces de la misma se extrae un aceite oloroso que se usa para hacer perfumes, incienso, medicina y en ocasiones los compuestos son antifúngicos a ciertas concentraciones (Lawrence, 1995, Dudareva and Negre, 2005). Requiere exposición a pleno sol y riegos moderados, que se tienen que intensificar al iniciarse la floración (Mallavarapu, 1995). Además los metabolitos secundarios producidos, como algunos glucósidos, pueden llegar a ser benéficos para la planta, al estar relacionados con el sistema de defensa contra enfermedades y plagas, al ser antifúngicos (Chandravadana y Nidiry, 1994; Nidiry, 1998, 2001).

La plantación se efectúa colocando de 16 a 25 bulbos por m². La espiga suele durar más de 40 días en disposición de ser cortada, ya que éstas deben mantenerse para completar el ciclo de multiplicación de los nuevos bulbos, que por regla general se extraen de la tierra a la llegada de la estación fría. Para obtener buenas flores es importante renovar su bulbo todos los años, ya que aflora al producir el tallo y luego se pierde. En caso de que no se saque del suelo cada año, probablemente nacerán un buen número de nardos pequeños que se harán la competencia unos a otros sin producir flor. Tiene un ciclo de tres años, a saber, el primer año brotan junto a su madre, en el segundo alcanzan el tamaño adecuado y en el tercero, una vez separados de la madre, producen la flor. Estas técnicas de propagación han sido exitosas al buscarse obtener una plantación homogénea para la satisfacción del productor.

El número de especies de este género ha variado en función de los criterios utilizados para su delimitación; de este modo, Rose (1903) reconoció 12 especies, Espejo y López (1992) 15, García- Mendoza y Galván (1995) 13 y Solano y Feria (2007) 14 especies y 16 taxa. En un análisis cladístico de los géneros *Polianthes*, *Bravoa* y *Pseudobravoa*, con base en caracteres morfológicos y anatómicos vegetativos, Solano (2000) reconoció 14 especies, incluidas en 2 subgéneros, *Bravoa* y *Polianthes*.

2.2. Importancia y Usos

Se trata de una planta ornamental bulbosa y una de las más importantes flores de corte en áreas tropicales y subtropicales (Benschop, 1993). Esta especie era cultivada en México

antes de la conquista; en la India y Francia es cultivada como fuente de aceites esenciales para la industria de la perfumería (Benschop, 1993). Ha ganado popularidad como flor de corte en varios países y se cultiva comercialmente en Kenia, India y México para exportar a Estados Unidos, Europa y Japón (Waithaka *et al.*, 2001). En México la producción de Nardo es una parte esencial para la agricultura mexicana, ya que es una flor de corte comercial que se considera como una de las especies ornamentales de más importancia para su exportación y de venta nacional, lo que deja una elevada suma a los productores, además de generar miles de empleos. En México la mayor parte de la producción se concentra en los estados de Morelos, México, Guerrero, Veracruz y Puebla, donde se cultivan 271 ha de esta especie, que generan aproximadamente 45.7 millones de pesos en ventas al año (SIAP, 2015). En Morelos, está entre los principales cultivos de flores de corte junto con la rosa y la gladiola (Cabrera y Orozco, 2003). Ahí se reportan 152.8 ha que anualmente se dedican al cultivo de esta flor de corte, distribuida en 14 municipios de la entidad (Toledo, 2003; SIAP, 2015), lo que representa 56.4% de la producción nacional (SIAP, 2015).

2.3. PROBLEMAS FITOSANITARIOS

2.3.1. Plagas y enfermedades en el Nardo

Las plantas que se reproducen asexualmente como el Nardo (*Polianthes tuberosa* L.), presentan poca variabilidad genética, por lo que la respuesta de la planta a plagas y enfermedades no es muy efectiva ya que no cuenta con la variabilidad genética suficiente para responder o activar sus mecanismos de defensa, o combatir nuevas estrategias de ataque de los patógenos a los que están expuestos. El nardo es una planta con un ciclo corto que va de tres meses y medio, pero su condición de cultivo de verano hace que las plagas ataquen intensamente. Se destacan los daños ocasionados por pulgón, trips y araña roja, entre las plagas, y *Phytophthora*, *Botrytis* y *Fusarium* entre los hongos. En unos estudios realizados en Hawai se encontró una enfermedad conocida como Mancha Grasosa, que resultó ser de gran importancia en este cultivo, esta enfermedad es causada por el nematodo foliar, *Aphelenchoides besseyi* Christie, causa una mancha grasosa que se pudre rápidamente el follaje en el clima húmedo y cálido (Holtzmann, 1968). También existen una serie de enfermedades causadas por varios nematodos y bacterias entre las que se encuentra Flor oxidada, causada por *Thrips hawaiienses*; Pudrición del brote floral, causada por la bacteria *Erwinia* sp., Pudrición del tallo causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc., Nematodo del nudo, causada por *Meloidogyne* sp. y una de las enfermedades causantes de gran pérdida de producción floral llamada Podredumbre de la raíz y cuello del Nardo ocasionada por *Phytophthora* sp. y *Fusarium oxysporum* principalmente (Muthukumar *et al.*, 2005).

La podredumbre de la raíz y el cuello del Nardo es una enfermedad de gran importancia en el sector de producción florícola de cultivos de Nardo, ya que las pérdidas han llevado a muchos productores a dejar estas labores. La enfermedad no solo perjudica a los productores de flor de corte sino que también arrastra con ello a los productores de bulbo ya que la enfermedad principalmente se localiza en el órgano de reserva de la planta. Este problema se sigue presentando nuevamente las temporadas posteriores cuando se llega la temporada de la nueva plantación, los patógenos causantes de la enfermedad tiene la capacidad de habitar en el suelo de manera natural o en residuos de tejido vegetal en descomposición como podrían ser bulbos infectados en el caso de no recogerlos de la parcela infestada (Agrios, 1997).

Las plantas enfermas se marchitan y se amarillentan, la zona del cuello y arranque de las raíces se comienza a ennegrecer y en ellas se observa una decoloración del sistema vascular con presencia de numerosas esporas de hongos u oomicetos como *Phytophthora parasítica*, visibles al microscopio. Este patógeno se propaga con el agua, y provoca que las hojas exteriores se sequen y caigan. En el caso de *Fusarium oxysporum*, los primeros síntomas de la enfermedad son el amarillamiento del follaje (clorosis), comenzando con la caída de las hojas, las hojas afectadas posteriormente muestran un encrespamiento bajo, seguidamente se oscurecen y se secan, la parte superior de la planta se marchita durante el día y se recupera durante la noche, pero el marchitamiento empeora hasta que la planta se marchita completamente observándose el oscurecimiento en el tallo. Las plantas afectadas y sus sistemas de raíces se atrofian a causa de esta enfermedad (Cerkaskas 2005). Otra enfermedad conocida en el Nardo es el Tizón de la flora causada por un hongo del genero *Fusarium* reportado por Roy (1984).

2.4. *Fusarium oxysporum* y sus mecanismos de patogénesis

Fusarium oxysporum 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.

Las esporas del hongo son fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de canoa. Algunas especies producen micotoxinas en los cereales y que pueden afectar a la salud de personas y animales si estas entran en la cadena alimentaria. Las

principales toxinas producidas por estas especies de *F. oxysporum* son fumonisinas y tricótesenos. Los hongos de género *Fusarium* son patógenos facultativos, capaces de sobrevivir en el agua y suelo alimentándose de materiales en descomposición. Son importantes agentes de contaminación en los laboratorios de microbiología. Algunas especies fitopatógenas causan la enfermedad conocida como fusariosis (Amaral, *et al.* 2008).

Este patógeno es uno de los principales problemas en agricultura ya que su capacidad de infección sobrepasa los niveles de resistencia de muchos cultivos. Las enfermedades causadas por *F. oxysporum* difieren en cuanto a su efecto, ya que depende del tipo de cultivo en que se presente este patógeno y si el cultivo es susceptible a los mecanismo de acción de *F. oxysporum*. Algunos hongos pueden ser patogénicos específicos de ciertos cultivos, al decir que el hongo sea patogénico de algún cultivo nos referimos a que existen muchas especies del género *Fusarium* que su patogenicidad puede ser exclusiva de cierto cultivo, como *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* por ejemplo, es un patógeno que desencadena mecanismos de patogénesis específicos para vencer la defensa de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicon* L.). A estos fitopatógenos se les denomina patógenos especializados *forma especial* (forma speciale *f sp.*). Las especies de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas (el sistema vascular), sin embargo la colonización se restringe tanto el cultivares susceptibles como en resistentes, a la región de entrada del patógeno, debido a la oclusión de los vasos por geles, deposiciones de calosa y tilosas. En los cultivos susceptibles la colonización continúa cuando los geles y calosas son degradados por el efecto de enzimas pectolíticas del patógeno y la producción de las tilosas es inhibida. En los cultivos resistentes, flavonoides del tipo de las catequinas y sus productos de oxidación inactivan las enzimas, y la distribución secundaria es confinada a los puntos de infección inicial (Turlier *et al.* 1994).

Los patógenos de plantas tienen estrategias para reconocer al hospedante adecuado, penetrar e invadir el tejido vegetal, superar las defensas de la planta y optimizar su crecimiento dentro de la misma. Para realizar estos procesos, generalmente, el hongo tiene que percibir las señales químicas y físicas del hospedante y responder con los cambios metabólicos y morfogenéticos requeridos para el desarrollo patogénico. Tales cambios incluyen directamente el crecimiento de las hifas, la adhesión a la superficie vegetal, la diferenciación de las estructuras de infección especializadas y la secreción de enzimas líticas y fitotoxinas. Muchas de estas respuestas requieren la síntesis de productos génicos específicos y dependen de las vías de transducción de señales conservadas involucradas con la activación de proteínas G, las señales de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (de sus siglas en inglés MAPK) (Di Pietro *et al.* 2001). Este hongo es capaz de secretar enzimas y pequeñas proteínas durante la colonización de los vasos xilémicos de la planta (Houterman, *et al.* 2007).

La principal barrera que tiene que salvar un patógeno vegetal para la colonización de los tejidos es la pared celular rica en polisacáridos. Para ello, el hongo fitopatógeno secreta un conjunto de enzimas capaces de degradar las paredes vegetales del huésped, destacando las pectinasas que degradan la pectina, uno de los componentes principales de la pared celular vegetal y en especial, de la lámina media. La degradación de la pectina proporcionaría también los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo en el interior de la planta (De Lorenzo, *et al*, 1996). Las poligalacturonasas (PGs) son las primeras pectinasas que produce el hongo fitopatógeno cuando se cultiva *in vitro* sobre extractos de paredes celulares o durante la infección (Jones *et al*, 1972), además su actuación parece ser un requisito esencial para la posterior actuación de otras enzimas degradativas (Caprari, *et al*. 1993). Según su modo de acción sobre el sustrato se denominan endopoligalacturonasas y exopoligalacturonasas (endoPGs y exoPGs, respectivamente) y se les atribuyen funciones diferentes en el proceso infectivo de las plantas hospedadas.

Otros factores que provocan que se presente la enfermedad es la infección por nematodos formadores de agallas que provocan cambios fisiológicos en la raíz. Esto trae como consecuencia que variedades de algunos cultivos resistentes a *Fusarium* se vuelvan susceptibles al hongo. Además otros factores como las altas temperaturas, por ejemplo, 27-28°C, el tiempo seco y el suelo ácido con pH 5.5, 6 favorecen a los mecanismos por los cuales *Fusarium* sp. es capaz de enfermar a las plantas. Los principales mecanismo por los cuales *Fusarium* sp. infecta a los cultivos son principalmente la capacidad de colonizar las raíces del huésped, la producción de enzimas que degradan la pared celular, producción de fitotoxinas y la inhibición de la defensa de la planta, (Di pietro, *et al*, 2003).

Este hongo es capaz de secretar enzimas y pequeñas proteínas durante la colonización de los vasos xilémicos de la planta de tomate (Houterman PM *et al*. 2007.). Estas proteínas promueven la colonización del hospedante, por ejemplo por la supresión de los mecanismos de resistencia basales (Chisholm *et al*. 2006, Jones and Dangl. 2006). El repertorio de proteínas efectoras, determina la virulencia de un patógeno hacia un hospedante particular (Speth, *et al*. 2007).

Los métodos tradicionales de aislamiento de *Fusarium* para probar su patogenicidad siguen siendo métodos en los que se gasta tiempo y material vegetal ya que después de obtener los aislamientos se inoculan en plantas para verificar su patogenicidad y hasta qué grado llegan a ser virulentos. La importancia de realizar pruebas *in vitro* es para obtener de forma rápida y segura aislamientos de *Fusarium* patógenas y además de conocer los mecanismos de patogénesis mediante los cuales este hongo puede llegar a infectar y de esta forma relacionarlo de forma directa con la enfermedad que muestra en las plantas.

En la actualidad las enfermedades causadas por *Fusarium* se pueden llegar a controlar con productos químicos, esto tratando de desinfectar el suelo que se encuentra contaminado por este patógeno. Pero el uso indiscriminado de agroquímicos ha provocado la deficiencia de los suelos junto con la contaminación del medio ambiente, además de que el uso de agroquímicos de manera incorrecta puede ocasionar problemas de salud a quienes los utilizan y a sus descendientes. *Fusarium* es un hongo patógeno que puede ser controlado e incluso eliminado por otros microorganismos antagonistas. Debido a la necesidad de disminuir la incidencia de este patógeno en campo, se han desarrollado tecnologías que permiten disminuir de forma efectiva la enfermedad en campo al utilizar productos a base de microorganismos como por ejemplo especies del hongo *Trichoderma*. (Acosta y Garcés, 2005).

Varios autores informan de la actividad inhibidora de *Trichoderma viride* contra diferentes formas especiales de *Fusarium*, como son: *F. oxysporum.*, *F. oxysporum* f.sp. *sesami* (Chung and Choi, 1990), *F. oxysporum*.f.sp. *dianthi* (Perea *et al.*, 1999), *F. oxysporum* f.sp. *cepae* (Sudhasha, 2001) *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (Hamed, 1999).

El control de hongos fitopatógenos utilizando microorganismos antagónicos, como se ha definido en su forma clásica, se basa en la acción antifúngica de bacterias, hongos y actinomicetos, provenientes del suelo, conocidos con el nombre de hiperparásitos o micoparásitos (Ahmad 1987; Baker, 1984; Chet, 1980 y Strashnov, 1985). Existen muchos microorganismos de control biológico, entre estos se utilizan hongos y bacterias que pueden llegar a controlar diversos patógenos en cultivares susceptibles.

2.5. *Trichoderma* spp. y sus mecanismos de protección

Trichoderma sp. es un hongo antagonista que además de ser un hongo que ayuda a inhibir la actividad patogénica de algunos microorganismos también es un inductor de mecanismo de defensa en plantas. Hongos del género *Trichoderma* se han utilizado en infinidad de estudios y han mostrado resultados de gran importancia en cuanto a la inhibición de otros microorganismos patógenos como lo son *Fusarium* sp. y *Phytophthora* sp, ambos principales causantes de enfermedades de pudrición de raíz en algunos cultivos de gran importancia como lo son el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.) y algunos cultivos ornamentales como el Nardo (*Polianthes tuberosa*) (Amaral *et al.* 2008, Muthukumar *et al.*, 2005).

Los hongos del género *Trichoderma* se han utilizado como antagonistas de muchos patógenos causantes de enfermedades de gran importancia que han afectado gravemente al sector productivo en hortalizas y cultivos ornamentales. *Trichoderma harzianum* como un controlador biológico y antagonista natural de fitopatógenos, muestra una amplia gama de hospedantes y dentro de ellos están los hongos y oomicetos fitopatógenos de importancia,

tales como: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Sclerotinia* spp, *Pythium* spp, *Phytophthora* spp, *Alternaria* spp. y *Phytophthora capsici*, entre otros (Ezziyyani, *et al.*, 2004, Infante *et al* 2009, Muthukumar *et al*, 2005; García-Vera 2011, Medina-Fuentes 2013).

Los hongos del genero *Trichoderma* más usados para el antagonismo de patógenos ya sea de forma comercial o aislados de la rizósfera de algún cultivo son *T. virens*, *T. viride* y *T. harzianum*, ya que su mecanismo de biocontrol ha sido eficiente y se ha demostrado que inducen mecanismos de defensa contra muchos hongos y omicetos patógenos (Cervantes, 2007, Harman. 2004). En la acción biocontroladora de *Trichoderma* sp. se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre estos, los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el microparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (Lorenzo, 2001). Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* sp. para colonizar la rizósfera de las plantas. Otros autores han sugerido distintos mecanismos responsables de su actividad biocontroladora, que incluyen, además de los mencionados, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores. Además se conoce que *Trichoderma* sp. presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta. Entre estos se pueden mencionar los que inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (Resistencia Sistémica Inducida o ISR por sus siglas en ingles), con la destoxificación de toxinas excretadas por patógenos, la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección y la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. Tienen la capacidad además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos. Competición directa por el espacio o por los nutrientes (Elad and Baker 1985, Elad and Chet 1987, Chet y Ibar 1994, Belanger *et al.* 1995), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Chet *et al.* 1997, Sid Ahmed *et al.* 2000, Sid Ahmed *et al.* 2003) y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia *et al.* 1999, Ezziyyani *et al.* 2003).

Se conoce que *Trichoderma harzianum* ha sido utilizado en distintos trabajos como antagonista de patógenos, por ejemplo: Ezziyyani, *et al.*, (2004), utilizaron *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *P. capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Ellos optimizaron la producción de biomasa del antagonista *T. harzianum* en un medio denominado como Agua-Avena-Vermiculita que resultó ser el más rentable por su rápido y abundante crecimiento, viabilidad y bajo coste para utilizarlo como inóculo del suelo, en comparación con medios Czapek líquido y PDB. La evaluación del antagonismo in vitro de *P. capsici* frente *T. harzianum* en medio PDA enriquecido con

Laminarina-glucosa mostró que *T. harzianum* aumenta los niveles de enzimas hidrolíticas como glucanasas (por lisis enzimática) y ejerció una mayor competencia por espacio y nutrientes además de interactuar directamente con el patógeno, lo cual juega un papel importante en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno.

Las especies de *Trichoderma* se aíslan normalmente de la rizósfera de cultivos, ya que estos hongos se asocian con facilidad a las plantas. En las diferentes formas de aislar hongos lo que se busca es la efectividad de obtener cepas puras, como por ejemplo en trabajos realizados por Salazar *et al.* (2011), en los que se buscaba la efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*, se tomaron muestras de suelo húmedo provenientes de la rizósfera en algunas zonas de producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.) y se realizaron aislamientos de estos suelos. Esta ha sido la estrategia más ampliamente utilizada y replicada, con pocas diferencias siendo la principal, el cambio del inóculo rizosférico, que proviene de la especie vegetal a la que se pretende proteger.

Por otro lado también se realizan aislamientos de tejido vegetal los cuales pueden ser aún más efectivos en cuanto a aislar cepas de *Trichoderma* sp. con las características buscadas como son capacidad de colonización en las raíces de las plantas. Al realizar aislamientos de hongos podemos obtener infinidad de cepas de *Trichoderma* sp. pero no todas pueden cumplir con las características que se buscan, para esto se realizan una serie de filtros de selección y descarte de cepas. En algunos trabajos se han utilizado pruebas de antagonismo de *Trichoderma* spp. *in vitro* utilizando plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) aplicando suspensión del antagonista en la base de la planta aun cuando se encuentra en el semillero y también al momento del trasplante y la aplicación del patógeno. En otros trabajos realizados por Salazar *et al.* (2011) en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se utilizó una metodología semejante, aplicando suspensión de esporas de *Trichoderma harzianum* en la base de la planta cuando aún está en el semillero y se le aplico también cuando se realizó el trasplante, lo que implicó tiempo, espacio y utilización de mucho material vegetal.

La estrategia utilizada para aislamientos de microorganismos antagonista está compuesta de dos pasos, los cuales son una etapa de selección mediante pruebas *in vitro* y otra *in planta*. Sin embargo, el paso en el que se realizan las pruebas *in vitro* en la mayoría de las ocasiones no representa un filtro adecuado para seleccionar de manera óptima aquellas cepas que presentaran una protección bajo condiciones *in planta*. Además de que el proceso de selección *in planta*, significa el uso de amplios recursos que incluyen espacio, tiempo y mucho material vegetal, lo que en muchas especies vegetales complica el trabajo de selección. Por estos motivos se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias de selección, que exploten mejor los diferentes mecanismos que pueden tener los microorganismos antagonistas, sobre todo cuando se establecen en interacción con la planta que se pretende proteger. Este conocimiento ha sido

poco explorado, aunque empieza a surgir con los estudios de la interacción planta-patógeno-antagonista, ya que en este caso la planta entra en interacción con ambos microorganismos y puede favorecer o perjudicarse a alguno de ellos.

2.6. Interacción planta-patógeno-antagonista

La multifuncionalidad de los microorganismos en los sistemas agrícolas, se expresa de acuerdo a una serie de factores bióticos, como la competencia con otros microorganismos, la composición biológica del suelo, el reconocimiento planta-microorganismo y viceversa. Igualmente, factores abióticos, como la climatología, las características físicas y químicas del suelo, que influyen directamente en el tipo de interacción de estos organismos y la expresión de los efectos benéficos o detrimentales, determinantes en el desarrollo de las especies vegetales (Marschner y Timonen, 2005; Harman, 2006; Hoitink *et al.* 2006; Siddiqui y Akhtar, 2008; Radjacomare *et al.* 2010). Es difícil predecir el resultado de las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos del suelo y, más aún, entre las especies de microorganismos; no obstante, las comunidades microbianas asociadas con el sistema de raíces, se considera que desempeñan un papel clave en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles. La respuesta de las plantas a la inoculación depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción, entre los componentes microbianos; así arroja diferentes respuestas, dependiendo de la combinación de los microorganismos (Vázquez *et al.* 2000). En la interacción entre dos o más microorganismos se espera ver un tipo de reacción tanto de la planta como el huésped que se encuentra en ella, en el caso de interacción planta-patógeno se espera una interacción de parasitismo de parte del patógeno, ya que este se beneficia y la planta es afectada, pero cuando también está en interacción un antagonista el esquema cambia de parasitismo del patógeno con la planta a competencia del patógeno con el antagonista ya que la función de este es contrarrestar la actividad patogénica y además de que su interacción con la planta es protooperación y ambos pueden ser beneficiados. En el caso de *Trichoderma* la interacción que realiza contra algunos patógenos puede diferir ya que interactúa de diferentes maneras cuando entra en contacto con un patógeno, unas de sus funciones son el micoparasitismo ya que inhibe al patógeno invadiendo su crecimiento, otra acción que realiza *Trichoderma* contra patógenos, es la alelopatía ya que mediante este tipo de interacción perjudica o elimina al patógeno expulsando sustancias químicas que pueden afectar seriamente los procesos por el cual el patógeno establece su interacción con la planta. También el patógeno interactúa de forma similar con la planta ya que produce enzimas que penetran la pared celular comenzando así su infección.

En el caso de la interacción planta-antagonista, esta se realiza en forma de protooperación ya que los dos se benefician o en casos se realiza en forma de facilitación en la que al menos uno de los dos es beneficiado, en este caso *Trichoderma* se beneficia al

colonizar la raíz de la planta ya que puede desarrollarse y de esta forma la planta es beneficiada al tener su raíz protegida de patógenos, además de que *Trichoderma* tiene mecanismos inductores de defensa mediante enzimas que sirven de señal de activación para que los mecanismos de defensa vegetal de la planta entren en función. En algunos trabajos en los que se han evaluado este tipo de interacciones, se ha corroborado que *Trichoderma* spp. es capaz de inducir los mecanismo de defensa de las plantas, como en el trabajo realizado por Marra *et al*, (2006), ellos estudiaron la interacciones entre dos patógenos *B. cinerea* y *R. solani* en confrontación con *T. atroviride* en plantas de frijol, donde observaron que el proteoma de la planta, proteínas relacionadas con la patogénesis específica y otros factores relacionados con la enfermedad (es decir, genes de resistencia potenciales) parecen estar asociados con la interacción con uno de los dos patógenos y / o *T. atroviride*. Esta conclusión está de acuerdo con la capacidad demostrada de *Trichoderma* spp. para inducir resistencia sistémica contra diversos patógenos microbianos.

La importancia de este tipo de trabajos es generar conocimientos entre las diferentes interacciones existentes ya que en muchas ocasiones no consideramos el hecho de que un microorganismo antagonistas que queremos utilizar en algún cultivo que ya se está manejando con un agente de control biológico, puede afectar al microorganismo ya establecido o viceversa. Conocer los diferentes tipos de interacciones que existen entre los microorganismos y mejor aún, con los cultivos, facilita el manejo de estos para no hacer mal uso de ellos.

3. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de microorganismos de control biológico ha ido en aumento, sobre todo porque el uso de los agroquímicos representa serios problemas para la salud, impacto al medio ambiente y problemas de resistencia por parte de los patógenos a los cuales combate.

Existen muchos cultivos que presentan diferentes problemas fitosanitarios, entre los que se encuentra los cultivos ornamentales como el nardo, que hasta el momento, las únicas herramientas disponibles para el control de sus plagas y enfermedades son los agroquímicos, los cuales son utilizados de manera indiscriminada. Por este motivo, se hace necesario, la búsqueda de alternativas a los agroquímicos, utilizando estrategias que en otros cultivos han tenido éxito.

La estrategia seleccionada en este trabajo fue el aislamiento y selección de microorganismos antagonistas, específicamente del género *Trichoderma*, para el control de la pudrición de la raíz y bulbo del nardo asociado a *Fusarium* sp. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de estos estudios, es la gran cantidad de recursos que se necesitan entre los que se incluyen espacio, tiempo y material vegetal, necesarios para el proceso de selección tanto de los microorganismos de control biológico, como de la correcta caracterización del patógeno asociado a la enfermedad. Por este motivo, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias de selección en ambas tareas, que permitan seleccionar de manera adecuada, tanto los patógenos asociados, como los microorganismos antagonistas.

Una posible fuente de información en donde obtener estas estrategias, la podemos encontrar en los estudios de la interacción planta-patógeno y planta-patógeno-antagonistas. En el caso de la interacción planta-patógeno, nos permitirá identificar cuáles son los mecanismos de patogénesis que utiliza el patógeno para infectar a la planta, y partiendo de los mecanismos compartidos, poder generar pruebas rápidas que permitan seguir a aquellos aislamientos que las presenten.

Por otra parte, los estudios de la interacción planta-patógeno-antagonista son necesarios para conocer los procesos que se desencadenan entre los participantes. Por mucho tiempo se ha buscado conocer los procesos entre la planta y el patógeno, así como entre el patógeno y el microorganismo antagonista. Sin embargo, los procesos involucrados entre los tres componentes han sido marginalmente abordados. Por este motivo, el desarrollo de este conocimiento permitirá desarrollar nuevas estrategias de control, además de diseñar nuevas estrategias de selección de estos microorganismos, al conocer cuáles son los mecanismos de control que mejor funcionan para el combate de los patógenos vegetales.

4. HIPÓTESIS

- La presencia de los principales mecanismos de patogénesis de *Fusarium oxysporum* evaluados con pruebas *in vitro* se relacionan de manera directa con el desarrollo y severidad de la enfermedad de pudrición de raíz y bulbo en nardo.
- La presencia de la mayor cantidad de mecanismos de protección evaluados en pruebas *in vitro* en cepas de *Trichoderma* se relaciona de manera directa con una mayor protección contra la infección de *Fusarium* sp. en bulbo y raíz de nardo.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los mecanismos de patogénesis de *Fusarium oxysporum* asociado a la pudrición de bulbo y raíz del nardo (*Poliantes tuberosa*) y el control de su infección con aislamientos de *Trichoderma* sp. caracterizados en sus mecanismos de protección.

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar y seleccionar cepas de *Fusarium oxysporum* con capacidad de infectar al bulbo de nardo.
- Aislar y seleccionar cepas de *Trichoderma* sp. asociadas a la rizósfera del nardo con capacidad de control de *F. oxysporum* que infecta al bulbo del nardo.
- Relacionar la capacidad de infectar al bulbo de nardo de los aislamientos patogénicos de *F. oxysporum*, con los principales mecanismos de patogénesis evaluados *in vitro*.
- Relacionar la capacidad de protección contra *F. oxysporum* de los aislamientos de *Trichoderma* con los principales mecanismos de protección descritos para este antagonista.

6. METODOLOGÍA

6.1. AISLAMIENTO DE HONGOS ASOCIADOS A LA RAÍZ Y BULBO DEL NARDO EN ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO *Polianthes*.

Para realizar los aislamientos en este trabajo se tomaron muestras de suelo de la rizósfera de diferentes sitios de colecta en el año 2013 a partir del mes de Marzo, las colectas fueron realizadas de diferentes sitios de colecta del Estado de Jalisco y otros Estados donde se ha reportado la presencia de especies silvestres de *Polianthes* sp. Además de una parcela comercial de *Polianthes tuberosa* var. Doble, de la cual se tomaron muestras de la rizósfera y de tejido vegetal sano y enfermo. También se realizaron aislamientos de suelo y material vegetal sano y enfermo de cultivos en experimentación de *Polianthes tuberosa* var. Doble en el área de Biotecnología Vegetal del CIATEJ, provenientes del estado de Morelos. (Tabla 1).

Tabla 6.1. Sitios de colecta de especies silvestres y cultivos comerciales de *Polianthes*.

ESPECIE VEGETAL ASOCIADA	LUGAR DE COLECTA (ESTADO/MUNICIPIO)	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	CLAVE
<i>P. tuberosa</i> var. doble	Cuauchichinola, Mazatepec, Morelos	18°39'16.64"N-99°21'59.10"O	MOR-M1
<i>P. tuberosa</i> var. doble	Cuauchichinola, Mazatepec, Morelos	18°39'16.64"N-99°21'59.10"O	MOR-M2*
<i>P. tuberosa</i> var. doble	Ciatej, Guadalajara	20°42'42"N -103°20'7"W	CIATEJ-M1
<i>Polianthes Montana</i>	Lagos de Moreno	21°15.59'0.90"N -101°48'40.3"O	LDM-M1
<i>Polianthes Montana</i>	Lagos de Moreno	21°16'2.9"N -101°48'46.5"O	LDM-M2
<i>Polianthes Howardii</i>	Cerro La cumbre-Colima	19° 10' 43.3"N -103° 41' 42.8"O	COL-M1
<i>Polianthes Howardii</i>	Cerro La cumbre-Colima	19° 11'13.3"N -103° 41' 25.5"O	COL-M2
<i>Polianthes Howardii</i>	Cerro La cumbre-Colima	19°10' 43.8"N -103°41'42.8"O	COL-M3
<i>Polianthes pringleii</i>	Ameca/Mascota	20°31'05.2"N- 104°20'24.9"O	AME-M1
<i>P. geminiflora</i> var. Clivícola	Autlan km 170-carretera puerto de loz mazos	19°41'37.5"N -104°23'40.6"O	AUT-M1
<i>P. geminiflora</i> var. Clivícola	Autlan km 170-carretera puerto de loz mazos	19°41'37.5"N -104°23'40.6"O	AUT-M2
<i>Polianthes pringleii</i>	Hospital Angel Leañó	20°45'49" N -103°24'54.9"O	HAL-M1
<i>Polianthes pringleii</i>	Hospital Angel Leañó	20°45'49" N -103°24'54.9"O	HAL-M2
<i>Polianthes zapopanensis</i>	Mirador de San Cristobal de la barranca	20°57'41.0"N -103°24'32.7"O	SCB-M1
<i>Polianthes pringleii</i>	Mesa de San Juan de Ocotán	20°57'16.4"N -103°26'41.9"O	OCO-M1
<i>P. Geminiflora</i> Tlaxcala	Tlaxcala		TLAX-M1

Clave de las muestras: , MOR-M1=Morelos-muestra 1, MOR-M2*=Morelos-muestra 2 (Enfermo), CIATEJ-M1=Ciatej-muestra 1, COL-M1=Colima-muestra 1, COL-M2=Colima-muestra 2, COL-M3=Colima-muestra 3, AME-M1=Ameca-muestra 1, AUT-M1=Autlán-muestra 1, AUT-M2=Autlán-

muestra 2, **HAL-M1**=Hospital Ángel Leño-muestra 1, **HAL-M2**=Hospital Ángel Leño-muestra 2, **SCB-M1**=San Cristóbal de la Barranca-muestra 1, **OCO-M1**=Ocotán-muestra 1, **TLAX-M1**=Tlaxcala-muestra 1.

6.1.1. Aislamientos de *Fusarium* spp. asociados a la pudrición de raíz y bulbo del Nardo.

A partir de las muestras obtenidas de los diferentes sitios de colecta (Tabla 6.1) tomadas de la rizósfera de las especies silvestres y cultivos comerciales de *Polianthes* se realizaron aislamientos por diluciones seriadas en agua destilada a diferentes concentraciones (Tello *et al.*, 1991, 1992), de las que se tomaron 200µl y se diseminaron con una asa triangular en cajas de Petri con medio selectivo NSA (Nash and Snyder, 1962), específico para hongos del género *Fusarium*.

También se tomaron muestras de tejido vegetal infectado (bulbo y raíz) con síntomas de pudrición de bulbo y raíz del nardo. Se realizó el lavado del material vegetal utilizando cloro y agua a una concentración 70:30, (70% cloro-30% H₂O). El material vegetal fue previamente lavado con agua destilada para eliminar restos de suelo. Posteriormente se realizaron los cortes del material vegetal de aproximadamente 8mm, colocando de 4 a 6 segmentos de bulbo y de raíz por separado en cajas de Petri con medio selectivo NSA (Nash and Snyder, 1962), para obtener aislamientos de *Fusarium* sp. Enseguida estas cajas se colocaron en un incubador con oscuridad de 48 a 72 horas. Posteriormente ya crecidas las colonias aisladas se identificaron las cepas de *Fusarium* sp. por medio de observaciones generales, color del micelio, crecimiento del micelio y por medio de microcultivos en los cuales se observaron las características morfológicas ya identificadas en este género mediante un microscopio óptico.

6.1.2. Identificación de *Fusarium oxysporum*.

Una vez obtenidos los aislamientos de *Fusarium* spp. se realizó una preselección de los aislamientos considerando como primer filtro un medio de cultivo específico a nivel de especie para tomar únicamente los aislamientos pertenecientes a la especie *Fusarium oxysporum*. El método consistió en resembrar todos los aislamientos pertenecientes al género *Fusarium* utilizando como medio selectivo medio KOMADA (Blok *et al.* 1997; Vujanovic *et al.* 2002), específico para hongos de la especie *Fusarium oxysporum*. A partir de esta selección específica se tomaron los aislamientos de la especie buscada para realizar las pruebas de patogénesis de *F. oxysporum*.

6.1.3. Aislamientos e Identificación de *Phytophthora* spp.

Al ser un oomiceto que ha sido reportado como agente causal de pudrición de raíz y bulbo del nardo, se realizaron aislamientos dirigidos a este fitopatógeno. De diferentes predios se realizó la colecta de suelo y material vegetal para realizar los aislamientos de *Phytophthora* sp. mediante el método de diluciones en placa (Tello *et al.*, 1991, 1992). El medio se preparó utilizando V8 agar o bien harina de maíz agar para solidificar y después de esterilizado se le adicionaron los siguientes compuestos: pentacloronitrobenzeno (PCNB) 0.10 g/L, ampicilina (SIGMA) 0.27 g/L, rifampicina (SIGMA) 0.01 g/L y natamicina 0.02 g/L (Delvolid Instant). Este medio es una modificación del medio original PARP (Erwin, 1996), en el cual se substituyó la pimáricina por natamicina, por el alto costo del primero. Se realizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas ya mencionado anteriormente para aislamientos de suelo y el mismo método para aislamientos de material vegetal. Posteriormente ya que se obtuvieron las colonias, se recuperaron y se identificaron las cepas de *Phytophthora* sp. por medio de observaciones generales y microcultivos para posteriormente utilizarlas en una serie de pruebas que sirvieron para seleccionar las cepas que cumplían con las características deseadas.

6.2. Aislamientos de *Trichoderma* spp. asociados a la rizósfera de especies silvestres del género *Polianthes*.

6.2.1. Aislamientos e identificación de *Trichoderma* spp.

De diferentes sitios de colecta (Tabla 6.1) se realizó la colecta de suelo de la rizósfera de especies silvestres del género *Polianthes* y material vegetal de cultivos comerciales ya mencionados para realizar los aislamientos de *Trichoderma* sp.. Se realizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas (Tello *et al.*, 1991, 1992), ya mencionadas anteriormente. El medio empleando como medio selectivo fue el medio THSM (Elad and Chet, 1983), específico para hongos de género *Trichoderma* sp. Una vez que se realizó la inoculación de las diluciones y material vegetal enfermos en cajas con medio selectivo, estas se incubaron en oscuridad de 48 a 72 horas, el mismo tiempo de incubación en oscuridad que se usó para *Fusarium* sp.. Posteriormente ya crecidas las colonias, se recuperaron y se identificaron las cepas de *Trichoderma* sp. por medio de observaciones generales como color del micelio, crecimiento micelial y por microcultivos para observar en microscopio la morfología de cada uno de los aislamientos obtenidos (Barnett and Hunter, 1972). Posteriormente una vez identificadas las cepas pertenecientes al género *Trichoderma* se les realizaron algunas pruebas para seleccionar los aislamientos que cumplían con las características deseadas.

6.3. Extracción de compuestos antifúngicos de *Polianthes tuberosa*.

6.3.1. Extracción de fitoanticipinas (saponinas) provenientes del bulbo y raíz del Nardo (*Polianthes tuberosa*).

Para realizar la extracción de saponinas del nardo se utilizaron bulbos y raíces escindidos de Nardo (*Polianthes tuberosa* var. Doble), los cuales se sometieron a una etapa de deshidratación por calor en un horno a 70°C durante 72 horas. Las muestras de Nardo deshidratadas se trituraron utilizando un molino casero y se obtuvo el peso seco de la muestra final en polvo, de la cual se tomaron 100g de la muestra y se disolvieron en una mezcla de metanol y agua, 95% Metanol-5% Agua, a concentración 1:10 (100g/L), se mantuvo en agitación utilizando agitador magnético y matraz volumétrico durante cinco horas. Una vez que la mezcla se homogenizó lo mejor posible durante el tiempo establecido, se realizó la filtración de la mezcla con papel filtro Whatman #1 para separar las Saponinas disueltas en la mezcla de los restos de muestra. Una vez que el extracto estuvo filtrado se colocó en rotavapor a una temperatura de 40°C para separar el Metanol y que el extracto quedara solo en el porcentaje de agua que se agregó. Una vez que se realizó la separación y el extracto quedó completamente libre de Metanol, este se congela para posteriormente poder obtener el extracto libre de agua por medio de la liofilización y de esta forma recuperar un extracto sólido en forma de polvo y poder utilizarlo en las pruebas de inhibición contra los aislamientos de *F. oxysporum*.

6.3.2. Cuantificación de saponinas por espectrofotometría.

Para la cuantificación de saponinas se prepararon estándares a partir de Diosgenina al 93%, disuelta en Acetato de Etilo a concentraciones de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL y 50 µg/mL para realizar una curva de calibración en espectrofotómetro con tres replicas, para posteriormente realizar la cuantificación de Saponinas de Nardo utilizando el extracto disuelto en agua a muy baja concentración. También se prepararon dos muestras, (A y B) a base de Anisaldehído con Acetato de Etilo 50 µL/10 mL muestra A, y Ácido sulfúrico con Acetato de Etilo 5 mL/5 mL muestra B. La curva de calibración se realizó en tubos Eppendorf de 1.5 mL por triplicado, utilizando como estándares las diluciones de diferentes concentraciones de Diosgenina, de las cuales se tomaron 47 µL de cada muestra estándar y se ajustó a 500 µL con 25 µL de H₂O, enseguida se le agregó a cada tubo 250 µL de la muestra A y 250 µL de la muestra B para iniciar la hidrólisis. El Blanco que sirvió como testigo llevo 475 µL de Acetato de Etilo, 25 µL de H₂O, 250 µL de la muestra A y 250 µL de la muestra B. Posteriormente los tubos se colocaron en baño maría a 60°C durante 20 minutos consecutivos y después se suspendió la hidrólisis en hielo, para posteriormente leer las muestras en espectrofotómetro a 430 nm.

Una vez realizada la curva de calibración se realizó la cuantificación utilizando el extracto de Saponinas obtenido, el cual se resuspendió en H₂O a 100mg/mL, 80mg/mL y 50mg/mL. Todas las pruebas llevaron un Blanco igual al de la curva de calibración como testigo. Para esta prueba también se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5mL, en los cuales se realizó la reacción utilizando solo 25µl de cada una de las diferentes concentraciones de las muestras de Saponinas disuelta en Agua, 475µl de Acetato de Etilo, 250µl de la muestra A y 250µl de la muestra B, todas por triplicado. Las muestras se colocaron en baño maría a 60°C durante 20 minutos para comenzar la hidrólisis y pasado el tiempo se suspendió la hidrólisis metiendo los tubos en hielo, para posteriormente leer las muestras en espectrofotómetro a 430nm (Baccou *et al.* 1977), modificación de la técnica de por Barron-Hernandez (2015).

6.4. Evaluación de los mecanismos de patogénesis de los aislamientos de *Fusarium oxysporum*.

De los aislamientos de *F. oxysporum* seleccionados, se evaluaron los principales mecanismos de patogénesis reportados para *F. oxysporum* en otros cultivos. Se evaluó el proceso de colonización del bulbo y raíz, la producción de enzimas que degradan la pared celular, resistencia frente a fitoanticipinas producidas por las plantas, producción de enzimas que inhiben la respuesta de defensa vegetal, tolerancia a especies reactivas de oxígeno (ROS) y finalmente se evaluó la producción de fitotoxinas. Las evaluaciones fueron seleccionadas en relación con la evaluación de los síntomas de patogénesis de *F. oxysporum* en planta ya reportados.

6.4.1. Evaluación de la colonización y penetración de raíces de Nardo (*Polianthes tuberosa*) por *Fusarium oxysporum*.

Para realizar las pruebas de colonización se colocaron bulbos de Nardo previamente desinfectados a emitir raíces en charolas de germinación con una mezcla de sustrato Peat Moss estéril, aplicándole al bulbo un estimulante para producción de raíces (Radix) en la parte basal y así obtener raíces con mayor rapidez. Una vez que los bulbos de Nardo comenzaron a presentar raíces de aproximadamente cinco centímetros, estas se recuperaron cortándolas del bulbo y se desinfectaron con agua y cloro 70% agua-30% cloro durante 5 minutos. Una vez desinfectadas las raíces se colocaron en cajas de Petri con medio AA (Agar-Agua) teñido con un colorante vegetal comercial (Disicolor) a una concentración de 6mL/L. Posteriormente se realizó la inoculación de suspensión de esporas de *F. oxysporum* obtenidas de las cepas seleccionadas previamente. Las raíces se colocaron a un extremo de la caja de Petri, utilizando de 3 a 4 raíces por caja. La inoculación se realizó aplicando gotas de la suspensión de esporas a una concentración de 1×10^7 al otro extremo de la caja

dejando una distancia de 2.5cm desde la raíz a la suspensión de esporas. Posteriormente las cajas de Petri se colocaron en incubación a 25°C de 24 a 48 horas para posteriormente recuperara las raíces y realizar la tinción de raíz utilizando Azul de Tripiano (Lactofenol). Previo a la tinción, a las raíces se le realizó un corte transversal para ampliar el panorama de observación de la colonización por dentro y por fuera de la raíz. Las observaciones se llevaron a cabo en microscopio óptico para validar mediante fotografías de la colonización si los aislamientos utilizados en esta prueba fueron capaces de colonizar y penetrar la raíz del Nardo.

6.4.2. Evaluación de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal (Pectinasas).

La evaluación se realizó en cajas de Petri con medio PEL enriquecido con ácido poligalacturónico (PGA; Andro *et al.* 1984). En este caso el medio PEL fue modificado ya que inicialmente se utilizó el medio original que es para pruebas de bacterias, pero en este caso se utilizó como medio base solamente sales, lo que redujo al medio a un medio mínimo, utilizando solamente (NH₄)₂SO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 4g/L, Na₂HPO₄ 6g/L, MgSO₄ 0.2g/L, FeSO₄ 7H₂O 1mg/L y CaCl₂ 1mg/L, con un pH de 7.0 y 16g de Agar y PGA 22g/L. En las cajas de petri con este medio PEL se sembraron bocados circulares de medio de cultivo con crecimiento micelial de las diferentes cepas de *F. oxysporum* colocando de cuatro a cinco bocados de diferentes cepas con crecimiento micelial de aproximadamente 5mm de diámetro por caja, este tipo de prueba nos permitió identificar a simple vista cuál de las cepas es capaz de crecer más que las otras en presencia de ácido poligalacturónico. También se realizó la prueba con cada uno de los aislamientos por separado en una caja con sus respectivos testigos sin ácido poligalacturónico. Una vez que se colocaron los bocados en las cajas con medio PEL, estas se mantuvieron en crecimiento a condiciones de 27°C durante 72 horas y una vez que las cepas presentaron crecimiento micelial, se inundó la caja de Petri con Acetato de cobre al 75%, la caja permaneció inundada durante una hora, posterior a este paso se recuperó el Acetato de cobre y la caja fue colocada en un horno en condiciones de 37°C de Temperatura durante 24 horas y finalmente se realizaron las observaciones para determinar la capacidad que tenía cada una de las cepas para crecer y degradar el medio PEL, lo que permitió determinar de una forma directa si las cepas utilizadas son capaces de degradar enzimas de la pared celular vegetal (Pectinas) y de esta forma seleccionar las cepas que son capaces de producir las enzimas pectolíticas uno de los mecanismos que se relaciona directamente con la patogénesis que presentan en planta.

6.4.3. Resistencia al estrés oxidativo por producción de especies reactivas de oxígeno de *F. oxysporum* frente a Paraquat.

En esta prueba se utilizó el ingrediente activo de un fungicida conocido comercialmente como Paraquat (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo), el cual se utiliza actualmente como herbicida cuaternario de amonio y nos sirve para realizar este tipo de pruebas como indicador de oxidación-reducción ya que actúa como inductor de agente superóxido. Fueron tres concentraciones diferentes que se utilizaron: 500µm, 750µm y 1000µm, concentraciones obtenidas mediante pruebas preliminares para verificar su efecto negativo sobre *F. oxysporum*. La prueba se realizó en cajas de Petri con medio PDA utilizando cada una de las concentraciones ya mencionadas por caja con sus respectivos controles sin Paraquat. La prueba consistió en colocar bocados de aproximadamente 5mm de crecimiento micelial utilizando los nueve diferentes aislamientos de *F. oxysporum* seleccionados, cada uno con su control y las tres diferentes concentraciones de Paraquat, para observar el crecimiento de cada aislamiento en contacto con el Paraquat. Se tomó un registro fotográfico para visualizar el efecto en su crecimiento.

6.4.4. Resistencia de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* frente a fitoanticipinas (Saponinas) producidas por el Nardo (*Polianthes tuberosa*).

En esta prueba se utilizaron los nueve aislamientos de *F. oxysporum* seleccionados para compararlos entre sí y seleccionar el aislamiento que muestre mayor viabilidad frente a las Saponinas producidas por el Nardo. La prueba consistió en utilizar una suspensión de esporas de cada uno de los aislamientos de *F. oxysporum* a una concentración de 1×10^8 esporas/mL, colocada en germinación en medio PDB adicionado con extracto de Levadura al 1% durante 24h en condiciones de agitación de 180rpm a 30°C. La cantidad de medio de cultivo utilizada fue de 50mL por tratamiento, al cual se le inocularon 5mL de la suspensión de esporas de cada aislamiento correspondiente. Posteriormente pasadas las 24h se recuperó el medio de cultivo con las esporas germinadas de cada uno de los aislamientos y se distribuyeron en cinco tubos de falcon de 15mL utilizando solamente 5mL por tubo, posteriormente se centrifugan a 4000xg para separar el medio de las esporas germinadas y se realizó una serie de enjuagues con agua destilada estéril para eliminar el exceso de medio PDB. Una vez que se eliminaron los residuos de medio y la biomasa estuvo visiblemente limpia, esta se resuspendió en Buffer de fosfatos y se les aplicaron 200µm de una solución stock de saponinas (100mg/mL) (Tabla 6.2). Los tratamientos tuvieron tres repeticiones y sus controles, control+ (positivo) y control- (negativo). En el control positivo se aplicó agua estéril antes de que se realizaran los lavados y se resuspendió en Buffer de fosfatos. Para el control negativo, se mataron las esporas germinadas con un choque térmico, exponiéndolas a temperatura de ebullición por cinco minutos y después en hielo por otros cinco minutos en dos ocasiones. Una vez que se produjo la muerte celular en el

control negativo y se aplicaron las Saponinas en los tratamientos, estos se llevaron a incubación a 30°C durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se aplicó 40µl de Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC) para la prueba de viabilidad de celular (Shaaban H. Moussa *et al*, 2013). El TTC fue utilizado a una concentración de 5mg/mL. El TTC se disolvió en agua destilada estéril y posteriormente se filtró a través de una membrana de 0.22µm y se almacenó a -20°C hasta su uso. De la solución stock de TTC se utilizaron 40µl/5mL para la prueba, la cual consistió en aplicar el indicador a todos los tratamientos y controles, los cuales permanecieron en incubación a 37°C en un horno por 20 minutos y posteriormente se centrifugó cada uno de los tubos para eliminar el buffer con las saponinas y TTC. Finalmente se resuspendió en Etanol al 50% y realizó la lectura en espectrofotómetro a 480nm utilizando una microplaca.

Tabla 6.2. Evaluación de la resistencia de *Fusarium oxysporum* frente a fitoanticipinas (Saponinas).

TRATAMIENTO	CONTROL+	A	B	C	CONTROL-
POF1	0µl	200 µl	200 µl	200 µl	0µl
POF2	0µl	200 µl	200 µl	200 µl	0µl
POF3	0µl	200 µl	200 µl	200 µl	0µl
POF4	0µl	200 µl	200 µl	200 µl	0µl
POF5	0µl	200 µl	200 µl	200 µl	0µl
POF6	0µl	200 µl	200 µl	200 µl	0µl
POF7	0µl	200 µl	200 µl	200 µl	0µl
POF8	0µl	200 µl	200 µl	200 µl	0µl
POF9	0µl	200 µl	200 µl	200 µl	0µl

Tabla 6.2. Evaluación de la tolerancia de *Fusarium oxysporum* frente a Fitoanticipinas (Saponinas).

Tabla que muestra los diferentes tratamientos con sus repeticiones y sus controles positivos y negativos. **T. Saponinas:** Tratamientos con Saponinas, **Control +:** Control positivo (células vivas sin Saponinas), **A, B y C:** Repeticiones de los tratamientos con Saponinas (200µm de Saponinas por repetición), **Control -:** Control negativo (células muertas sin Saponinas).

6.4.4.1. Evaluación de resistencia a fitoanticipinas en placa.

En este caso se evaluó la resistencia a saponinas en placa. Se hicieron una serie de pozos a la mitad de la caja y colocar muestras de Saponinas a diferentes concentraciones. En esta prueba también se utilizó una cepa reportada como no patogénica (FAVR3) la cual se utilizó como tratamiento negativo en comparación con un aislamiento de *F. oxysporum*. Cada una de las cepas llevo un tratamiento control sin saponinas para mostrar la comparación del crecimiento micelial de cada cepa en presencia de Saponinas a dos concentraciones diferentes y sin ellas.

6.4.5. Evaluación de patogenicidad de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* in planta.

El material vegetal que se utilizó para esta prueba fueron plántulas de *Polianthes tuberosa* variedad doble aclimatadas en condiciones controladas. Las plántulas se produjeron a partir de bulbos desinfectados con fungicidas y bactericidas químicos para propagar y obtener las plantas completamente sanas. El suelo que se utilizó para plantar los bulbos fue una mezcla de suelos con sustrato Peat moos, Arena y Agrolita con proporciones 3:2:1 previamente esterilizado en autoclave a 121°C por 20 minutos. El sustrato se colocó en charolas de germinación de 72 cavidades en las cuales se plantó un bulbo por cavidad. Se colocaron en un cuarto de incubación a 25°C y se mantuvo en crecimiento por al menos 30 días hasta que desarrollaron hojas y raíces abundantes. Las plantas fueron inoculadas con suspensión de esporas de las diferentes cepas seleccionadas de *F. oxysporum*. Para esta prueba se utilizaron nueve cepas de *F. oxysporum* previamente seleccionadas por los filtros de selección empleados en los aislamientos. La prueba se realizó en vasos térmicos como maceta, utilizando una planta de *P. tuberosa* por maceta con cinco repeticiones. Se les inoculó 10mL de suspensión de esporas del aislamiento de *F. oxysporum* correspondiente a cada tratamiento, a una concentración de 1×10^6 esporas/mL. Una vez que las plantas fueron inoculadas con la suspensión de esporas del patógeno, las plantas permanecieron bajo condiciones controladas bajo un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad a una temperatura de 25°C aproximadamente. A partir del primer día del experimento se realizaron observaciones cada 20, 40 y 60 días después, para observar cuál de los tratamientos presentaron síntomas de enfermedades causadas por *F. oxysporum*. A partir de las plántulas inoculadas se tomaron muestras de raíz y bulbo, se tomaron dos plantas por tratamiento los días ya mencionados seccionando el bulbo y raíz de cada planta. Se realizó un registro fotográfico de la parte foliar como planta completa en maceta hasta la parte bulbosa y raíz, obteniendo imágenes de los bulbos cortados a la mitad para una mejor observación de síntomas de pudrición. Una vez recolectadas las muestras de bulbo y raíz, se colocaron en solución fijadora FAA (formol, ácido acético y alcohol) y se mantuvieron en refrigeración a 4°C para posteriormente realizar cortes de tejido vegetal. Se realizaron tinciones de las raíces con azul de tripano para observar la colonización del patógeno.

6.4.5.1. Tinción y observación de raíces de los tratamientos en pruebas de patogenicidad.

A partir de de raíces recuperadas de las plantas utilizadas en las pruebas de patogenicidad se realizaron cortes transversales y todas las muestras tomadas de cada tratamiento se les realizó la tinción correspondiente para observar hasta donde había colonizado el patógeno después de los 60 días de inoculado cada aislamiento. Se realizó la tinción con azul de

tripano en lactofenol en las raíces cortadas y montarlas en porta objetos para su observación en microscopio óptico.

6.4.6. Evaluación de la producción de fitotoxinas por los aislamientos de *Fusarium oxysporum*.

Para la evaluación de la producción de fitotoxinas solo se utilizó a la cepa que presentó la mayor virulencia de todos los aislamientos. La producción de fitotoxinas se realizó utilizando discos de crecimiento micelial de *F. oxysporum* de siete días en PDA, de aproximadamente 5mm de diámetro. Se utilizó un matraz de 250mL para mantener el cultivo que contenía 100mL medio PDB al cual se le incorporaron 10 discos con crecimiento micelial del hongo. El periodo de incubación duro 30 días a condiciones de 25°C con un periodo de luz continua. Una vez terminado el tiempo de incubación se realizó la filtración, utilizando filtros Whatman #1 como primer filtro para eliminar el exceso de micelio acumulado en el cultivo en tres ocasiones para eliminar por completo el micelio, después se utilizaron filtro de 0.65µm y finalmente filtros de 0.2µm para clarificar lo mayor posible el extracto obtenido (DUARTE y ARCHER, 2003). En este último paso de filtración se recuperó muy poco extracto ya que los filtros milipore de 0.2µm se saturaban rápidamente y se obtuvo poco filtrado que al final se incorporó al resto del filtrado con micro filtros de 0.65µm. Posteriormente se aplicó el filtrado en raíces sanas de nardo y se incubaron a 30°C de 17 a 24h, para después aplicar TTC para observar respiración celular (Shaaban H. Moussa *et al*, 2013), y verificar el daño que causan las fitotoxinas de *F. oxysporum* en microscopio óptico.

6.5. EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma sp.*

6.5.1. Evaluación de los mecanismos de protección de aislamientos de *Trichoderma sp.*

A los aislamientos de *Trichoderma* obtenidos se les evaluaron diferentes mecanismos de protección ya reportados (Harman GE. 2004; Cervantes A. 2007), para seleccionar los aislamientos que presentaron un mayor potencial para proteger plantas de Nardo contra la infección de una cepa patogénica de *Fusarium oxysporum* seleccionada. Los mecanismos de protección evaluados fueron: colonización de raíz, antagonismo directo (cultivos duales), producción de enzimas antifúngicas y la producción de metabolitos secundarios antifúngicos. Este tipo de filtro de preselección fue para seleccionar las cepas que presentaron la mayor cantidad de mecanismos de protección para su evaluación en planta y

descartar las cepas que no presentaron los mecanismos de acción antagónica ya mencionados.

6.5.2. Prueba de colonización de raíces de Nardo (*Polianthes tuberosa*) por aislamientos de *Trichoderma* spp.

Para la prueba de colonización se comenzó por plantar bulbos de Nardo impregnados de (Radix) en sustrato Peat Moss estéril para su rápida producción de raíces. Los bulbos se plantaron en charolas de 72 cavidades, una vez que los bulbos de Nardo presentaron raíces de aproximadamente 5cm, estas se recuperaron y se desinfectaron con agua y cloro a concentraciones 70% Agua-30% cloro durante 5 minutos. Las raíces se cortaron de la parte superior y se colocaron en cajas de Petri con medio AA (Agar-Agua) teñido con un colorante comercial (Disicolor). Se colocaron de 3 a 4 raíces por caja, las raíces se colocaron a un extremo de la caja de Petri, enseguida se realizó la inoculación de suspensión de esporas de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* sp. La inoculación se realizó aplicando una gota de suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 por cada fragmento de raíz al otro extremo de la caja. En esta prueba se utilizaron 37 aislamientos de *Trichoderma* sp. seleccionados por observaciones generales mencionadas anteriormente. Las cajas se mantuvieron en un incubador de 24 a 48 horas con oscuridad y posteriormente se realizó la tinción de raíz utilizando azul de tripano (Lactofenol). Las raíces fueron cortadas transversalmente para obtener una tinción más completa y poder observar en microscopio óptico la colonización por dentro y fuera de la raíz y de esta manera validar y seleccionar las cepas que son capaces de colonizar y penetrar la raíz del Nardo.

6.5.3. Prueba de antagonismo directo *in vitro* (cultivos duales).

Esta prueba de antagonismo consistió en confrontar aislamientos de *Trichoderma* sp. contra la cepa patogénica de *F. oxysporum* seleccionada, para evaluar sus mecanismos de acción antagónica frente al aislamiento patogénico de *Fusarium oxysporum* ya seleccionado, utilizando la técnica de cultivos duales (Dennis and Webster, 1971). Se utilizaron 29 aislamientos de *Trichoderma* sp., los cuales fueron seleccionados en las pruebas de colonización de raíz. La prueba se realizó en cajas de Petri con medio de cultivo PDA en las cuales se colocó un fragmento circular de 5mm de diámetro de medio de cultivo con crecimiento micelial del patógeno a un extremo de la caja y otro fragmento del mismo tamaño con crecimiento micelial del antagonista al otro extremo de la caja. Posteriormente se colocaron en incubador durante un periodo de 6 a 15 días para observar las cepas que

mostraron actividad antagonica y el tiempo que tardaron en mostrar los diferentes tipos de interacción frente a *Fusarium oxysporum*. Este método se utilizó para cada una de los aislamientos obtenidos e identificados de *Trichoderma* sp., como filtro para seleccionar de esta manera las cepas que presentaron antagonismo contra *F. oxysporum*. Los mecanismos de acción esperados por el antagonista en estas pruebas fueron: micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes, antibiosis e inhibición por producción de metabolitos secundarios.

6.5.4. Producción de enzimas antifúngicas de *Trichoderma* spp. (quitinasas y glucanasas).

6.5.4.1. Extracción de enzimas quitinasas y glucanasas de *Trichoderma* spp.

Para la producción de quitinasas y glucanasas se utilizó un medio mineral líquido a base de sales utilizando (NH₄)₂SO₄ 2g/L, KH₂PO₄ 4g/L, Na₂HPO₄ 6g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, FeSO₄ 7H₂O 1mg/L y CaCl₂ 1mg/L, con un pH de 7.0, incorporando como fuente carbono: quitina coloidal para la producción de quitinasas y almidón para la producción de glucanasas (Harman *et al.* 1993 y Worasatit *et al.* 1994). Ambas pruebas se realizaron en Matrazes Erlenmeyer de 125mL, los cuales contenían inicialmente 20mL de medio mineral adicionado únicamente con glucosa al 1% para aumentar la biomasa de las cepas de *Trichoderma* sp. que se utilizaron. Los cultivos se mantuvieron por tres días en crecimiento, la forma en que se realizó el cultivo fue en suspensión de esporas, utilizando 2mL de una suspensión de esporas a una concentración de 1X10⁸ esporas/mL. Posteriormente ya que el hongo creció en el medio mineral con glucosa, se tomaron 5mL y se inocularon a un nuevos matraz con 50mL de medio mineral adicionado con el sustrato que se requería para cada prueba (quitina coloidal y almidón), los cuales se colocaron al momento en agitación a 180rpm con un periodo particular de cinco días para producción de quitinasas y ocho días para la producción de glucanasas. Posteriormente se realizó la filtración con fibra de vidrio (Hadar *et al.*, 1979) y papel filtro Wathman #1 para eliminar el exceso de micelio que contenía el sobrenadante y así obtener solo el medio mineral con la enzima producida. Una vez que el medio mineral quedo libre de micelio se puso en congelación para posteriormente liofilizar la muestra y separar el medio acuoso y obtener el extracto enzimático en forma sólida, el cual se obtuvo en polvo como producto final y se utilizó en pruebas de antagonismo para medir la viabilidad de esporas de *F. oxysporum* frente a las enzimas provenientes de los aislamientos de *Trichoderma*.

6.5.4.2. Evaluación del efecto antifúngico de las enzimas producidas por los aislamientos de *Trichoderma* sp.

A partir del extracto enzimático obtenido se realizó una resuspensión utilizando búffer de fosfatos para glucanasas y buffer de citratos para quitinasas a una concentración de 100mg/mL, utilizada en las pruebas de viabilidad de las esporas de *F. oxysporum*. Se realizó la germinación de *F. oxysporum* que se mantuvieron por 24 horas en medio PDB adicionado con extracto de levadura al 1% con agitación a 180rpm, estableciendo 10 tratamientos en tubos de ensaye de 50mL con 25mL del medio de cultivo con suspensión de esporas de *F. oxysporum* a una concentración de 1×10^8 esporas/mL. Pasadas las 24 horas se recuperaron las esporas germinadas de cada uno de los tubos y se dividieron en cinco tubos de Falcon de 15mL utilizando 5mL por tubo. Posteriormente una vez que cada tubo contiene 5mL del medio con las esporas de *F. oxysporum* germinadas, se centrifugaron a 4000g durante cinco minutos para separar el medio de cultivo de las esporas, se realizaron enjuagues con agua estéril para eliminar el exceso de medio PDB y después resuspender las esporas en buffer de fosfatos. A las esporas resuspendidas se aplicaron las enzimas (250 μ l) e incubadas a 30°C por 24 horas. Para los controles se aplicó agua estéril en lugar de las enzimas. En el control negativo se mataron las esporas germinadas a partir de un choque térmico, sometiendo a las esporas a temperatura de ebullición por cinco minutos y a bajas temperaturas en hielo otros cinco minutos, repitiendo este proceso tres veces para conseguir la muerte celular. Pasado el tiempo de incubación se aplicó el TTC preparado como se describió previamente. Se aplicaron 40 μ l y se mantuvieron en incubación a 37°C en un horno por 20 minutos y posteriormente se centrifugaron para separar las esporas germinadas del sobrenadante. Finalmente se resuspendió en etanol al 50% para realizar las lecturas en espectrofotómetro a 480nm

6.5.5. Producción de metabolitos antifúngicos de bajo peso molecular producidos por *Tichoderma* spp.

A diferencia de los pasados métodos de extracción, en este caso no se utilizó una suspensión de esporas de los aislamientos, se utilizaron bocados circulares de medio de cultivo con crecimiento micelial de 5mm de diámetro, los cuales se incorporaron a matraces Erlenmeyer que contenían 50mL de medio PDB, se inocularon 10 bocados con crecimiento micelial por matraz. Una vez realizada la siembra en los matraces, estos se sellaron con tapón de gasa, aluminio y cinta plástica, después se colocaron en incubador a 25°C durante un periodo de 30 días y a partir de estos cultivos se obtuvo un extracto libre del hongo, el cual se filtró con gasas y papel filtro inicialmente para eliminar el exceso de micelio y posteriormente se realizó la filtración con filtro de 0.22 μ m para obtener un extracto de

metabolitos secundarios libre de células. El extracto obtenido de cada tratamiento se concentró en centrifuga por medio de tubos falcon con microfiltros de 3.5kd para separar moléculas de bajo peso molecular y así obtener los metabolitos de bajo peso molecular. El extracto final obtenido se utilizó en pruebas de antagonismo contra *Fusarium oxysporum* en las que se evaluó la actividad antifúngica por medio de una prueba de viabilidad celular utilizando el TTC que ha sido descrito previamente (Shaaban H. Moussa *et al*, 2013).

6.5.6. Evaluación de la protección contra la infección de *Fusarium oxysporum* de los aislamientos de *Trichoderma in planta*.

La prueba se realizó en vasos térmicos de 320mL de volumen utilizados como macetas, por lo que se utilizó una planta de Nardo por maceta. El material se obtuvo a partir de bulbos de *P. tuberosa* var. Doble, los cuales se plantaron en charolas de germinación de 72 cavidades utilizando una mezcla de suelos conformada por Peatmos, arena y agrolita con proporciones 3:2:1 previamente esterilizado en autoclave a 121°C por 20 minutos. Las charolas en las que se plantaron los bulbos se mantuvieron en cuarto de incubación durante 45 días, posteriormente se recuperaron las plántulas de Nardo y se trasplantaron a las macetas. Se seleccionaron las plantas más vigorosas y homogéneas posibles para una mejor evaluación. Se establecieron 11 tratamientos y un tratamiento testigo, en los cuales se utilizaron 8 plantas por tratamiento. A cada unidad experimental se les inocularon 10mL de suspensión de esporas de 1×10^6 esporas/mL de cada aislamiento de *Trichoderma* spp. inoculadas 10 días previos a la inoculación con *F. oxysporum*. Posteriormente se inocularon 10 mL de una suspensión de esporas de *F. oxysporum* fue de 1×10^7 esporas/mL a la base de cada planta.

Una vez establecido el experimento se realizó un registro fotográfico de la planta completa, la parte foliar, y del bulbo y raíz segmentados para observar los síntomas de la infección por *F. oxysporum* cada 20 días, tomando el día del trasplante como día 0 del experimento. Las evaluaciones posteriores consistieron en tomar dos plantas por tratamiento y analizar los síntomas de enfermedad causada por *F. oxysporum*.

6.5.6.1. Colonización de las raíces de nardo por parte de *Trichoderma* y *Fusarium oxysporum* durante su interacción con la raíz del nardo.

A partir de raíces recuperadas de la evaluación de la protección *in planta* del día 40 del experimento se realizó la tinción con azul de tripano para visualizar el micelio dentro y fuera de las raíces. La tinción se realizó siguiendo la misma metodología que en las otras pruebas de colonización. Se realizaron observaciones en microscopio óptico.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamientos de *Fusarium* spp.

Se obtuvieron 24 aislamientos de *Fusarium* spp. de muestras de tejido vegetal enfermo y de la rizósfera de cultivos de Nardo provenientes de parcelas comerciales del Estado de Morelos y muestras obtenidas a partir de plántulas establecidas en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) con el material vegetal proveniente de Morelos, además de dos aislamientos obtenidos de especies silvestres de *Polianthes* de Lagos de Morelos y Tlaxcala (Tabla 7.1). Todos estos aislamientos se recuperaron en medio selectivo NSA específico para hongos del género *Fusarium* y su principal objetivo fue utilizarlos en pruebas de colonización de raíz como filtro para descartar las cepas que no lograron colonizar la raíz del Nardo.

Tabla 7.1. Total de aislamientos pertenecientes al género *Fusarium* recuperados de diferentes sitios de colecta, rizósfera, material vegetal y medios selectivos.

CLAVE	SITIO DE COLECTA	MEDIO DE AISLAMIENTO	TIPO DE MUESTRA	CLAVE
THSMCIATEJ-B-1	CIATEJ	THSM	BULBO	
*FU-THMOR-M1-B-8	CIATEJ	THSM	BULBO	POF1
*POTRILDMM2-C	LAGOS DE MORENO	THSM	SUELO	POF2
FU-NSACIATEJ-R	CIATEJ	NSA	RAÍZ	
*FU-THSMCITEJ-B-6	CIATEJ	THSM	BULBO	POF3
*FU-THSMCIATEJ-B-2	CIATEJ	THSM	BULBO	POF4
FU-NSACIATEJ-B-5	CIATEJ	NSA	BULBO	
FU-NSACIATEJ-B-1	CIATEJ	NSA	BULBO	
*THSMCIATEJ-B-2	CIATEJ	THSM	BULBO	POF5
THSMCIATEJ-R-1	CIATEJ	THSM	RAÍZ	
FU-THSMCIATEJ-R-1	CIATEJ	THSM	RAÍZ	
THSMCIATEJ-B	CIATEJ	THSM	BULBO	
*POFUTLAXM1-D	TLAXCALA	NSA	SUELO	POF6
FU-NSACIATEJ-B-3	CIATEJ	NSA	BULBO	
FU-THSMCIATEJ-B-	CIATEJ	THSM	BULBO	POF7

FU-THSMCIATEJ-B-5	CIATEJ	THSM	BULBO	
FU-THSMCIATEJ-B-1	CIATEJ	THSM	BULBO	
*NASMOR-M1-B	MORELOS	NSA	BULBO	POF8
*NSAMOR-M1-F-S	MORELOS	NSA	SUELO	POF9
THSMNOR-M1-B	MORELOS	THSM	BULBO	
THSMCIATEJ-R	CIATEJ	THSM	RAÍZ	
NSAMOR-M1-F-S	MORELOS	NSA	SUELO	
NSAMOR-M2-B	MORELOS	NSA	BULBO	
NSACIATEJ-R	CIATEJ	NSA	RAÍZ	

*: Aislamientos de *Fusarium oxysporum* seleccionados para su caracterización.

De los 24 aislamientos obtenidos, se realizó un filtro de preselección para obtener únicamente cepas de *F. oxysporum* utilizando un medio selectivo KOMADA específico para esta especie (Blok *et al.* 1997; Vujanovic *et al.* 2002). En este último filtro se descartaron la mayoría de los aislamientos, ya que solo nueve de ellos lograron crecer en el medio selectivo para *F. oxysporum*. Los aislamientos seleccionados en su mayoría provinieron de cultivos de *Polianthes tuberosa* var. Doble, provenientes de parcelas comerciales sanas y enfermas del Estado de Morelos (Tabla 7.1). A partir de los nueve aislamientos seleccionados se realizó una serie de pruebas para seleccionar finalmente una cepa patogénica la cual se utilizó en pruebas de protección confrontando aislamientos de *Trichoderma* spp.

Por otra parte, se evaluaron a nivel *in vitro*, los principales mecanismos de patogénesis reportados para *Fusarium oxysporum* en cultivos. En primera instancia se evaluó la capacidad de colonización y penetración de la raíz del Nardo. En segunda instancia, se evaluó la producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal (pectinasas). En tercera instancia, se evaluó la capacidad del hongo para contrarrestar los mecanismos de defensa vegetal del Nardo, incluyendo capacidad de resistir el estrés oxidativo por la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) y la capacidad de detoxificar fitoanticipinas (saponinas) producidas por el Nardo. Posteriormente se evaluó su patogenicidad en planta y finalmente se seleccionó una cepa, la cual resulto ser la más virulenta a la cual se le realizó una última prueba que consistió en evaluar en la producción de fitotoxinas. La cepa de *F. oxysporum* seleccionada se utilizó en pruebas de protección en confrontación con aislamientos de *Trichoderma* sp. como prueba final en plantas de Nardo.

7.2. Evaluación de la colonización y penetración a la raíz del Nardo (*Polianthes tuberosa*) por aislamientos de *Fusarium oxysporum*.

Se logró el establecimiento de las pruebas de colonización y penetración de raíces bajo condiciones *in vitro*, utilizando raíces cortadas de los bulbos de plantas de Nardo. Inicialmente la prueba de colonización se realizó utilizando bulbos completos con sus raíces, pero se realizó una comparación si el uso de raíces cortadas no modificaba de manera sustancial la evaluación, considerando la cantidad de material vegetal a utilizar que se requeriría para cada evaluación. El comportamiento observado fue similar en cuanto a tiempo de colonización. De esta manera el espacio necesario fue menor y el material vegetal utilizado pudo continuar con su propagación, sin sacrificar un bulbo completo en cada prueba (Fig. 7.1).

Se utilizaron las nueve cepas seleccionadas, de las cuales todas lograron la colonización completa, es decir, lograron crecer sobre la raíz, pero no todas fueron capaces de penetrar las raíces y alcanzar el haz vascular. En esta evaluación la raíz fue alcanzada por *F. oxysporum* a las 48 horas después de la inoculación con la suspensión de esporas del hongo, el método de inoculación fue exactamente igual en todos los tratamientos. Se utilizaron de tres a cuatro raíces por caja, cada raíz con una gota de suspensión de esporas a una distancia de 2.5cm, colocando la raíz a un extremo de la caja y la suspensión de esporas al otro extremo, la concentración de la suspensión de esporas fue de 1×10^6 esporas/mL (Fig. 7.1).

Una vez que el micelio alcanzó la raíz, se dejaron por 24h más para observar si el hongo penetraba dentro de la raíz e incluso llegaba al haz vascular. Las raíces fueron sometidas a un método de tinción con azul de tripano y observadas al microscopio óptico. La cepa que mostró mejor capacidad de colonización de raíz fue el aislamiento POF1 (Fig. 7.3), mostrando una mayor cantidad de crecimiento micelial en la superficie y dentro de la raíz. Además los aislamientos POF4 y POF8 mostraron colonización de las raíces y haz vascular. Los demás aislamientos presentan penetración de la raíz pero un menor grado de colonización. En algunas raíces se pudo observar micro y macroconidios. Destacó el aislamiento POF9 que no penetró dentro de la raíz, solo mostró una colonización de la superficie externa de la raíz.

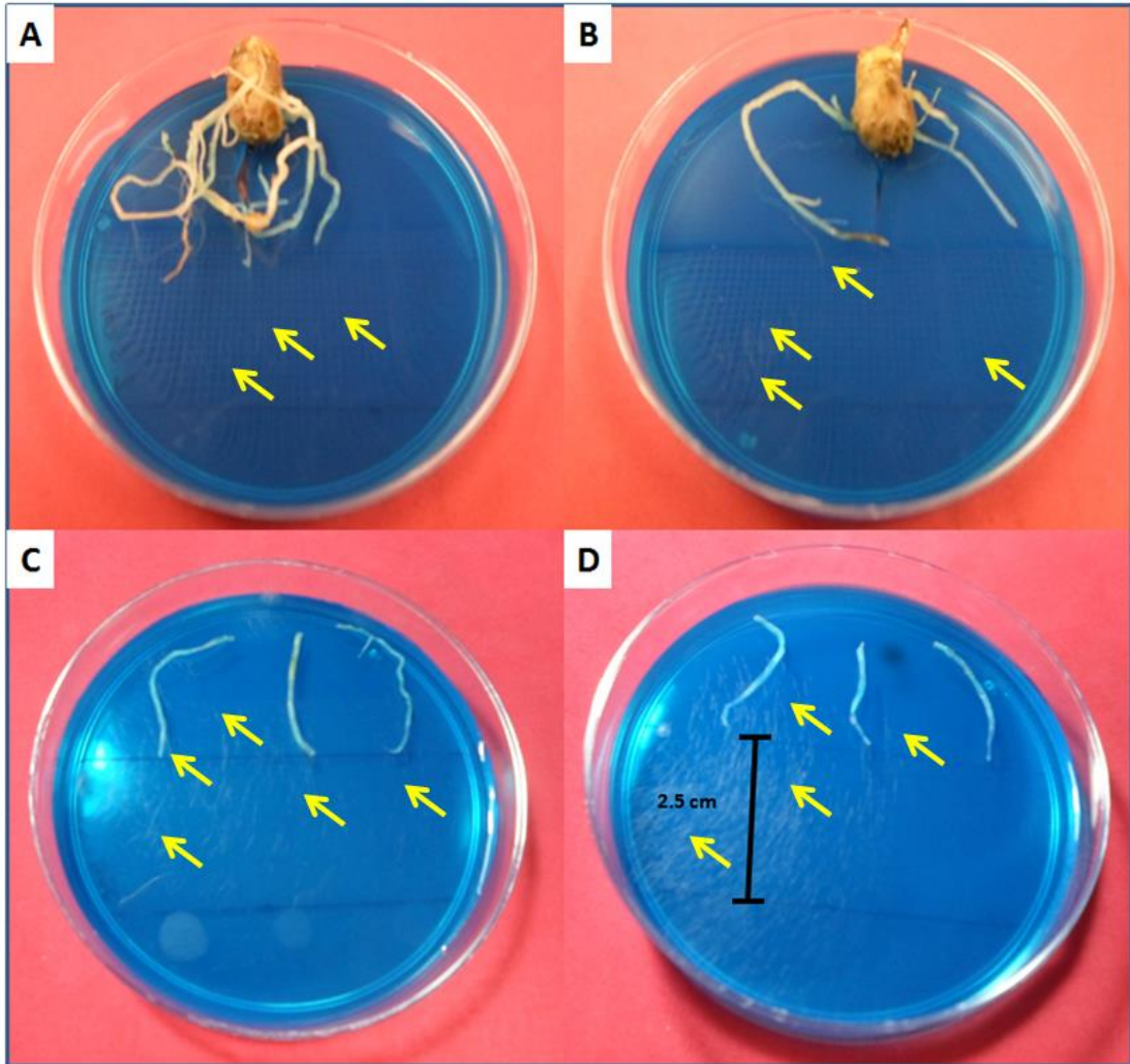


Figura 7.1. Evaluación de la colonización y penetración a la raíz del Nardo (*Polianthes tuberosa*) por aislamientos de *Fusarium oxysporum*. Comparación entre el uso de bulbo y raíz del nardo y el uso de raíz cortada. **A y B:** Evaluación de colonización inicial con bulbos completos y sus raíces, **C y D:** Evaluación de colonización y penetración utilizando solo raíces cortadas del bulbo. Las flechas indican la presencia de micelio en crecimiento hacia las raíces.

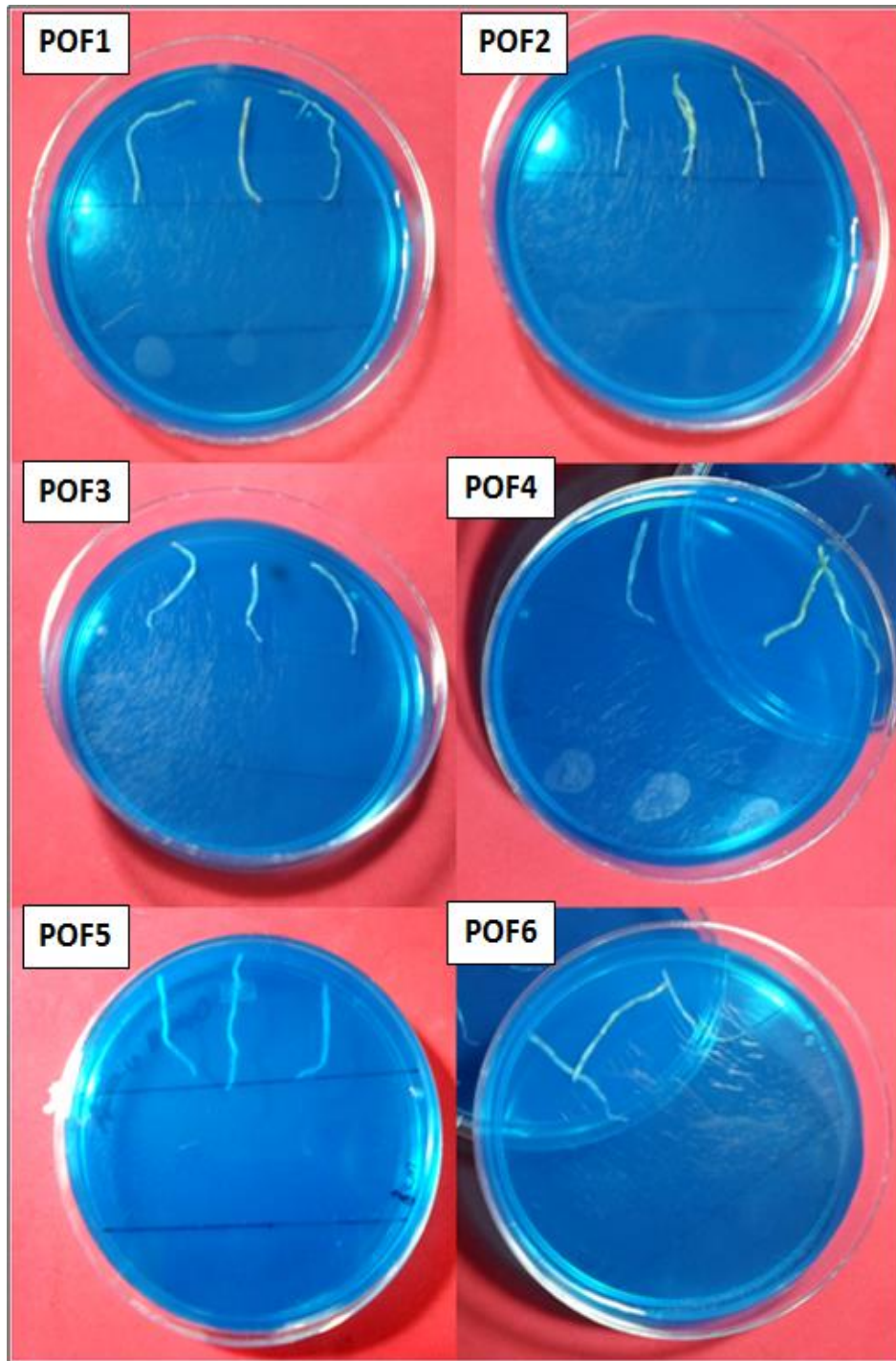


Figura 7.2. Evaluación de la colonización y penetración a la raíz del Nardo (*Polianthes tuberosa*) por aislamientos de *Fusarium oxysporum*. Colonización de raíces de nardo por *F. oxysporum*. En la imagen se muestran algunos aislamientos utilizados en las pruebas de colonización de raíces.

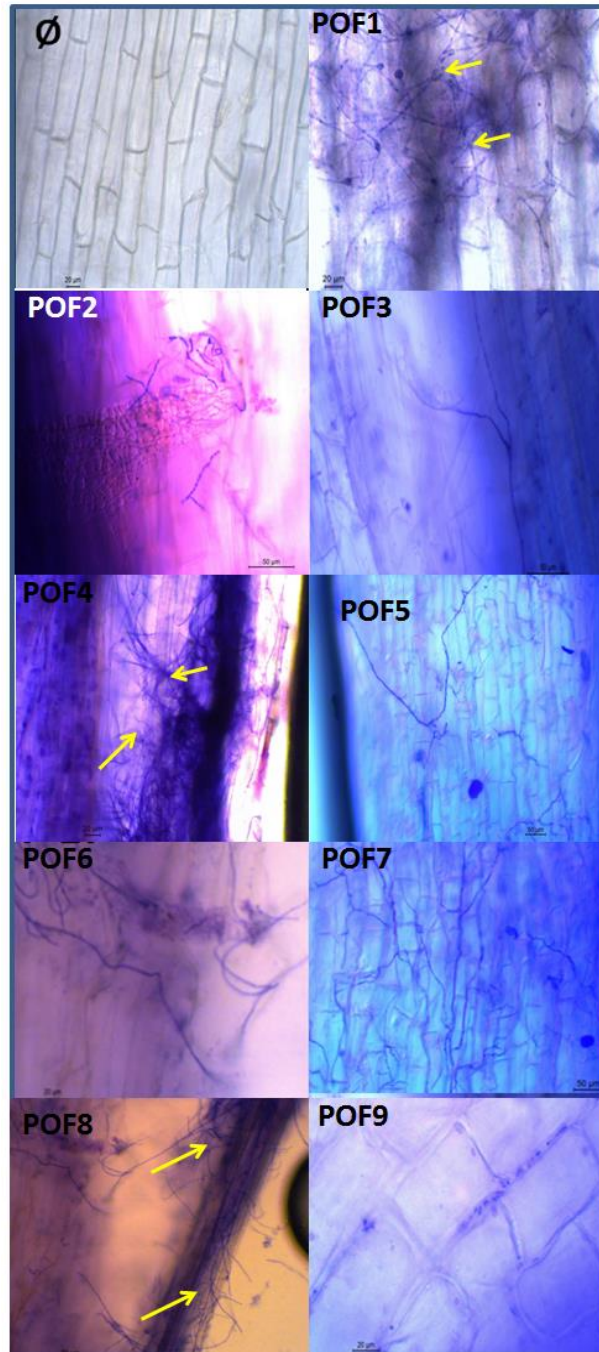


Figura 7.3. Evaluación de la penetración de raíces de nardo de los aislamientos de *Fusarium oxysporum*. Tinción y observación de raíces colonizadas por cepas de *F. oxysporum* comparadas con una raíz testigo (Ø) que no fue inoculada con *F. oxysporum*. Las flechas indican la presencia del hongo en los haces vasculares de las raíces. Grado de colonización y penetración: 0: Sin micelio dentro de la raíz, 1: Crecimiento mínimo dentro de la raíz, 2: Crecimiento moderado dentro de la raíz, 3: Crecimiento abundante dentro de la raíz.

7.3. Evaluación de la producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal (Pectinasas) por *Fusarium oxysporum*.

En esta evaluación se pretendió visualizar la capacidad de cada aislamiento para degradar los constituyentes de la raíz y su pared celular, a través del crecimiento micelial de cada aislamiento en presencia del medio PEL, que contiene ácido poligalacturónico (PGA) un sustrato para enzimas pectinasas, principalmente poligalacturonasas (PG) y pectatoliasas (PL).

El medio PEL fue desarrollado para la evaluación de pectinasas, principalmente de bacterias, provocando la necesidad de ciertos nutrientes para que estos organismos puedan crecer en él. Sin embargo, para los hongos la presencia de estos nutrientes provocó que se observara un crecimiento diferenciado pero no restringido como es el objetivo de la prueba lo que hizo necesario modificar el medio PEL con un medio de cultivo mínimo adicionado como fuente de carbono glucosa al 0.1% (MM+Glu) o ácido poligalacturónico 1% (MM+PGA).

La evaluación con el medio PEL sin modificar mostró que los aislamientos POF1, POF6 y POF18 presentaron el mayor crecimiento micelial en comparación con los demás aislamientos (Fig. 7.4), lo que se relacionó con una mayor producción de enzimas que degradan la pared celular. Mientras que las que mostraron un menor crecimiento fueron POF3 y POF9.

Por otra parte, cuando el medio PEL se modificó, la inhibición en el crecimiento del aislamiento fue mucho más evidente y se consideró una escala cualitativa del 0 al 3 para describir el crecimiento de cada aislamiento, donde 0: Sin crecimiento, 1: Crecimiento menor al 20% con respecto al testigo, 2: crecimiento menor al 60% con respecto al testigo y 3: Crecimiento mayor al 60% con respecto al testigo (Fig. 7.5). Los resultados observados en esta prueba mostraron que POF1 fue el aislamiento que creció mejor en medio MM+PGA con un grado 3, junto con POF6. Mientras que los aislamientos POF8 mostró un grado 2. Los aislamientos POF2, POF3, POF4, POF5, POF7 y POF9 fueron los que presentaron el menor crecimiento en MM+PGA con un grado 1. Ninguno de los crecimiento presentó el grado 0, al presentarse al menos un crecimiento micelial bajo en todos los aislamientos.

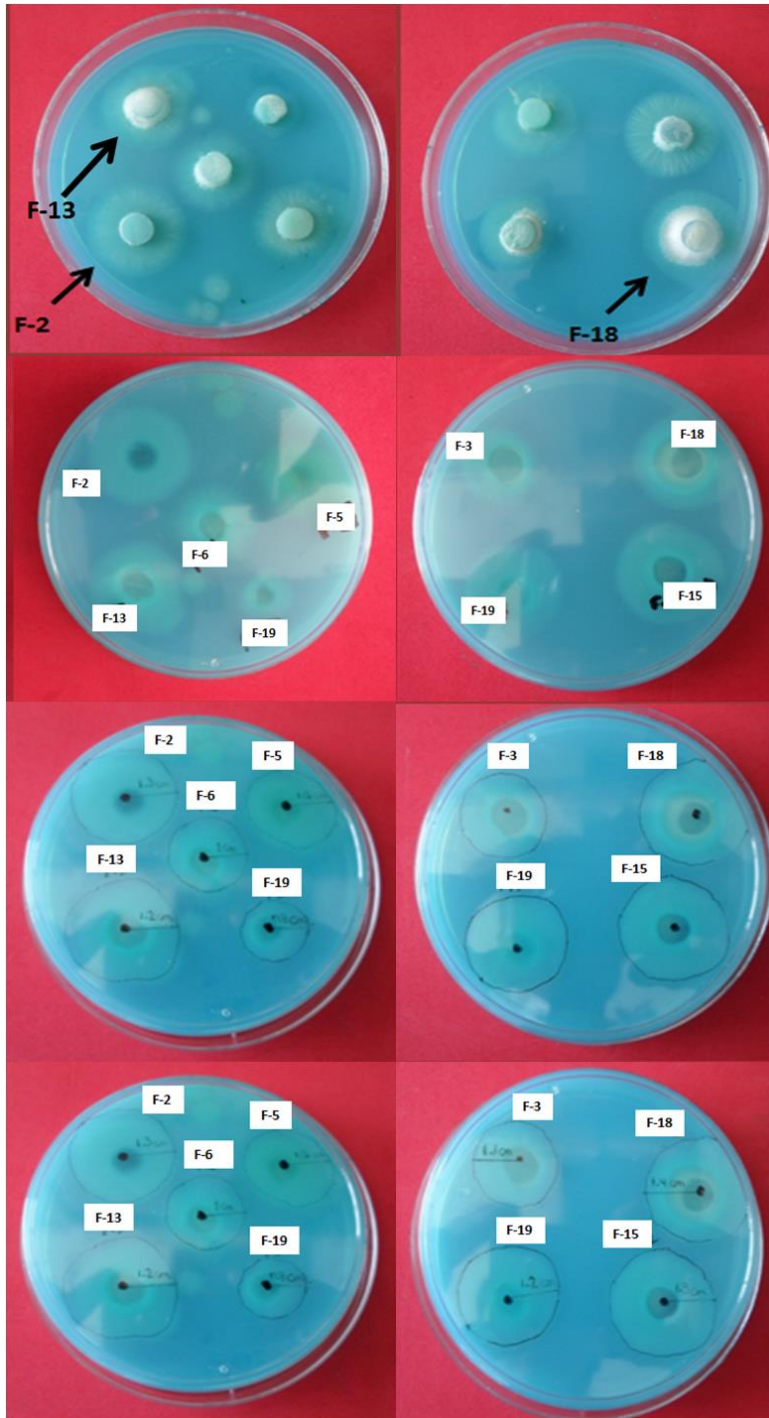


Figura 7.4. Evaluación de la producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal (Pectinasas) por *Fusarium oxysporum*. En la parte superior de la figura se observa el crecimiento de la cepa F-18 (POF-8) en comparación con otras cepas, siendo F-18 la cepa que muestra un mayor crecimiento sobre el medio PEL. En la parte inferior de la figura se observa el crecimiento de la cepa F-2 (POF-1) y F-13 (POF-6) en comparación con otras cepas de *Fusarium oxysporum*, siendo F-2 la cepa que mostro un mayor crecimiento sobre el medio PEL, aunque menor que el crecimiento que mostro la cepa F-18 con 1.04mm y F.2 con 1.03mm y F-13 con 1.02mm de radio. Los resultados tomados fueron cualitativos, realizando únicamente medición del radio del crecimiento micelial.

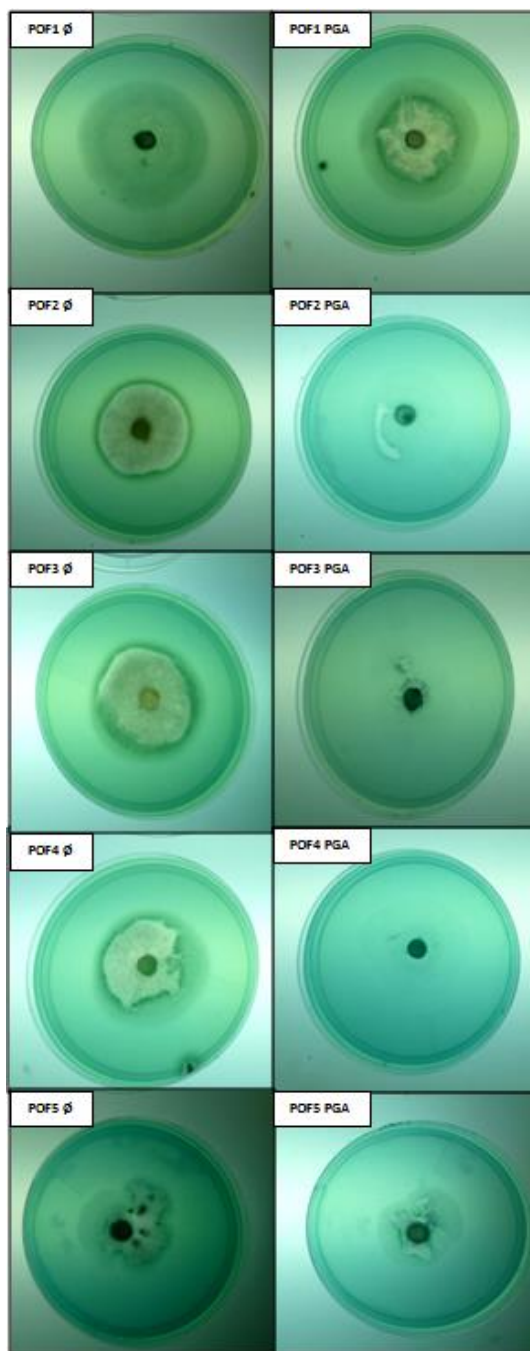


Figura 7.5. Evaluación de la producción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal (Pectinasas) por *Fusarium oxysporum*. Crecimiento de aislamientos después de 5 días de siembra en comparación de su control crecido en medio MM+Glu (medio mínimo adicionado con glucosa al 0.1%) y su crecimiento en medio MM+PGA (medio mínimo adicionado con ácido poligalacturónico al 1%). Grado de producción de enzimas que degradan pared celular: 0: Sin crecimiento, 1: Crecimiento mínimo menor al 20% con respecto al testigo, 2: Crecimiento menor al 60% con respecto al testigo, 3: Crecimiento mayor al 60% con respecto al testigo.

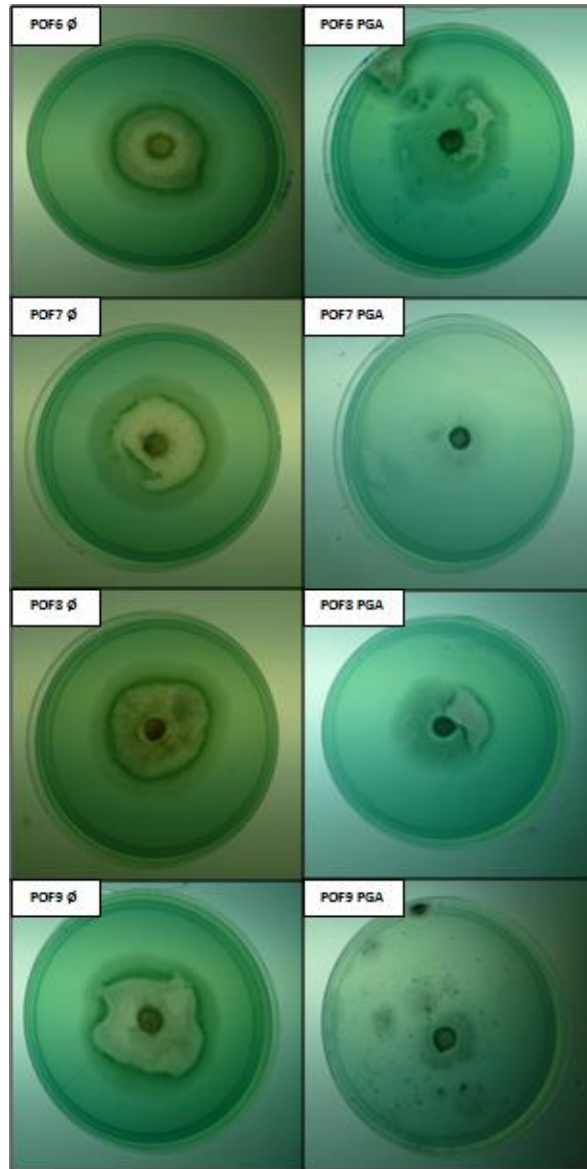


Figura 7.5. (Continuación) Evaluación de la producción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal (Pectinasas) por *Fusarium oxysporum*. Crecimiento de aislamientos después de 5 días de siembra en comparación de su control crecido en medio MM+Glu (medio mínimo adicionado con glucosa al 0.1%) y su crecimiento en medio MM+PGA (medio mínimo adicionado con ácido poligalacturónico al 1%). Grado de producción de enzimas que degradan pared celular: 0: Sin crecimiento, 1: Crecimiento mínimo menor al 20% con respecto al testigo, 2: Crecimiento menor al 60% con respecto al testigo, 3: Crecimiento mayor al 60% con respecto al testigo.

7.4. Evaluación de la resistencia de *Fusarium oxysporum* al estrés oxidativo *in vitro*.

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), es un mecanismo de defensa que tienen las plantas, asociado a la Respuesta Hipersensible (HR). Para algunas interacciones planta-patógeno se ha observado que *F. oxysporum* puede llegar a inhibir la actividad de peroxidasas para contrarrestar la respuesta de defensa (Bahena-Reyes 2014; Lopez-Velazquez 2015), esto implica que al inhibir esta respuesta provoque un aumento en la acumulación de ROS en el sitio de infección, haciendo necesario que el patógeno sea capaz de manejar este tipo de respuesta de la planta. Por este motivo, se consideró como un mecanismo de patogénesis importante en la interacción *F. oxysporum* – *Polianthes tuberosa* sea la resistencia al estrés oxidativo.

Una evaluación de la resistencia del estrés oxidativo es descrita para bacterias del género *Dickeya* utilizando al dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo, empleado en su forma comercial Paraquat incluido en un medio de cultivo para la inducción de un estrés oxidativo (Navarro-Lopez 2012). Siguiendo esta premisa, se realizó el experimento utilizando diferentes concentraciones de Paraquat 500, 750 y 1000 μM para observar un efecto inhibitorio en el crecimiento de los aislamientos de *F. oxysporum* en comparación con su crecimiento en un medio sin Paraquat. Se utilizó una escala cualitativa del 0 al 3 considerando el grado de resistencia ROS, donde 0: sin crecimiento micelial, 1: Crecimiento micelial menor al 30% con respecto al testigo, 2: Crecimiento menor al 75% con respecto al testigo, 3: Crecimiento mayor al 75% con respecto al testigo

Los resultados mostraron que en general los aislamientos de *F. oxysporum*, presentaron una resistencia significativa al estrés oxidativo inducido por el Paraquat después de 7 días de crecimiento (Fig. 7.6). Ningún aislamiento presentó el grado de resistencia 0 o el 1, mientras que el grado 2 solo se observó en los aislamientos POF3, POF4 y POF8. Mientras que los demás aislamientos presentaron un crecimiento equivalente o incluso mayor que en los testigos. Algunos de los aislamientos como POF1 y POF5 incluso mostraron un crecimiento mayor al testigo.

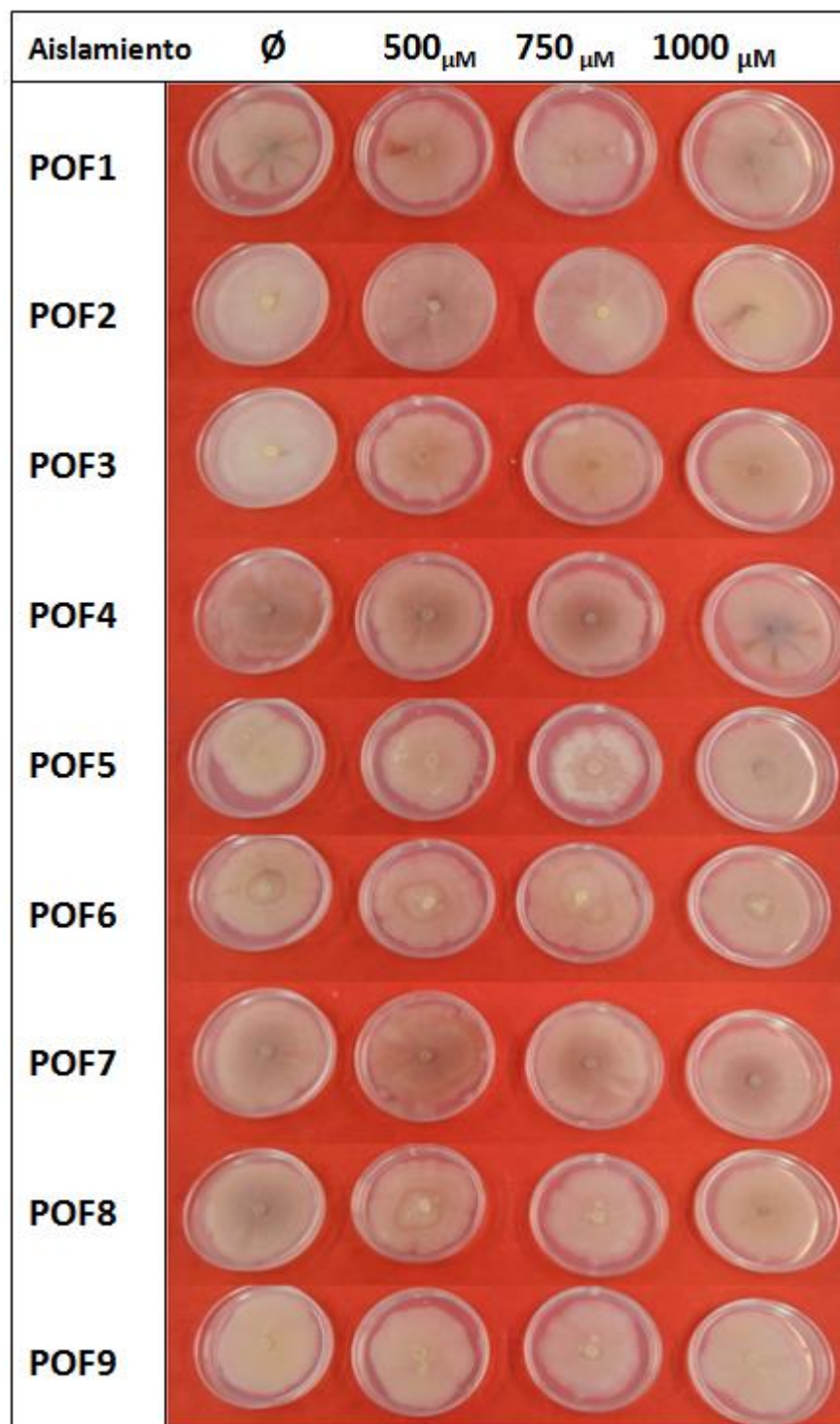


Figura 7.6. Evaluación de la resistencia de *Fusarium oxysporum* al estrés oxidativo *in vitro*. Efecto del estrés oxidativo inducido por el dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo en el crecimiento de los aislamientos de *F. oxysporum*, después de 7 días de crecimiento a las concentraciones de 500, 750 y 1000 μM . Grado de resistencia al estrés oxidativo: 0: sin crecimiento miceliar, 1: Crecimiento miceliar menor al 30% con respecto al testigo, 2: Crecimiento menor al 75% con respecto al testigo, 3: Crecimiento mayor al 75% con respecto al testigo.

7.5. Evaluación de la resistencia de *Fusarium oxysporum* a las fitoanticipinas de raíces y bulbo del nardo (*Polianthes tuberosa*).

La mayoría de las plantas producen metabolitos con propiedades antimicrobianas denominadas como fitoanticipinas, siendo un mecanismo de defensa constitutivo que les permite contrarrestar la infección de la mayoría de los microorganismos con capacidad de penetrar en la planta. Un importante mecanismo de patogénesis asociado a *F. oxysporum*, es la capacidad de destoxificar estos metabolitos, incluyendo aquellos con una marcada toxicidad como son las saponinas, que han sido descritas para la raíz y bulbo del nardo (SINGH *et al.*, 2011, Maliga, 2003, Firdous *et al.*, 1999).

Como primer paso para evaluar su efecto sobre los aislamientos de *F. oxysporum*, fue necesario extraer estos metabolitos de las raíces y bulbos del nardo. Se extrajeron las saponinas directamente del material vegetal de bulbo y raíz del nardo completamente sanas sin tratar. Empleando 100g de material vegetal deshidratado y triturado que se disolvió en metanol al 95%. Se recuperaron 13.275g de los 100g de material deshidratado realizando su cuantificación por medio de espectrofotometría (Baccou *et al.* 1977). Se obtuvo una cantidad de 0.8862g de saponinas por cada gramo del extracto obtenido.

Una vez que se obtuvieron las saponinas, se realizó una evaluación del efecto inhibitorio del crecimiento de los aislamientos de *F. oxysporum* a través de un antibiograma con discos de papel. Sin embargo, esta evaluación no permitió diferenciar de manera adecuada esta inhibición en el crecimiento, en gran medida por la capacidad de los aislamientos a tolerar estos metabolitos bajo estas condiciones. Se buscó contrastar esta inhibición utilizando una cepa no patogénica de *F. oxysporum* denominada como FAVR3 con una baja capacidad de tolerar las saponinas del agave (Bahena-Reyes 2014). Se observó que la cepa FAVR3 presentó una inhibición en su crecimiento a los 150 mg/mL (Fig. 7.7A, B), aunque esta inhibición no fue muy clara, mostrando un crecimiento irregular con respecto al testigo. Mientras que para el aislamiento POF1 se observó que la inhibición fue menor con respecto al testigo (Fig. 7.7C). Los resultados obtenidos no permitieron diferenciar de manera clara un efecto inhibitorio en el crecimiento de POF1 con respecto al testigo, o con las diferentes concentraciones de las saponinas.

Por este motivo, se realizó la evaluación del efecto inhibitorio de las saponinas sobre los aislamientos de *F. oxysporum* a través de la evaluación de la viabilidad celular con TTC (Shaaban H. Moussa *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos mostraron que las saponinas afectan de manera significativa la viabilidad de todos los aislamientos (Fig. 7.8). Sin embargo, este efecto inhibitorio es bajo con respecto al testigo. En su mayoría los aislamientos presentaron un grado 3 de resistencia a fitoanticipinas, con excepción de los aislamientos POF7 y POF8 que se consideraron como grado 2.

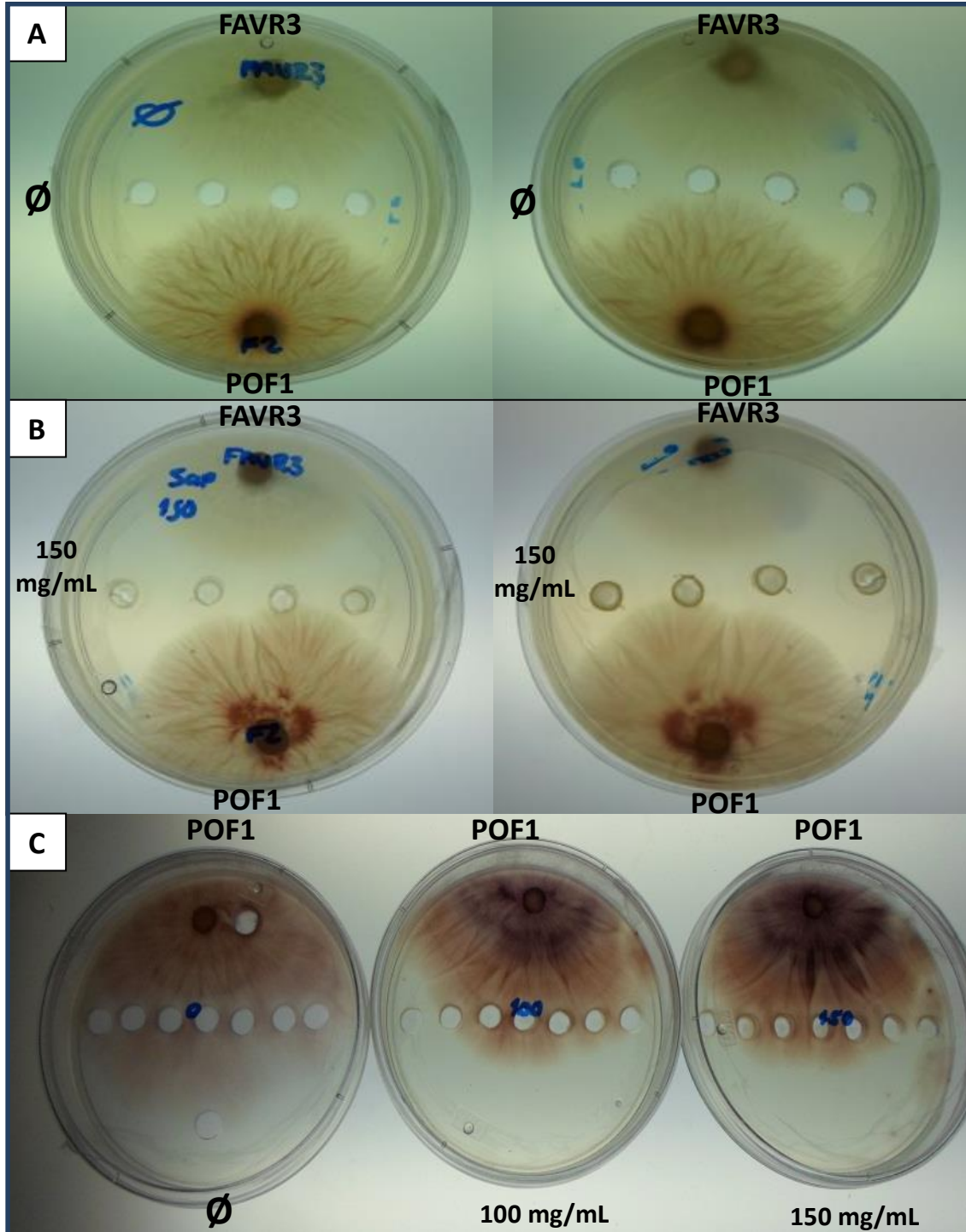


Figura 7.7. Evaluación de la resistencia a fitoanticipinas del nardo de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* por medio de sensidiscos. FAVR3: Cepa no patogénica de *Fusarium oxysporum* sensible a saponinas, POF1: Aislamiento de *F. oxysporum* a partir de raíz y bulbo de nardo. **A:** Crecimiento testigo de FAVR3, **B:** Crecimiento de FAVR3 frente a sensidiscos con 150 mg/mL de saponinas, **C:** Crecimiento testigo de POF1, **D:** Crecimiento de POF1 frente a sensidiscos con 100 mg/mL de saponinas, **E:** Crecimiento de POF1 frente a sensidiscos con 150 mg/mL de saponinas.

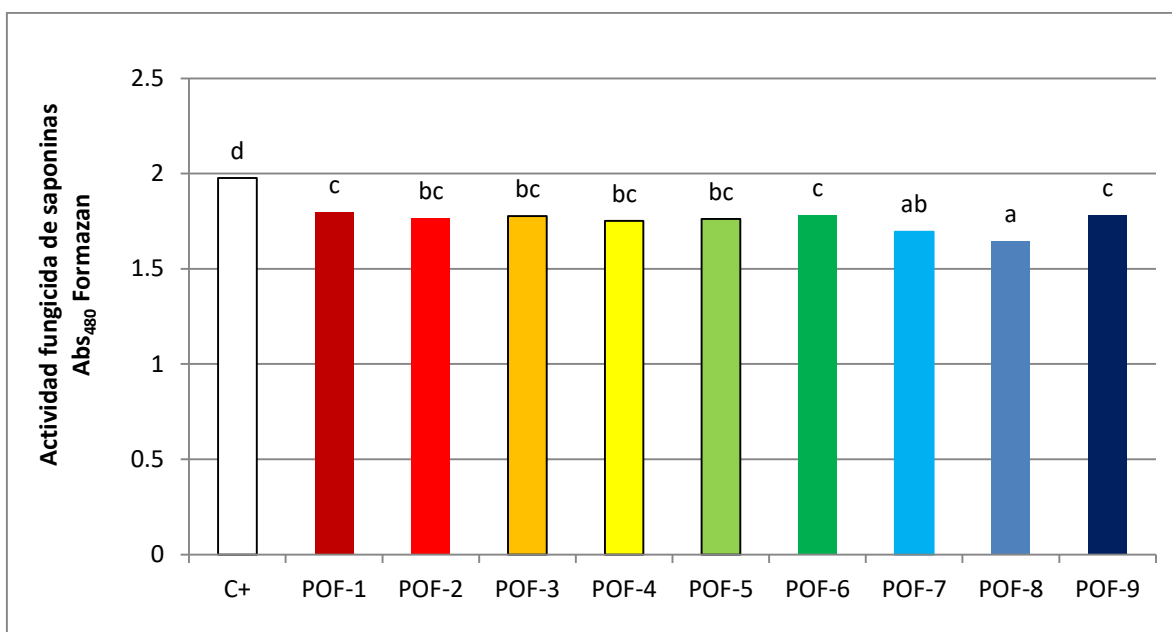


Figura 7.8. Evaluación de la resistencia de *Fusarium oxysporum* a las fitoanticipinas de raíces y bulbo del nardo (*Polianthes tuberosa*). Viabilidad celular de *Fusarium oxysporum* frente a Saponinas producidas por el Nardo (*Polianthes tuberosa*). **Representación de claves de los tratamientos con Saponinas:** C+=Control positivo, POF1 sin saponinas. A cada tratamiento se le aplicaron 200µl del extracto de Saponinas a una concentración de 100mg/1mL (equivalente a 17.724µg de saponinas). Prueba de Tukey con $P < 0.05$. Grado de resistencia a fitoanticipinas. 0: Inhibición del crecimiento del 90% o mayor con respecto al testigo, 1: Inhibición del crecimiento del 60% o mayor con respecto al testigo, 2: Inhibición del crecimiento del 40% o menos con respecto al testigo, 3: Inhibición del crecimiento del 10% o menos con respecto al testigo.

7.5. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* en plantas de Nardo (*Polianthes tuberosa*).

Se realizó la evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* en plantas de nardo, para caracterizar el proceso de infección *in planta*. Se utilizaron bulbos de *Polianthes tuberosa* variedad doble propagados a partir de material sano.

Cada uno de los aislamientos fue inoculado a la base de la planta y mantenidas en invernadero. Se realizaron observaciones cada 30 días por 60 días, tomándose un registro fotográfico de los síntomas a nivel foliar y tomando al menos 2 bulbos que fueron utilizados para visualizar el daño en la raíz y bulbo. A partir de estas observaciones se realizó una escala de severidad de la enfermedad, donde se describe el daño por la infección de los aislamientos (Fig. 7.9).

Los resultados mostraron que a los 30 días después de la inoculación de los aislamientos de *F. oxysporum* (D30), los síntomas de la enfermedad fueron de baja intensidad (Fig. 7.10), y

fue hasta los 60 días después de la inoculación de los aislamientos (D60) que se observaron síntomas evidentes en el bulbo del nardo (Fig. 7.11).

En esta evaluación los resultados representativos de acuerdo a la patogénesis de *F. oxysporum* se observaron en la cepa POF1, al presentarse pudrición del bulbo y marchitez del follaje al D60. Por su parte, POF7 también mostró pudrición en el bulbo e incluso causo una pudrición completa que llego hasta la muerte en una planta del tratamiento. El resto de los tratamientos no mostraron síntomas marcados, algunos mostraron ligera presencia de clorosis en el follaje y pérdida de raíces en los bulbos pero la infección no llego a causar una pudrición marcada. Algunos tratamientos mostraron un resultado similar al del testigo, donde no hubo pudrición del bulbo ni de raíces (Fig. 7.11).

De acuerdo a la escala de severidad de la enfermedad (Fig. 7.9) se obtuvo el desarrollo de la enfermedad para cada aislamiento. A partir de estos resultados se observó el aislamiento POF1 presentó una incidencia del 80% del grado 4 y 5, siendo la mayor para todos los aislamientos. Le siguieron los aislamientos POF4 y POF7 que también presentaron el grado 5 y 4, y POF 6 que presentó solo grado 4. Su incidencia de estos grados estuvo entre el 40 y 60%. Por otra parte, los aislamientos POF2, POF5 y POF8 presentaron el grado 4 pero con una incidencia menor al 40%. Finalmente, los aislamientos POF3 y POF5 mostraron un grado 3 o 2 que se consideró como no patogénico.

A partir de las muestras de bulbo y raíz tomadas el D60 se realizó un reaislamiento (postulados de Koch) para comprobar que los síntomas inducidos son consecuencia de cada aislamiento inoculado. En el caso de las raíces, se realizaron cortes transversales y una tinción con azul de tripano para observar la colonización de cada aislamiento. Se encontró colonización de *F. oxysporum* en todos los tratamientos con excepción del control. Aunque si se observó diferencia entre aislamientos (Fig. 7.13).

ESCALA	PLANTAS DE 60 DÍAS	CARACTERISTICAS
1		PLANTA COMPLETAMENTE SANA. SIN SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD Y CON EXCELENTE DESARROLLO DEL BULBO, RAÍZ Y AREA FOLIAR
2		PLANTA SANA SIN SINTOMAS DE ENFERMEDAD. BUEN DESARROLLO DE RAIZ, BULBO Y FOLIAR
3		PLANTA SANA SIN SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD. DESARROLLO BULBO Y AREA FOLIAR MENOS
4		PLANTA CON SÍNTOMAS MODERADOS DE ENFERMEDAD (CLOROSIS AREA FOLIAR Y NECROSIS EN RAÍCES)
5		PLANTA CON SINTOMAS MARCADOS DE ENFERMEDAD (CLOROSIS AVANZADA AREA FOLIAR Y PUDRICIÓN DE BULBO Y RAÍZ)

Figura 7.9. Escala de severidad de la enfermedad de *F. oxysporum* en plantas de Nardo (*Polianthes tuberosa*). Escala donde se observan síntomas de la enfermedad causada por *Fusarium* (escala 1-5), obtenida a partir de la evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *Fusarium oxysporum*.

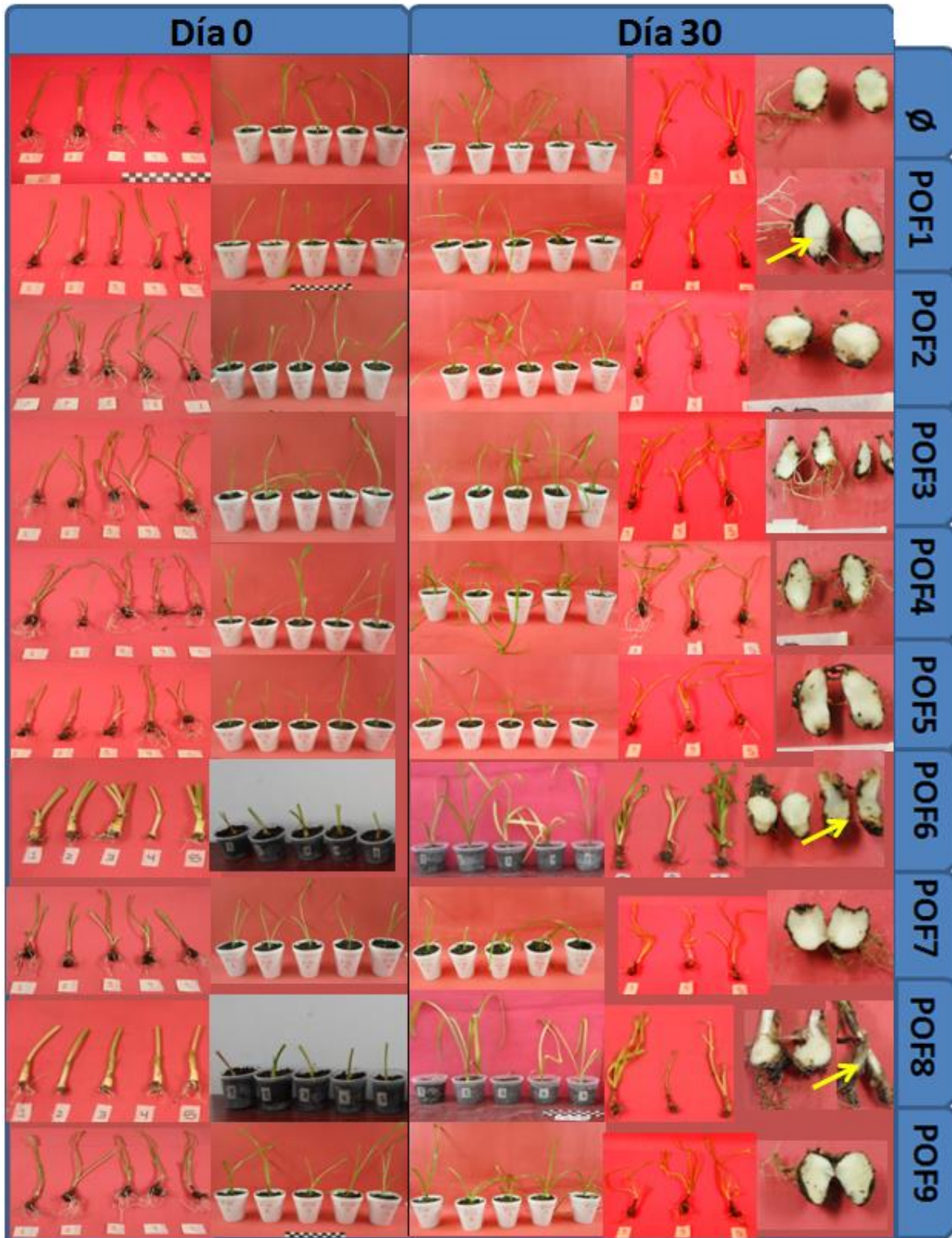


Figura 7.10. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* en plantas de Nardo (*Polianthes tuberosa*) 30 días después de su inoculación. Avances de los síntomas de la enfermedad causada por *F. oxysporum* en el bulbo y raíz de las plantas de Nardo, partiendo de plantas sanas D-0 hasta plantas con síntomas visibles y plantas con síntomas claros de la enfermedad al D-30. D-0= día de la inoculación con *F. oxysporum*, D-30= 30 días después de la inoculación con *F. oxysporum*.

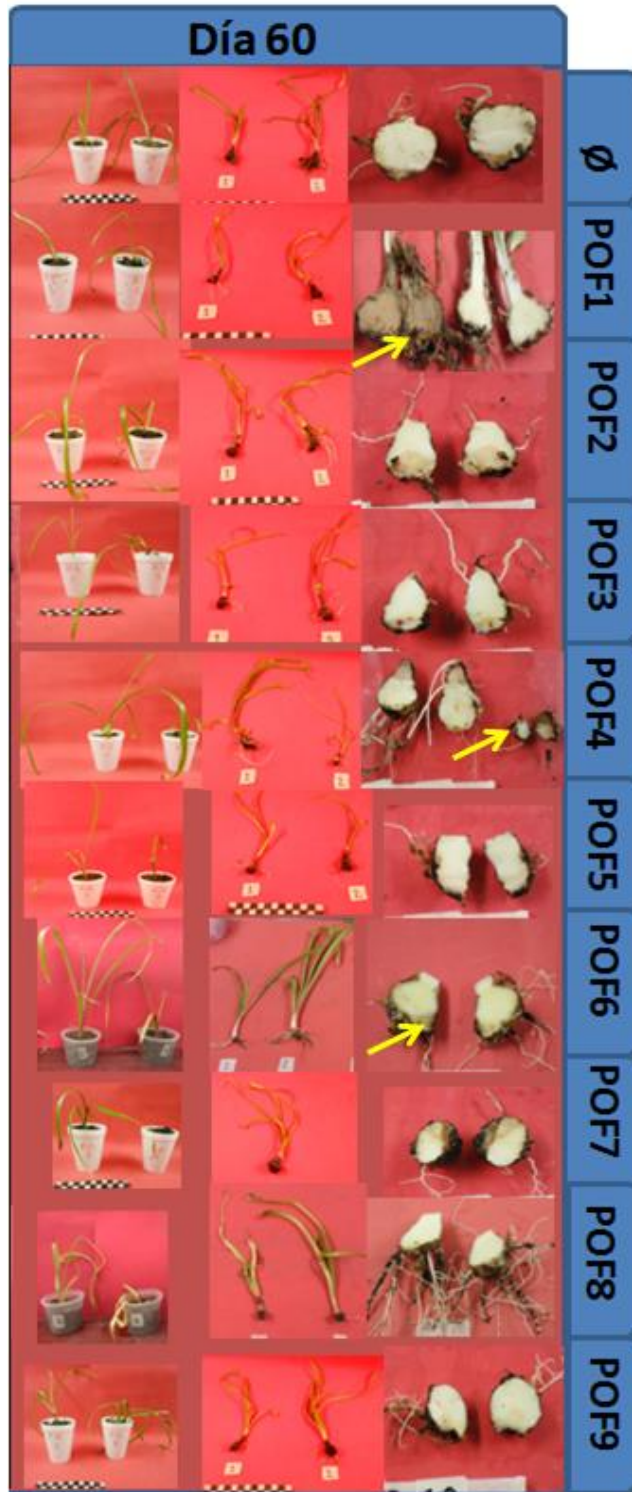


Figura 7.11. Evaluación de la patogenicidad de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* en plantas de Nardo (*Polygonatum tuberosum*) 30 días después de su inoculación. Avances de los síntomas de la enfermedad causada por *F. oxysporum* en el bulbo y raíz de las plantas de Nardo. Plantas con síntomas visibles y plantas con síntomas claros de la enfermedad al **D-60**. **D-0**= día de la inoculación con *F. oxysporum*. Las flechas en la imagen indican pudrición visible en los bulbos al día 60 del experimento.

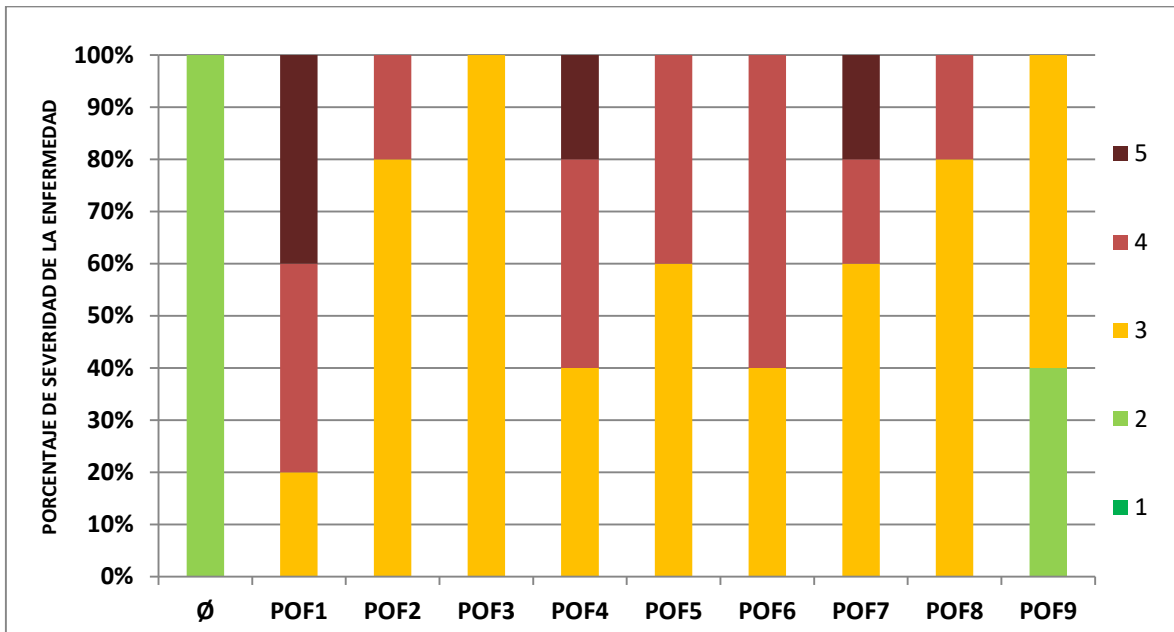


Figura 7.12. Desarrollo de la enfermedad de cada aislamiento después de 60 días de inoculado en plantas de Nardo (*Polianthes tuberosa*). Porcentaje de incidencia del grado de severidad de la enfermedad. Escala 1= Planta completamente sana con un buen desarrollo, 2= Planta sana con desarrollo normal, 3= Planta sana sin síntomas de enfermedad, 4= Planta con síntomas de enfermedad y 5= Planta con síntomas notables de enfermedad.

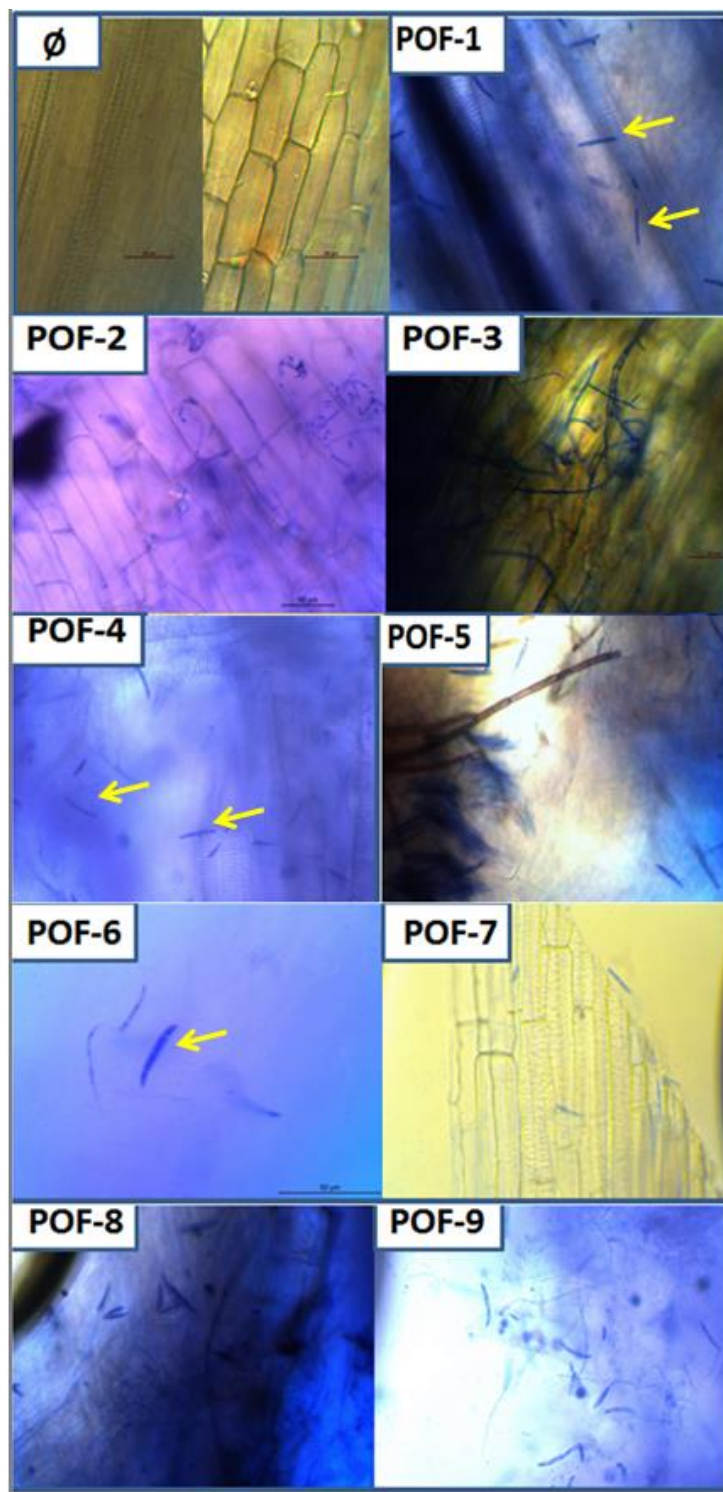


Figura 7.13. Colonización de raíces de nardo por los aislamientos de *Fusarium oxysporum*. Tinción de raíces utilizadas en pruebas de patogenicidad donde se muestra la producción de micro conidias y macro conidias de los aislamientos de *F. oxysporum* utilizados en todos los tratamientos en comparación de resto de los tratamientos en comparación con el control. Imágenes con flechas indican la presencia de macro esporas dentro de los ases basculares de la raíz al día 60 del experimento.

7.6. Producción de fitotoxinas por *Fusarium oxysporum*.

Finalmente, se evaluó la fitotoxicidad del aislamiento que presentó los mayores síntomas de enfermedad, el aislamiento POF1. Se obtuvo el filtrado del medio de cultivo donde creció POF1 durante 30 días, eliminando el micelio por medio de filtración. Este filtrado fue usado para observar la muerte celular inducida en raíces del nardo.

El ensayo tuvo una duración de 17 a 24 horas y posteriormente se realizó la prueba de viabilidad celular de raíz utilizando TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio). Los resultados mostraron que el filtrado indujo muerte celular en raíces del nardo (Fig. 7.14).

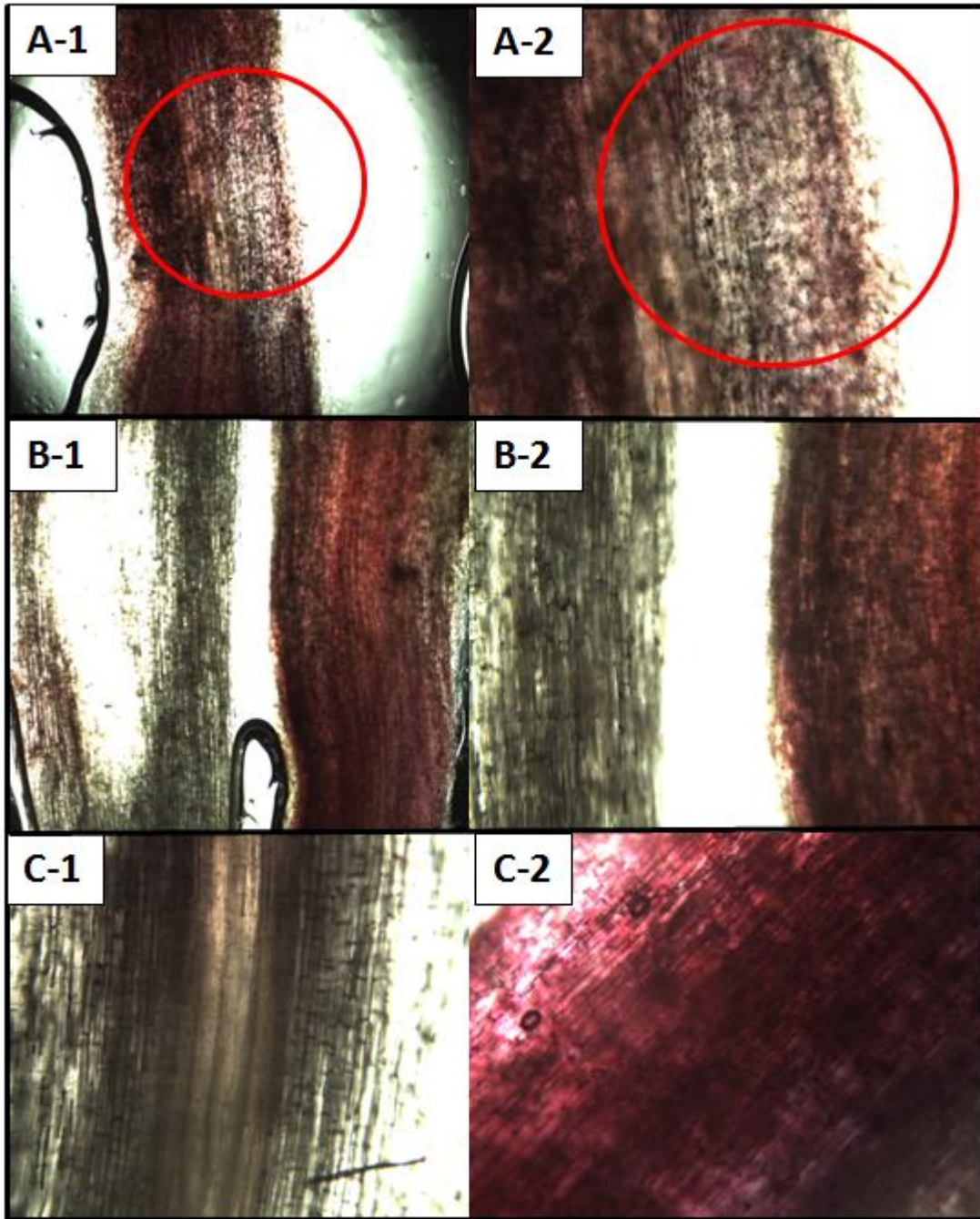


Figura 7.14. Inducción de fitotoxicidad por el aislamiento de *Fusarium oxysporum* POF1 en raíces de nardo. A-1 y A-2 se observa una raíz con células viables y marcadas con círculo rojo el daño ocasionado por las fitotoxinas en la parte de la raíz donde fue aplicada. En las figuras B-1, B-2 y C-1, C-2 se observan las diferencias entre una raíz que fue expuesta completamente a las fitotoxinas (B-1 y C-1) y una raíz control que no fue expuesta al extracto fitotóxico (B-2 y C-2), siendo la raíz con tinción la que muestra una total viabilidad celular mientras que la raíz tratada con fitotoxinas no muestra respiración ni reacción del indicador utilizado.

7.7. Relación cualitativa entre la evaluación de los mecanismos de patogénesis *in vitro* y la evaluación *in planta*.

A partir de los resultados de la evaluación de los mecanismos de patogénesis *in vitro* y la evaluación de la patogenicidad *in planta*, se buscó relacionar los resultados de ambas evaluaciones.

Para la evaluación *in planta* se obtuvo un índice de patogénesis *in planta* (IPATip). Para obtener este valor numérico se consideró una relación entre el grado de severidad de la enfermedad con el porcentaje de incidencia de la enfermedad (Fig. 7.12). Esta relación se dio con la siguiente fórmula: Índice de patogenicidad *in planta* = [(Grado de severidad de la enfermedad * Porcentaje de incidencia de la enfermedad) - índice de patogenicidad del testigo]. Los resultados se muestran en la tabla 7.2.

Para el índice de patogénesis *in vitro* (IPATiv), se realizó la sumatoria de los índices obtenidos de cada una de las evaluaciones de mecanismos de patogénesis (Tabla 7.3).

Se observó que el aislamiento POF1 fue el que mostró una mayor virulencia con los índices más altos de patogénesis (Fig. 7.3). Encontrándose una relación entre lo observado *in vitro* con lo observado *in planta*. Sin embargo, en los aislamientos que no fueron patogénicos en planta como fueron POF3 y POF9, su IPATiv fue bajo (7) e intermedio (8) respectivamente.

Un punto que compartieron los aislamientos no patogénicos fue su bajo grado de colonización de la raíz (CR) y su bajo grado de producción de enzimas que degradan la pared celular (PEDPC) *in vitro*. Esto mismo comparte con los aislamientos con potencial patogénico como fueron POF2 y POF5. Otro aislamiento con índice de potencial patogénico fue POF8. Sin embargo, este aislamiento presenta un grado CR muy alto (3) y PEDPC intermedio (2), pero donde presentó un índice bajo, fue en la de resistencia a saponinas (RSAP). Mientras que los aislamientos que presentaron un IPATip moderado fueron POF4, POF6 y POF7. Destacó que POF4 presentó un IPATip moderado (180) y su IPATiv fue bajo, algo que se puede relacionar a un grado RSAP moderado y un grado PEDPC bajo.

A partir de los resultados obtenidos, se pudo observar que uno de los valores con mayor relevancia fue CR, en donde si este se presentó bajo, el IPATip también era bajo. Esto mismo se observó con el grado de PEDPC, cuando se presentó bajo, el IPATip disminuyó de manera considerable. Las excepciones fueron POF4 y POF8, el primero presentó un grado bajo pero su IPATip fue moderado (180). Esto podría relacionarse a que cuenta con otro grupo de enzimas que degradan la pared, no necesariamente del tipo PG. Y en el caso de POF8, aunque presentó grados moderados y altos de CR, PEDPC, RRROS, el grado RSAP fue el más bajo con respecto a los demás aislamientos, lo que se relacionó como un mecanismo de patogénesis de gran relevancia.

Los mecanismos de patogénesis más relevantes para esta interacción fueron el grado de colonización de raíz, la producción de enzimas que degradan la pared celular (aquí asociadas a PG) y su resistencia a fitoanticipinas (aquí asociadas a saponinas). Mientras que la resistencia a ROS, fue una característica muy conservada en todos los aislamientos.

Tabla 7.2. Índice de patogénesis *in planta*.

Grado	testigo	POF1	POF2	POF3	POF4	POF5	POF6	POF7	POF8	POF9
5		200			100			100		
4		160	80		160	160	240	80	80	
3		60	240	300	120	180	120	180	240	180
2	200									80
1										
total	200	420	320	300	380	340	360	360	320	260
IPATip	0	220	120	100	180	140	160	160	120	60

No patogénico: 100 o menor. **Potencialmente patogénico:** mayor que 100 y menor que 150. **Patogénico:** mayor a 150 y menor a 200. **Patogénico con alta virulencia:** mayor a 200.

Tabla 7.3. Relación cualitativa entre la evaluación de los mecanismos de patogénesis *in vitro* y la evaluación *in planta*.

AISLAMIENTO	CR	PEDPC	RROS	RSAP	IPATiv	IPATip
POF-1	3	3	3	3	12	220
POF-2	1	1	3	2	7	120
POF-3	1	1	2	2	7	100
POF-4	2	1	2	2	7	180
POF-5	1	1	3	2	7	140
POF-6	2	3	3	3	11	160
POF-7	2	1	3	2	8	160
POF-8	3	2	2	1	8	120
POF-9	1	1	3	3	8	60

CR: Grado de colonización de la raíz. **PEDPC:** Grado de producción de enzimas que degradan la pared celular, **RROS:** Grado de resistencia a estrés oxidativo, **RSAP:** Grado de resistencia a fitoanticipinas (saponinas), **IPATiv:** Índice de patogenicidad *in vitro*. **PATip:** Índice de patogenicidad *in planta*. Los colores indican el grado de infección y virulencia. Azul: No patogénico. Verde: Potencialmente patogénico. Amarillo: patogénico. Rojo: Patogénico con alta virulencia.

7.8. Aislamientos de *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron 56 aislamientos de la rizósfera de cultivos silvestres de *Polianthes* provenientes de diferentes sitios de colecta y tipos de muestras (suelo, raíz y bulbo), además de muestras de tejido vegetal enfermo de cultivos comerciales de *Polianthes tuberosa* var. Doble provenientes del Estado de Morelos y establecidos en el área de CIATEJ (Tabla 7.4), utilizando diferentes medios de cultivo selectivos; THSM específico para aislar *Trichoderma*, NSA específico para hongos de género *Fusarium* y ISP2 específico para Actinomicetos, ya que algunos hongos tienen la capacidad y plasticidad ecológica de crecer en diferentes medios de cultivo como lo hacen los hongos del género *Trichoderma*. Las cepas utilizadas fueron seleccionadas visualmente por su estructura micelial relacionada con el tipo de micelio que producen los hongos del género *Trichoderma*. El resto de los aislamientos que no mostraron parentesco con los hongos del género *Trichoderma* se descartaron y se excluyeron en las evaluaciones. Se utilizó una selección secundaria evaluando la capacidad de colonizar la raíz del nardo y su capacidad antagónica *in vitro*. Se seleccionaron 10 aislamientos para ser caracterizados y denominados como POT1 a POT10.

Tabla 7.4. Aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos a partir de *Polianthes tuberosa* y especies silvestres de *Polianthes* sp.

CLAVE DE AISLAMIENTO	SITIO DE COLECTA	MEDIO DE AISLAMIENTO	TIPO DE MUESTRA	CLAVE
THSMOR-M1-K-S	MORELOS	THSM	SUELO	
THSMOR-M1-D-S	MORELOS	THSM	SUELO	
THSMOR-M1-C-S	MORELOS	THSM	SUELO	
*THSMOR-M1-E-S	MORELOS	THSM	SUELO	POT3 *
THSMOR-M1-R	MORELOS	THSM	RAÍZ	
NSAMOR-M1-A-S	MORELOS	NSA	SUELO	
THSMOR-M1-E-S	MORELOS	THSM	SUELO	
NSAMORM2-H-S	MORELOS	NSA	SUELO	
NSAMORM2-E-S	MORELOS	NSA	SUELO	
THSMOR-M1-F-S	MORELOS	THSM	SUELO	
THSMOR-M1-D-S	MORELOS	THSM	SUELO	
THSMOR-M1-F-S-1	MORELOS	THSM	SUELO	
THSMOR-M1-G-S	MORELOS	THSM	SUELO	
THSMOR-M1-B	MORELOS	THSM	BULBO	
THSMCIATEJ-R	CIATEJ	THSM	RAÍZ	
POFUTLAX-M1-A	TLAXCALA	NSA	SUELO	POT1
THSMOR-M1-A-S	MORELOS	THSM	SUELO	
THSMOR-M1-I-S	MORELOS	THSM	SUELO	
THSMOR-M2-B-S	MORELOS	THSM	SUELO	
NSAMOR-M2-F-S	MORELOS	NSA	SUELO	
POTRISCBM1-C	SAN CRISTOBAL DE B.	NSA	SUELO	POT4

Tabla 7.4. (continuación) Aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos a partir de *Polianthes tuberosa* y especies silvestres de *Polianthes* sp.

CLAVE DE AISLAMIENTO	SITIO DE COLECTA	MEDIO DE AISLAMIENTO	TIPO DE MUESTRA	CLAVE
POTRITLAXM1-D	TLAXCALA	THSM	SUELO	POT5
POACTLDMM2-F	LAGOS DE MORENO	ISPD	SUELO	POT7
NSAMOR-M2-E-S	MORELOS	NSA	SUELO	
THSMOR-M2-C-S	MORELOS	THSM	SUELO	
NSAMOR-M1-B-S	MORELOS	NSA	SUELO	
THSMOR-M2-G-S	MORELOS	THSM	SUELO	
POTRIAUTM1-C	AUTLAN	THSM	SUELO	POT10
THMORM2-0.1-F	MORELOS	THSM	SUELO	
THMORM2-0.1-H	MORELOS	THSM	SUELO	
THMORM2-0.01-A	MORELOS	THSM	SUELO	
THMORM2-0.01-B	MORELOS	THSM	SUELO	
THMORM2-0.01-C	MORELOS	THSM	SUELO	
THMORM2-0.01-D	MORELOS	THSM	SUELO	
THMORM2-0.01-E	MORELOS	THSM	SUELO	
THMORM2-0.01-H	MORELOS	THSM	SUELO	
THMORM1-0.01-A	MORELOS	THSM	SUELO	
THMORM1-0.01-B	MORELOS	THSM	SUELO	
POFUSCBM1-A	SAN CRISTOBAL DE B.	NSA	SUELO	POT2
THMORM1-0.01-D	MORELOS	THSM	SUELO	
POFUHALM1.1	HOSPITAL ANGEL L.	NSA	SUELO	POT6
POACTHALM1.01	HOSPITAL ANGEL L.	ISP2	SUELO	
POTRIHALM1.001	HOSPITAL ANGEL L.	THSM	SUELO	
POFUHALM2.1	HOSPITAL ANGEL L.	NSA	SUELO	
POTRIHALM2.01	HOSPITAL ANGEL L.	THSM	SUELO	
POTRISCBM1.1	MORELOS	THSM	SUELO	POT8
POTRISCBM1.001	SAN CRISTOBAL DE B.	THSM	SUELO	
POTRILDMM2.01	LAGOS DE MORENO	THSM	SUELO	
POTRICOLM1.01	COLIMA	THSM	SUELO	
POTRICOLM1.001	COLIMA	THSM	SUELO	
POTRICOLM2.01	COLIMA	THSM	SUELO	
POTRICOLM2.001	COLIMA	THSM	SUELO	
POTRITLAXM1.1	TLAXCALA	THSM	SUELO	
POTRITLAXM1.01	TLAXCALA	THSM	SUELO	
POTRITLAXM1.001	TLAXCALA	THSM	SUELO	
POTRIAUTM1.01	AUTLAN	THSM	SUELO	POT9

*: Aislamientos de *Trichoderma* sp. seleccionados para su caracterización.

7.9. Evaluación de antagonismo *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* sp. (Cultivos Duales).

En esta evaluación se utilizó el aislamiento POF1 de *Fusarium oxysporum* seleccionado como patogénico del Nardo en la caracterización de los mecanismos de patogénesis *in vitro* e *in planta*. A partir de este aislamiento patogénico se procedió a realizar la evaluación de antagonismo con los aislamientos de *Trichoderma* sp. *in vitro*. Este tipo de evaluación es la más común para tratar de seleccionar aislamientos de *Trichoderma*. Sin embargo, se ha reportado que el número de aislamientos que se eliminan es mínimo, y muchas veces el que se encuentre actividad en esta prueba, no es equivalente a lo que se encuentra en la evaluación en planta.

En esta evaluación se utilizaron 44 aislamientos preseleccionados de acuerdo a su morfología por medio de microcultivos. La confrontación se mantuvo durante siete días bajo condiciones de incubación con una temperatura de 27°C con luz constante, una vez pasado el tiempo de incubación se observaron los resultados y se tomaron fotografías para seleccionar las cepas de *Trichoderma* sp. con capacidad de inhibir a POF1 y que tipo de interacción o mecanismo de protección utilizaron los aislamientos de *Trichoderma* sp. para contrarrestar el crecimiento de POF1.

La mayoría de los aislamientos de *Trichoderma* sp. mostraron un crecimiento mayor con respecto al crecimiento de POF1 (Fig. 7.15). En algunos casos se encontró micoparasitismo y depredación, mientras que la antibiosis se encontró en menor medida, asociado a la producción de enzimas o metabolitos secundarios. A partir de este primer ensayo se seleccionaron 29 aislamientos con una actividad alta, y después de otro filtro se seleccionaron solo 10 aislamientos para su caracterización, tratando que se incluyeran al menos uno de cada uno de los mecanismos de protección reportados para *Trichoderma* sp. Se denominaran como POT1 al POT10 (Tabla 7.4)

Se realizó una segunda evaluación para determinar el grado de antagonismo *in vitro* (GANTiv) para cada uno de los aislamientos seleccionados. Para obtener GANTiv se visualizó el tipo de mecanismo de acción que presentó cada aislamiento de *Trichoderma*. De acuerdo a este mecanismo se le asignó un valor por cada uno de ellos, con excepción del micoparasitismo moderado y el crecimiento rápido del aislamiento que se le asignó un valor doble al ser de los mecanismos que presentan una ventaja para el aislamiento de *Trichoderma*. Después se realizó la sumatoria de cada uno de los mecanismos presentes y se les asignó un grado del 0 al 3.

Los resultados de la evaluación mostraron que POT1 presentó micoparasitismo leve y competencia de nutrientes (Fig. 7.16). POT2 presentó micoparasitismo moderado, presencia de enzimas antifúngicas y un crecimiento rápido, las enzimas pudieron observarse en el sitio de contacto de POT2, con una coloración roja. POT3 presentó

micoparasitismo moderado, producción de metabolitos de color amarillo aunque se liberaron al medio y no directamente en el sitio de interacción, además de competencia por nutrientes y crecimiento acelerado. POT4, presento un micoparasitismo moderado, competencia por nutrientes y crecimiento acelerado. POT5 presentó un micoparasitismo leve y competencia por nutrientes. POT6 presentó un micoparasitismo moderado y un crecimiento acelerado. POGT7 presentó un micoparasitismo leve, competencia por nutrientes y crecimiento acelerado. POT8 presentó antibiosis y crecimiento acelerado, en este caso se observó como el sitio de interacción queda definido. POT9 presentó micoparasitismo leve, un indicio de antibiosis y competición por nutrientes. Finalmente, POT10 presentó un micoparasitismo moderado, competencia por nutrientes y crecimiento acelerado. A partir de estas observaciones fue posible obtener GANTiv (Tabla 7.5).

La variedad de respuestas que se presentaron en esta evaluación fue muy alta y en muchos casos no se ha relacionado con la protección en planta.

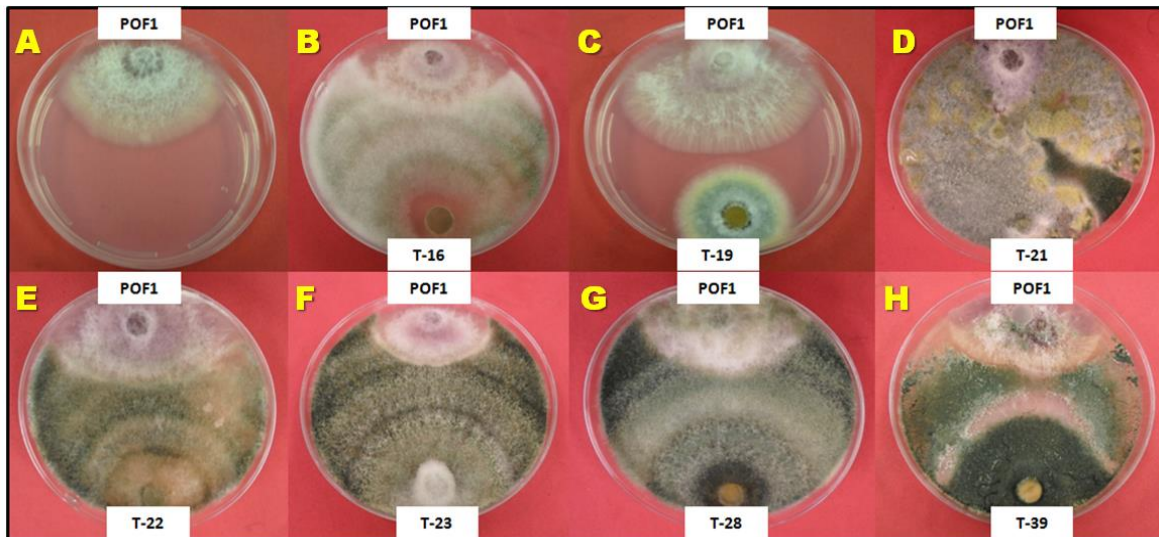


Figura 7.15. Evaluación de antagonismo *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* sp. (Cultivos Duales). Evaluación de la interacción después de 5 días de crecimiento de POF1. **A:** Crecimiento de POF después de 5 días en medio PDA. **B:** Aislamiento de *Trichoderma* con micoparasitismo. **C:** Aislamiento de *Trichoderma* que fomenta el crecimiento de POF1, **D:** Aislamiento de *Trichoderma* con micoparasitismo y competencia nutrientes, **E:** Aislamiento de *Trichoderma* con micoparasitismo y competencia de nutrientes; **F:** Aislamiento de *Trichoderma* con competencia por nutrientes; **G:** Aislamiento de *Trichoderma* con competencia por nutrientes y micoparasitismo; **H:** Aislamiento de *Trichoderma* con producción de metabolitos o enzimas antifúngicas.

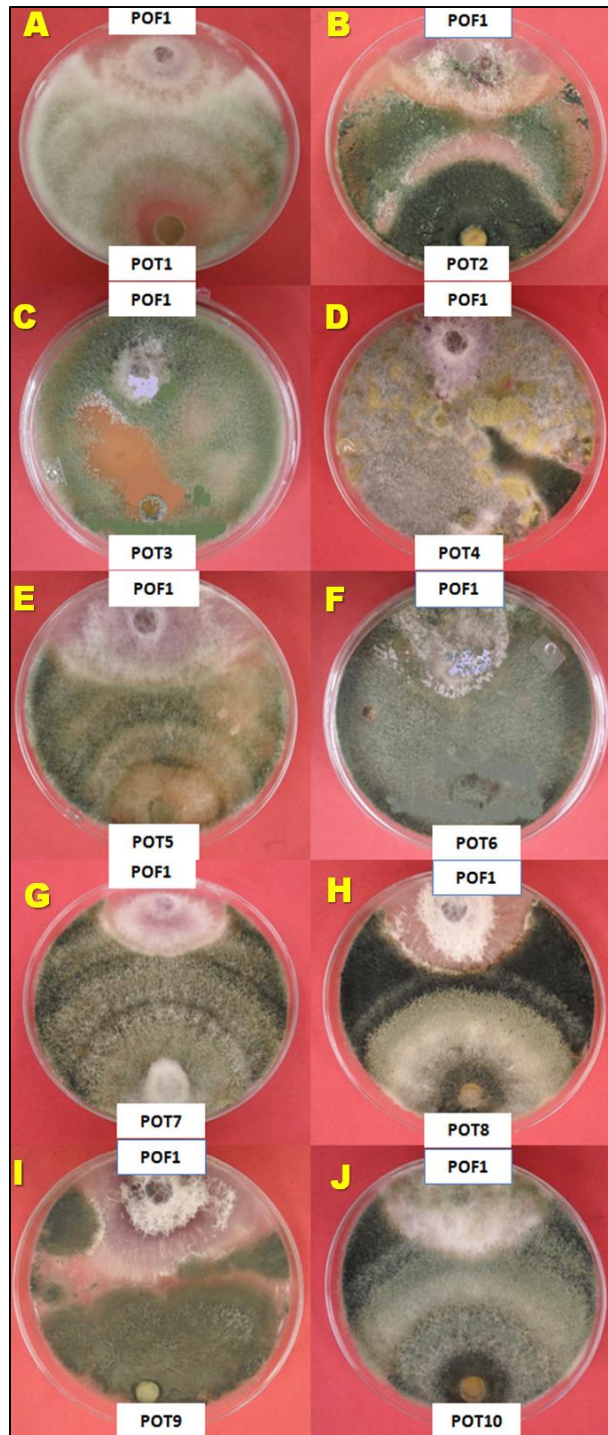


Figura 7.16. Evaluación del antagonismo *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* sp. seleccionados (Cultivos Duales). Evaluación de la interacción después de 5 días de crecimiento de POF1. **A:** Aislamiento de *Trichoderma* POT1 con micoparasitismo.. **B:** Aislamiento de *Trichoderma* POT2 con producción de enzimas o metabolitos antifúngicos; **C:** Aislamiento de *Trichoderma* POT3 con micoparasitismo y producción de metabolitos, **D:** Aislamiento de *Trichoderma* POT4 con micoparasitismo y competencia nutrientes, **E:** Aislamiento de *Trichoderma* POT5 con micoparasitismo y competencia de nutrientes; **F:** Aislamiento de *Trichoderma* POT6 con micoparasitismo elevado; **G:** Aislamiento de *Trichoderma* POT7 con

competencia por nutrientes y micoparasitismo ligero; **H**: Aislamiento de *Trichoderma* POT8 con producción de enzimas antifúngicas y competencia por nutrientes, **I**: Aislamiento de *Trichoderma* POT9 con micoparasitismo y posible antibiosis; **J**: Aislamiento de *Trichoderma* POT10 con micoparasitismo y competencia por nutrientes.

Tabla 7.5. Determinación del grado de antagonismo *in vitro* de los aislamientos de *Trichoderma* seleccionados contra *Fusarium oxysporum* (POF1).

T	MICPL	MICPF	PMET	PENZ	ANTB	COMPN	RCRE	TOTAL	GANTiv
POT1	1					1	2	4	2
POT2		2		2			2	6	3
POT3		2	1			1	2	6	3
POT4		2				1	2	5	2
POT5	1					1		2	1
POT6		2					2	4	2
POT7	1					1	2	4	2
POT8					1		2	3	1
POT9	1				1	1		3	1
POT10		2				1	2	5	2

Mecanismos de protección asociados a *Trichoderma*: MICPL: Presencia de micoparasitismo leve; MICPF: Presencia de micoparasitismo moderado; PMET: Producción de metabolitos antifúngicos; PENZ: Producción de enzimas antifúngicas; ANTB: Presencia de antibiosis; COMPN: Presencia de competencia por nutrientes; RCRE: Crecimiento acelerado. **Azul:** Sin actividad (0). **Verde:** Ligeramente activo (1). **Amarillo:** Moderadamente activo (2). **Rojo:** Máxima actividad antifúngica (3). Para obtener el grado de antagonismo *in vitro*, se dio un punto por cada uno de los mecanismos asociados, con excepción del micoparasitismo moderado y el crecimiento acelerado que les fue asignado 2 puntos, y se realizó la sumatoria de todos los puntos.

7.10. Evaluación de la colonización de raíces de nardo (*Polianthes tuberosa*) por aislamientos de *Trichoderma* sp.

De los 29 aislamientos seleccionados de la evaluación de antagonismo, se les evaluó su colonización en las raíces del nardo. A partir de esta evaluación se seleccionaron solo 10 aislamientos que penetraron dentro de la raíz del nardo para su caracterización final. Cada uno de los aislamientos seleccionados presentaron colonización de la raíz del nardo, pero la cantidad del micelio observado definió el grado de colonización asignado a cada aislamiento (Fig. 7.17). Este fue uno de los principales parámetros de selección para los aislamientos a caracterizar, considerando que la asociación a la raíz y bulbo puede ser importante para una protección mucho más completa. Los aislamientos que presentaron la mayor colonización fueron POT1, POT2, POT4, POT6, POT8, POT9 y POT10, considerándose como grado (3). Mientras que POT3 y POT5 presentaron una menor

colonización, considerado como grado (2) y finalmente solo POT7 presentó una pobre colonización a las raíces del nardo y fue considerado como grado (1).

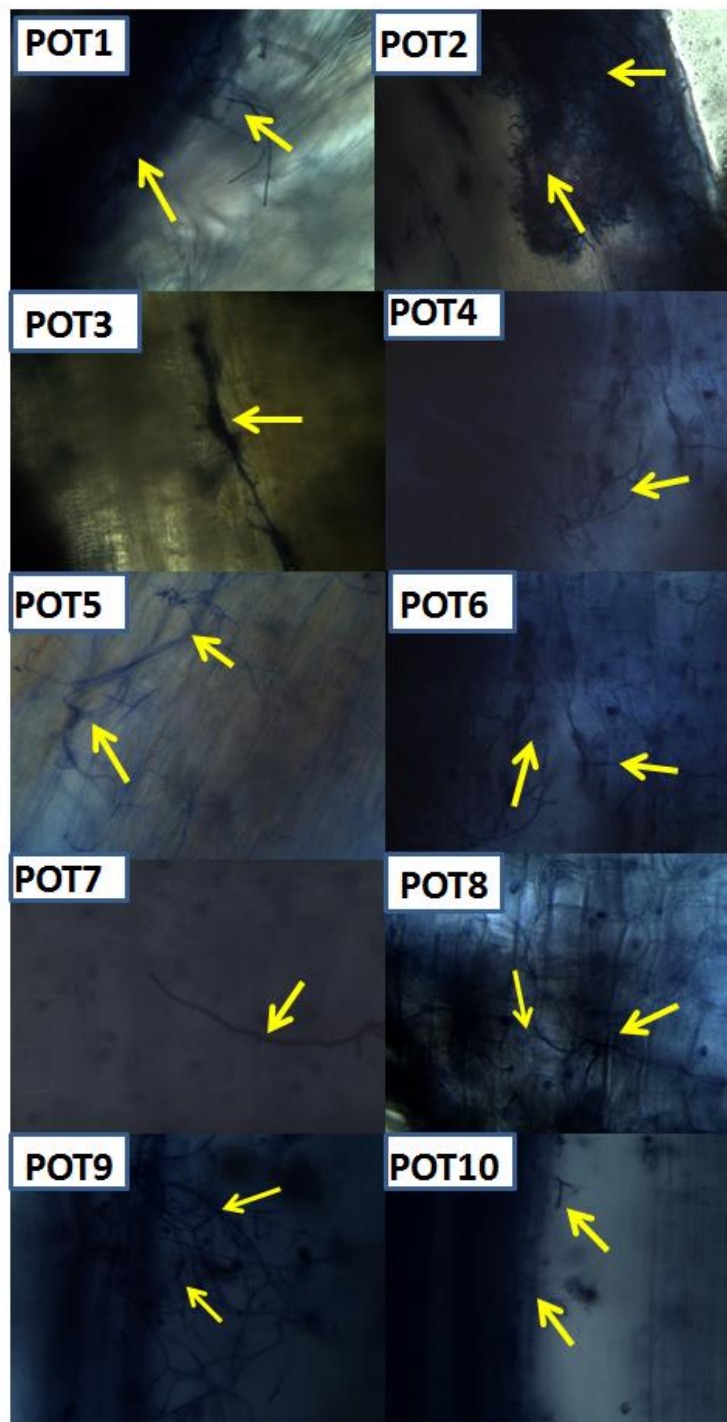


Figura 7.17. Evaluación de la colonización de raíces de nardo (*Polianthes tuberosa*) por aislamientos de *Trichoderma* sp. Colonización de los 10 aislamientos de *Trichoderma* sp. seleccionados. Las flechas indican la presencia de crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. en las raíces de Nardo.

7.10. Producción de enzimas antifúngicas (quitinasas y glucanasas) por aislamientos de *Trichoderma* spp.

Uno de los mecanismos de defensa asignados a *Trichoderma* es la producción de enzimas con actividad antifúngica, principalmente quitinasas y glucanasas. Para este estudio, cada aislamiento seleccionado de *Trichoderma*, fue cultivado en medio mínimo adicionado con un suplemento para inducir a cada una de las enzimas, quitina coloidal en caso de las quitinasas (QT), y almidón para las glucanasas (GT). Posteriormente fueron recuperadas por filtración y liofilizadas.

Se trató de realizar el experimento de actividad antifúngica de cada uno de los extractos fúngicos utilizando la evaluación en pozos y sensidiscos, sin embargo, ninguna de ellas permitió una buena observación de la actividad. Por lo que se optó por realizar la prueba de viabilidad por cloruro de tetrazolio (TTC), para evaluar el efecto antifúngico de cada uno de los extractos fúngicos obtenidos, sobre la viabilidad del aislamiento patogénico POF1.

De la evaluación del efecto antifúngico de las quitinasas producidas por cada aislamiento de *Trichoderma* sp. se obtuvo que el aislamiento POT6 no mostró actividad antifúngica significativa, al igual que POT1 que mostró una actividad antifúngica leve (Fig. 7.18). Mientras que POT3, POT4, POT7, POT8 y POT9, mostraron una actividad antifúngica moderada significativa. Finalmente, los aislamientos POT2, POT5 y POT10 fueron los aislamientos que presentaron la actividad antifúngica significativamente mayor que los demás. A partir de estos resultados fue posible obtener el grado de producción de enzimas con actividad de quitinasas (PQUIT) con una escala del 0 al 3, para la posterior correlación con los otros mecanismos de protección evaluados (Tabla 7.6).

De la evaluación del efecto antifúngico de las glucanasas producidas por cada aislamiento de *Trichoderma* sp. se obtuvo que todos los aislamientos presentaron algún grado de actividad antifúngica (Fig. 7.19). Los aislamientos POT2, POT6, POT9 y POT10 mostraron una actividad antifúngica leve. Mientras que POT1, POT3, POT4, POT5 y POT7, mostraron una actividad antifúngica significativa moderada. Finalmente, solo el aislamiento POT8 fue el que mostró la mayor actividad antifúngica. A partir de estos resultados fue posible obtener el grado de producción de enzimas con actividad de glucanasas (PGLU) con una escala del 0 al 3, para la posterior correlación con los otros mecanismos de protección evaluados (Tabla 7.7).

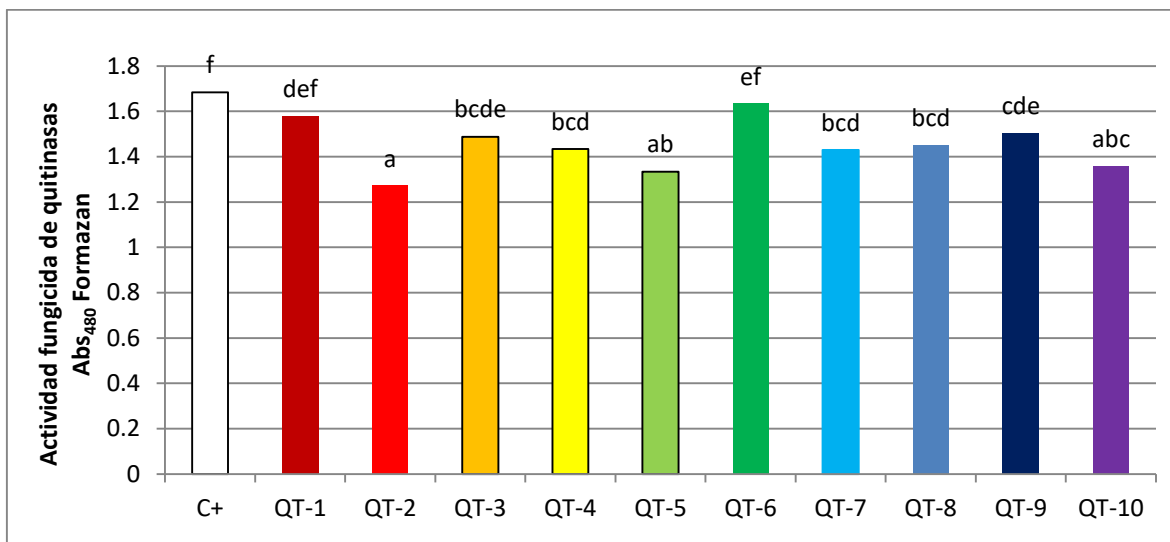


Figura 7.18. Efecto antifúngico de las quitinasas producidas por cada aislamiento de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* (POF1). C+=Control positivo, viabilidad de POF sin la presencia de quitinasas. QT 1-10: Efecto de las quitinasas producidas por cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* sobre la viabilidad de POF1. Letras diferentes se relacionan con diferencias significativas (prueba de Tukey con $P < 0.05$).

Tabla 7.6. Determinación del grado de producción de enzimas con actividad de quitinasas para cada aislamiento de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* (POF1).

Aislamiento	Media	Porcentaje de inhibición	Grado de Producción de quitinasas
QT-1	1.577 def	87.3777254	1
QT-2	1.27167 a	51.39304655	3
QT-3	1.48833 bcde	76.92751915	2
QT-4	1.434 bcd	70.52445492	2
QT-5	1.33433 ab	58.77784325	3
QT-6	1.63367 ef	94.05657042	0
QT-7	1.43033 bcd	70.09192693	2
QT-8	1.44967 bcd	72.37124337	2
QT-9	1.50233 cde	78.57748969	2
QT-10	1.35667 abc	61.41072481	3

Azul: Sin actividad. **Verde:** Ligeramente activo. **Amarillo:** Moderadamente activo. **Rojo:** Máxima actividad antifúngica.

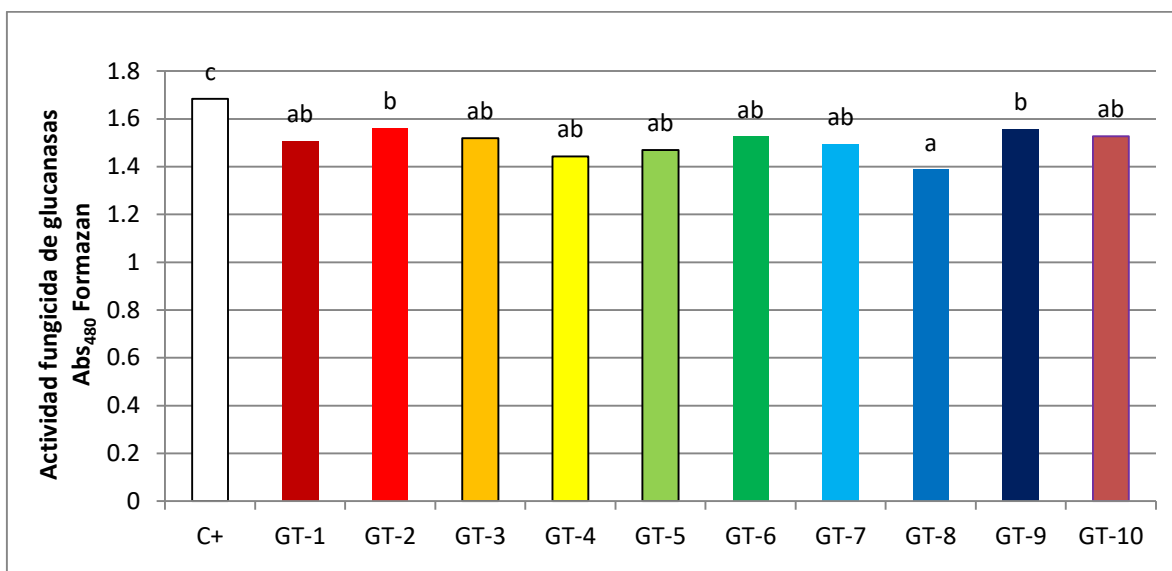


Figura 7.19. Efecto antifúngico de las glucanasas producidas por cada aislamiento de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* (POF1). C+=Control positivo, viabilidad de POF sin la presencia de glucanasas. GT 1-10: Efecto de las glucanasas producidas por cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* sobre la viabilidad de POF1. Letras diferentes se relacionan con diferencias significativas (prueba de Tukey con $P < 0.05$).

Tabla 7.7. Determinación del grado de producción de enzimas con actividad de glucanasas para cada aislamiento de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* (POF1).

Aislamiento	Media	Porcentaje de inhibición	Grado de Producción de glucanasas
GT-1	1.50733ab	78.19000617	2
GT-2	1.56267b	85.01789019	1
GT-3	1.51867ab	79.5891425	2
GT-4	1.44233ab	70.17026527	2
GT-5	1.46967ab	73.54349167	2
GT-6	1.52533ab	80.4108575	1
GT-7	1.49267ab	76.38124614	2
GT-8	1.38600 ^a	63.22023442	3
GT-9	1.55700b	84.31832202	1
GT-10	1.52667ab	80.57618754	1

Azul: Sin actividad. **Verde:** Ligeramente activo. **Amarillo:** Moderadamente activo. **Rojo:** Máxima actividad antifúngica.

7.11. Producción de metabolitos secundarios de bajo peso molecular por aislamientos de *Trichoderma* spp.

Otro mecanismo de protección asociado a *Trichoderma*, es la producción de metabolitos de bajo peso molecular que presentan un efecto antifúngico contra otros hongos. Por este motivo, se evaluó el efecto antifúngico de los metabolitos producidos por cada uno de los aislamientos de *Trichoderma*. Estos metabolitos fueron obtenidos a partir de cultivos estacionarios de cada aislamiento, se siguió un proceso de concentración del extracto metabólico mediante filtraciones y finalmente se realizó la separación de metabolitos de bajo peso molecular.

De la evaluación del efecto antifúngico de los metabolitos secundarios producidos por cada aislamiento de *Trichoderma* sp. se obtuvo que todos extractos (MT) presentaron algún grado de actividad antifúngica siendo diferentes significativamente con respecto al testigo (Fig. 7.19). Los aislamientos POT1 y POT7 mostraron una actividad antifúngica ligera dentro del 80% de inhibición. Mientras que POT3, POT5, POT6, POT8 y POT9, mostraron una actividad antifúngica significativa moderada que se encontró dentro de un rango del 70% de inhibición. Finalmente, los aislamientos POT3, POT4 y POT10 fueron los que mostraron la actividad antifúngica mayor, dentro de un rango del 60% de inhibición. A partir de estos resultados fue posible obtener el grado de producción de metabolitos secundarios con actividad fungicida (PMET) con una escala del 0 al 3, para la posterior correlación con los otros mecanismos de protección evaluados (Tabla 7.8).

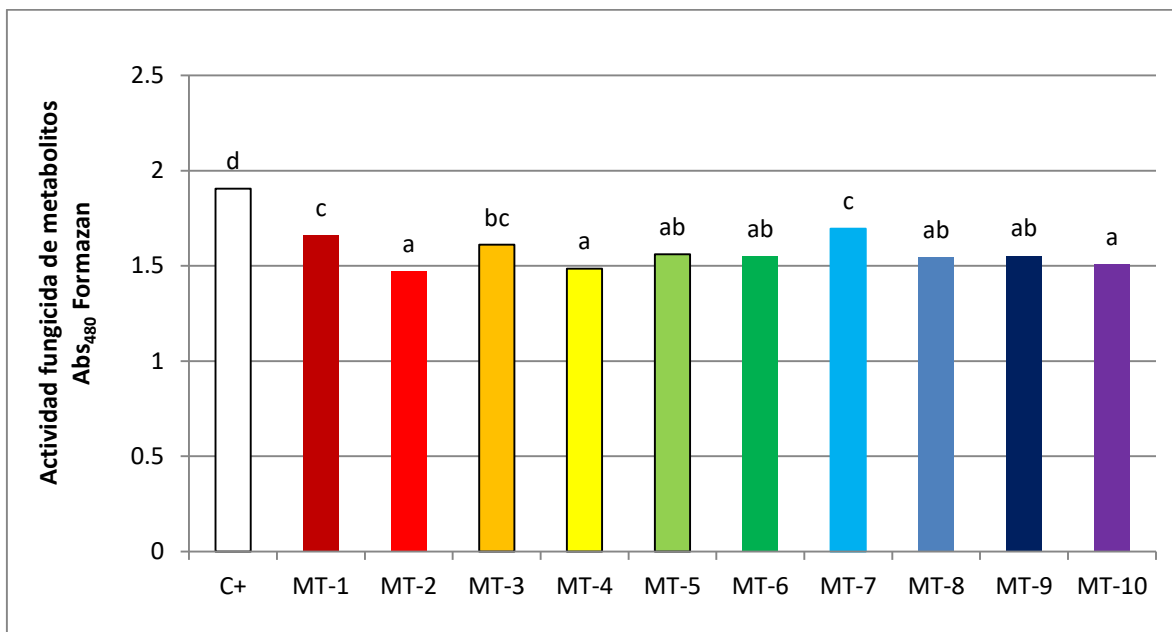


Figura 7.20. Figura 7.18. Efecto antifúngico de los metabolitos secundarios producidos por cada aislamiento de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* (POF1). C+=Control positivo, viabilidad de POF sin la presencia de quitinasas. MT 1-10: Efecto de los metabolitos producidos por cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* sobre la viabilidad de POF1. Letras diferentes se relacionan con diferencias significativas (prueba de Tukey con $P < 0.05$).

Tabla 7.8. Determinación del grado de producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica para cada aislamiento de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* (POF1).

Aislamiento	Media	Porcentaje de inhibición	Grado de Producción de metabolitos secundarios
MT-1	1.66267c	80.822145	1
MT-2	1.47433a	65.94771758	3
MT-3	1.61067bc	76.71536882	2
MT-4	1.48567a	66.84331069	3
MT-5	1.56167ab	72.84552203	2
MT-6	1.54900ab	71.84489022	2
MT-7	1.69533c	83.40151635	1
MT-8	1.54633ab	71.63402306	2
MT-9	1.55367ab	72.21371031	2
MT-10	1.50967a	68.73874585	3

Azul: Sin actividad. **Verde:** Ligeramente activo. **Amarillo:** Moderadamente activo. **Rojo:** Máxima actividad antifúngica.

7.12. Evaluación de protección a la infección de *Fusarium oxysporum* de plantas de nardo (*Polianthes tuberosa*) de aislamientos de *Trichoderma* sp..

Una vez realizadas todas las evaluaciones *in vitro* a los aislamientos de *Trichoderma* sp. se realizó la evaluación de protección *in planta*. Se emplearon estos aislamientos antagonistas en confrontación contra *Fusarium oxysporum* en plantas de nardo. El experimento permaneció por 40 días, tomando muestras el día 20 y el día 40, de acuerdo al ensayo de patogenicidad (Fig. 7.10, 7.11) considerando que los síntomas causados por *F. oxysporum* son visibles antes del día 30 después de la inoculación del patógeno.

A partir de los registros fotográficos del experimento, se obtuvo una escala de protección que se usó para calificar a cada una de las plantas dentro de esta escala (Fig. 7.21). Las plantas mostraron síntomas ligeros de enfermedad a los 20 días después de la inoculación de *F. oxysporum* (POF1) (Fig. 7.22).

Los resultados obtenidos nos muestran que ocho de los tratamientos con aislamientos de *Trichoderma* sp. mostraron protección en comparación con el tratamiento POF-1 inoculado solo con POF1, como control negativo, el cual mostró unos ligeros síntomas de marchitez pero no llegó a mostrar pudrición en el bulbo solo en algunas raíces a los 40 días después de la inoculación de POF1 (Fig. 7.23). En el caso del tratamiento control (\emptyset), al cual no se inoculó con el patógeno, se observaron plantas sanas, pero no se observó un follaje completamente verde como en el caso de los tratamientos en los que se emplearon los aislamientos de *Trichoderma*, lo que podría relacionarse con la inducción de crecimiento o un efecto benéfico que pueden causar los hongos del género *Trichoderma*, además de desencadenar las respuestas de defensa vegetal ya que ninguna de las plantas fue tratada con fertilizante o algún agente externo a la prueba, únicamente riegos y su tratamiento correspondiente con *Trichoderma* sp. y *F. oxysporum* (Fig. 7.23).

Los tratamientos una leve pudrición en algunos de los bulbos fueron POT1 y POT6, en los cuales se encontró una planta de cada tratamiento con poco crecimiento y síntomas de pudrición de bulbo a los 20 días, pero posterior a estos días las plantas continuaron sanas y sin mostrar síntomas de enfermedad. Sin embargo en el resto de los tratamientos POT2, POT3, POT4, POT5, POT7, POT8, POT9 y POT10 mostraron protección en todas sus repeticiones y no se encontraron síntomas de la enfermedad al día 40 del experimento.

El desarrollo de la protección de cada aislamiento de *Trichoderma* después de 40 días del experimento, fue posible visualizarse después de asignar un grado de protección a cada una de las plantas evaluadas, además de poder ver la incidencia de cada grado de protección (Fig. 7.24).

A partir de las muestras tomadas el día 40 del experimento, se realizaron cortes de raíces y se tiñeron con azul de tripano para observar la colonización en los diferentes tratamientos, en los que se observó que la mayoría de los tratamientos permanecieron colonizados

posiblemente por *Trichoderma* ya que no se mostró síntoma alguno de enfermedad en las plantas (Fig. 7.25). En el caso de los tratamientos POT1 y POT2 se observó claramente una especie de micoparasitismo en la forma en cómo se encuentra enrollado el micelio, estos dos tratamientos fueron los únicos que mostraron este tipo de interacción dentro de la raíz, aunque no fue posible distinguir cual es el patógeno y cuál es el antagonista, lo que nos puede llevar a considerar que *Trichoderma* sp. esta micoparasitando a las hifas de *F. oxysporum*, algo que se observó en las pruebas de confrontación directa *in vitro* (cultivos duales).

Finalmente, para la evaluación *in planta* se obtuvo un índice de protección *in planta* para cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* caracterizados (IPROT_{ip}). Para obtener este valor numérico se consideró una relación entre el grado de protección con el porcentaje de incidencia del grado de protección (Fig. 7.24). Esta relación se dio con la siguiente fórmula: Índice de protección *in planta* = [(Grado de protección * Porcentaje de incidencia del grado de protección) - índice de protección del testigo negativo POF1]. Los resultados se muestran en la (Tabla 7.9).

ESCALA	PLANTAS DE 40 DÍAS	CARACTERÍSTICAS
1		PLANTA ENFERMA CON SÍNTOMAS MARCADOS DE ENFERMEDAD (CLOROSIS AVANZADA Y PUDRICIÓN DE BULBO Y RAÍZ)
2		PLANTA CON SÍNTOMAS VISIBLES DE ENFERMEDAD (CLOROSIS Y NECROSIS EN RAÍCES)
3		PLANTA SANA CON SÍNTOMAS LIGEROS DE ESTRÉS
4		PLANTA SANA CON BUEN DESARROLLO EN LA PARTE FOLIAR, BULBO Y RAÍZ
5		PLANTA SANA CON DESARROLLO SUPERIOR EN LA PARTE FOLIAR, BULBO Y RAÍZ

Figura 7.21. Escala de protección de aislamientos de *Trichoderma* sp. contra *Fusarium oxysporum*.

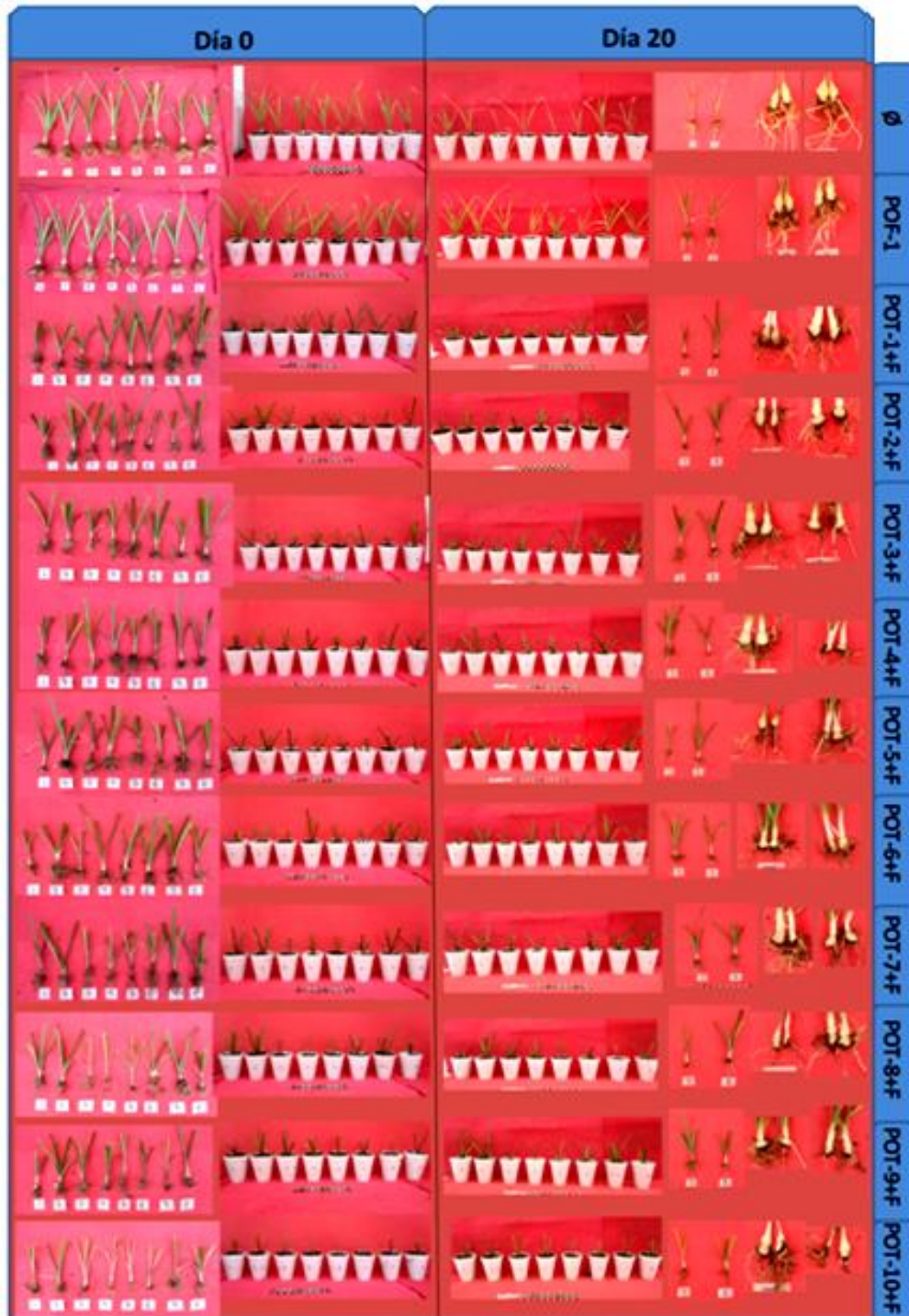


Figura 7.22. Síntomas en plantas de Nardo (*Polianthes tuberosa*) durante la evaluación de la protección de los aislamientos de *Trichoderma* sp. frente a *Fusarium oxysporum* a los 20 días después de la inoculación del patógeno. (Ø)= Control negativo, plantas tratadas con agua esteril; (POF-1)= control positivo, aislamiento de *Fusarium oxysporum* patógeno al nardo. , POT-1 al POT-10+F= Aislamientos de *Trichoderma* sp. inoculados 10 días previos y después inoculados con POF1.

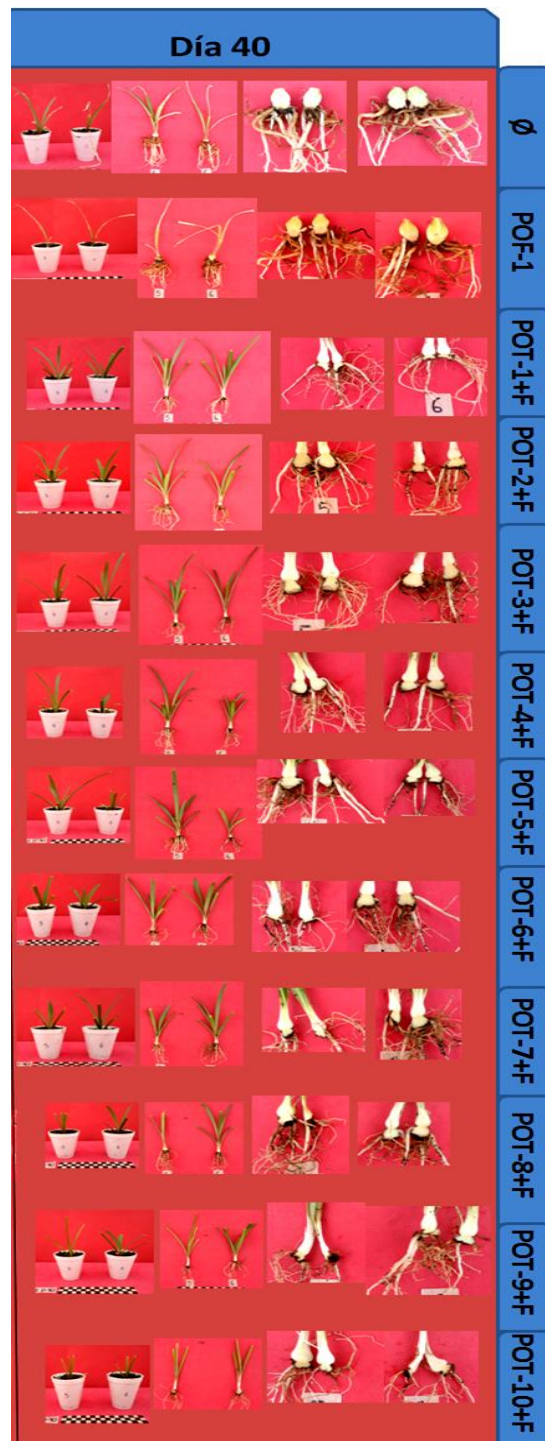


Figura 7.23. Síntomas en plantas de Nardo (*Polianthes tuberosa*) durante la evaluación de la protección de los aislamientos de *Trichoderma* sp. frente a *Fusarium oxysporum* a los 40 días después de la inoculación del patógeno. (Ø)= Control negativo, plantas tratadas con agua esteril; (POF-1)= control positivo, aislamiento de *Fusarium oxysporum* patógeno al nardo. , POT-1 al POT-10+F= Aislamientos de *Trichoderma* sp. inoculados 10 días previos y después inoculados con POF1.

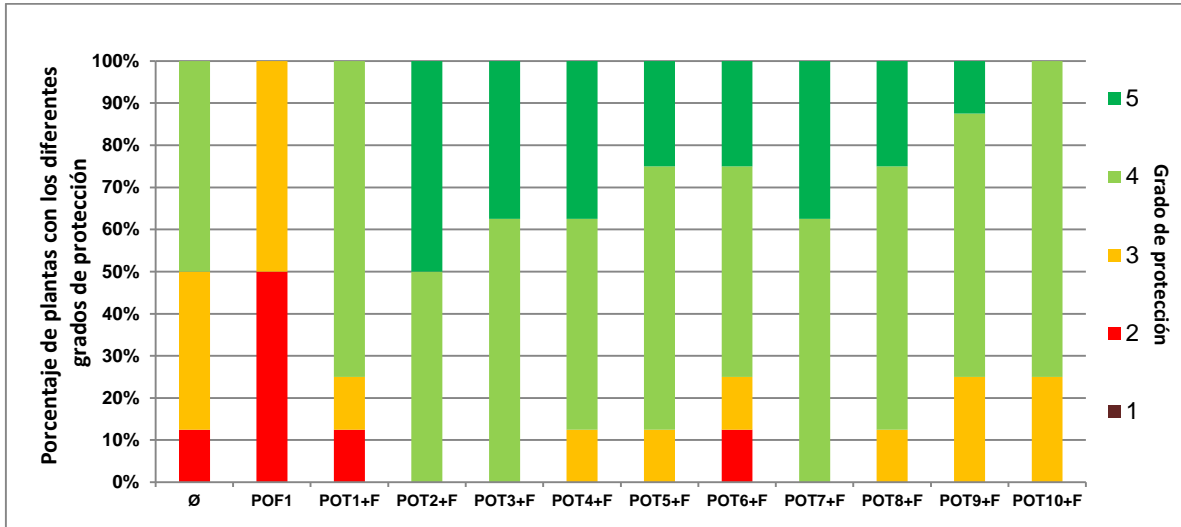


Figura 7.24. Desarrollo de la protección de cada aislamiento de *Trichoderma* sp después de 40 días de confrontarse con *Fusarium oxysporum* en plantas de Nardo (*Polianthes tuberosa*). Se muestra el porcentaje de plantas con los diferentes grados de protección de acuerdo a la escala de protección obtenida (Fig. 7.21).

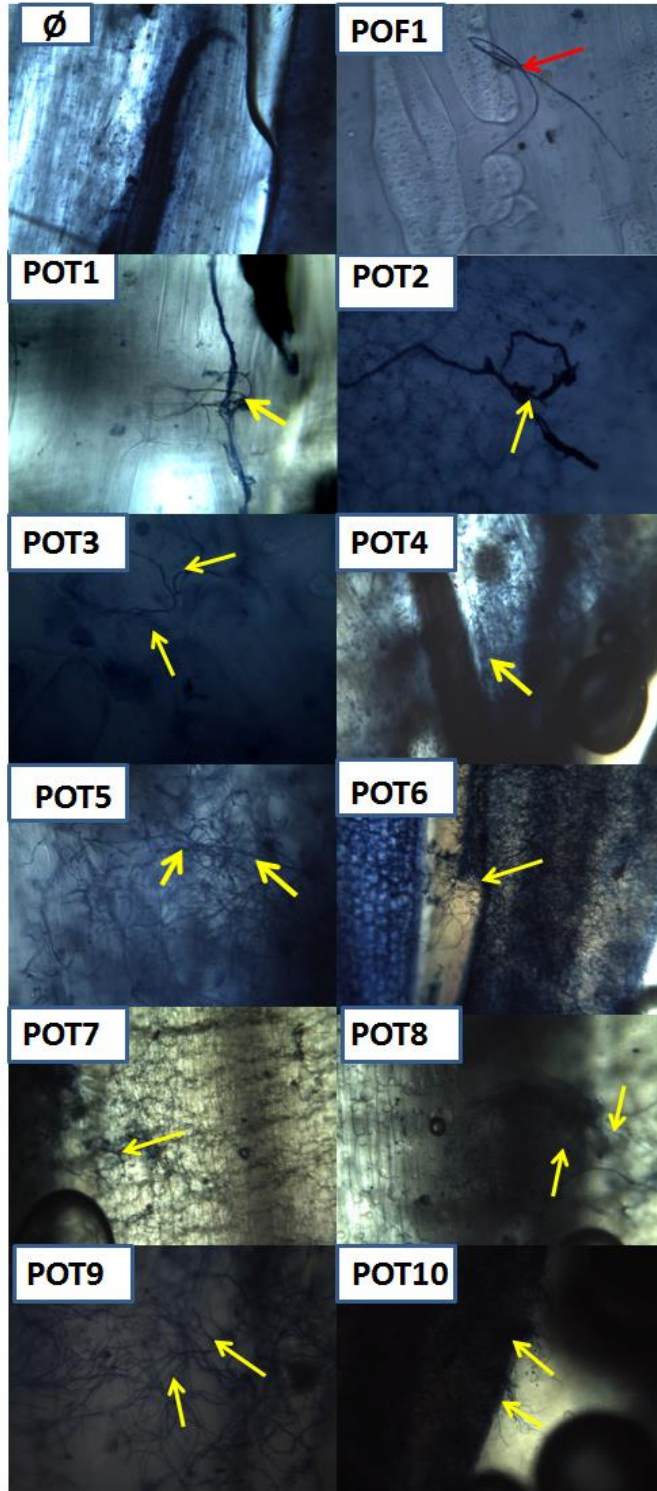


Figura 7.25. Colonización de raíces por *Trichoderma* sp. y *Fusarium oxysporum* en raíces de Nardo (*Polianthes tuberosa*) después de la evaluación de protección. Observación de la colonización de *Trichoderma* spp. a los 40 días después de la confrontación con *Fusarium oxysporum* por medio de la tinción de raíces con azul de tripano. Las flechas indican la presencia de micelio en raíces del nardo.

Tabla 7.9. Índice de protección de los aislamientos de *Trichoderma in planta*.

Grado	C-	C+	POT1	POT2	POT3	POT4	POT5	POT6	POT7	POT8	POT9	POT10
5				250	200	187.5	125	125	187.5	125	62.5	
4	200		290	200	240	200	240	200	250	240	240	290
3	120	150	30			30	30	37.5		25	75	75
2	20	100	25					25				
1												
total	340	250	345	450	440	417.5	395	387.5	437.5	390	377.5	365
total neto	90	0	95	200	190	167.5	145	137.5	187.5	140	127.5	115

Los valores numéricos se obtuvieron de la multiplicación del porcentaje de cada grado de protección con el grado de protección correspondiente. Índices de protección: **0: Azul** Sin protección 100 o menor. **1: Verde** Ligera protección, 100-130; **2: Amarillo** Protección moderada, 131-169; **3: Rojo** Máxima protección, 170-200.

7.7. Relación cualitativa entre la evaluación de los mecanismos de protección *in vitro* y la evaluación *in planta*.

A partir de los resultados de la evaluación de los mecanismos de protección *in vitro* y la evaluación de la protección *in planta*, se buscó relacionar los resultados de ambas evaluaciones (Tabla 7.10). Para el índice de protección *in vitro* (IPROTiv), se realizó la sumatoria de los índices obtenidos de cada una de las evaluaciones de mecanismos de protección.

A partir de esta relación cualitativa se observó que algunos aislamientos presentaron una relación de los resultados entre el índice IPROTiv y IPROTip. Entre estos destaca POT1, POT2, POT5, POT6, POT8 y POT9. Mientras que POT3, POT4, POT7 y POT10 no presentan relación entre ellas. El índice ANTiv es uno de los puntos que se relacionan con IPROTip.

Con respecto a los índices relacionados, ANTiv mostró una relación importante, no así los mecanismos relacionados con actividad antifúngica (PQUIT, PGLUC y PMET). En el caso del aislamiento POT7, este presentó un IPROTiv bajo, y una protección *in planta* (IPROTip) de las más altas (3), incluso cuando CR fue de los más bajos. POT10 por su parte, fue el caso contrario con un IPROTiv de los más altos pero un índice de protección *in planta* (IPROTip) bajo (1).

Se buscó relacionar las características del antagonismo *in vitro* con la protección *in planta* (IPROTip) (Tabla 7.11), aunque de nueva cuenta no se encontró una relación directa entre estos. La mayoría de los aislamientos tuvo un crecimiento acelerado, a excepción de POT5 y POT9, siendo que en el primer caso un IPROT moderado (2) y en el otro bajo (1). En cuanto al micoparasitismo, aquellos aislamientos que presentaron un IPROTip bajo, dos de ellos presentaron un micoparasitismo elevado. Este mismo comportamiento se observó con

un IPROT alto (3), donde dos aislamientos presentaron micoparasitismo elevado y uno de ellos presentó un micoparasitismo leve.

A partir de la relación cualitativa de los índices de protección evaluados no fue posible encontrar una relación positiva a través de los índices obtenidos. Sin embargo, a partir de estos resultados es posible considerar que se exploren nuevos mecanismos que no fueron evaluados en este estudio. Uno de ellos podrían ser la inducción de mecanismos de defensa vegetal, así como la naturaleza de la colonización de raíces por parte de los aislamientos de *Trichoderma*. Lo importante será el diseño de estas evaluaciones.

Sin embargo, la caracterización de estos aislamientos permite generar el conocimiento para otro posible aprovechamiento de ellos, como es el utilizar los filtrados fúngicos como fuente de control biológico.

Tabla 7.10. Relación cualitativa entre la evaluación de los mecanismos de protección *in vitro* y la evaluación de protección *in planta* de los aislamientos de *Trichoderma* sp.

AISLAMIENTO	ANTiv	CR	PQUIT	PGLUC	PMET	IPROTiv	IPROTip
POT-1	2	3	1	2	1	9	1
POT-2	3	3	3	1	3	13	3
POT-3	3	2	2	2	2	11	3
POT-4	2	3	2	2	3	12	2
POT-5	1	2	3	2	2	10	2
POT-6	2	3	0	1	2	8	1
POT-7	2	1	2	2	1	8	3
POT-8	1	3	2	3	2	11	2
POT-9	1	3	2	1	2	9	1
POT-10	2	3	3	1	3	12	1

ANTiv: Grado de antagonismo *in vitro*; **CR:** Grado de colonización de raíz; **PQUIT:** Grado de producción de quitinasas con actividad antifúngica; **PGLUC:** Grado de producción de glucanasas con actividad antifúngica; **PMET:** Grado de producción de metabolitos antifúngicos; **IPROTiv:** Índice de protección *in vitro*; **IPROTip:** Índice de protección *in planta*. Grado de protección **Rojo:** Grado de protección 3, máxima protección. **Amarillo:** Grado de protección 2, protección moderada. **Verde:** Grado de protección 1, protección ligera. **Azul:** Sin protección.

Tabla 7.11. Relación cualitativa entre el antagonismo *in vitro* y la protección *in planta*.

T	MECANISMOS DE PROTECCIÓN <i>in vitro</i>				GANTiv	IProTip
POT1	MICPL		COMPN	RCRE	2	1
POT2	MICPF	PENZ		RCRE	3	3
POT3	MICPF	PMET	COMPN	RCRE	3	3
POT4	MICPF		COMPN	RCRE	2	2
POT5	MICPL		COMPN		1	2
POT6	MICPF			RCRE	2	1
POT7	MICPL		COMPN	RCRE	2	3
POT8		ANTB		RCRE	1	2
POT9	MICPL	ANTB	COMPN		1	1
POT10	MICPF		COMPN	RCRE	2	1

Mecanismos de protección asociados a *Trichoderma*: MICPL: Presencia de micoparasitismo leve; MICPF: Presencia de micoparasitismo moderado; PMET: Producción de metabolitos antifúngicos; PENZ: Producción de enzimas antifúngicas; ANTB: Presencia de antibiosis; COMPN: Presencia de competición por nutrientes; RCRE: Crecimiento acelerado. ANTiv: Grado de antagonismo *in vitro*; IProTip: Índice de protección *in planta*. Grado de protección. **Azul**: Sin actividad (0). **Verde**: Ligeramente activo (1). **Amarillo**: Moderadamente activo (2). **Rojo**: Máxima actividad antifúngica (3).

8. DISCUSIÓN

8.1. Relación cualitativa entre los mecanismos de patogénesis de *Fusarium oxysporum*. evaluados *in vitro* con su patogenicidad *in planta*

El aislamiento y caracterización de los hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en cultivos de importancia agrícola, es hoy una necesidad para su correcto manejo y control. El conocimiento de la interacción planta-patógeno que establecen en estas enfermedades es actualmente una ventaja muy importante que permite conocer las fortalezas y debilidades del patógeno que se tiene que combatir. El conocer los mecanismos que utiliza la planta para contrarrestar la infección del patógeno, así como los mecanismos de patogénesis o que usa el patógeno para infectar a la planta, permite el desarrollo de nuevas estrategias de control, así como también el uso inteligente de las opciones disponibles. Sin embargo, las interacciones planta-patógeno que han sido caracterizadas son relativamente limitadas, lo que hace necesario estudiar y generar conocimiento de aquellas que no son abordadas. Entre estas interacciones se encuentra la asociada a la pudrición y raíz del nardo (*Polianthes tuberosa*) asociada a *Fusarium oxysporum*.

Uno de los cuellos de botellas en la investigación de la caracterización de la patogénesis de *Fusarium oxysporum*, es la variedad de biotipos que es posible encontrar cuando se realizan aislamientos en suelo y material vegetal. Ya que en una muestra de suelo nos podemos encontrar con aislamientos saprofitos, no patogénicos, patogénicos, endófitos y benéficos. Lo que hace necesario casi de manera obligada la evaluación de su patogenicidad en plántulas del cultivo asociado. Sin embargo, esto se complica cuando son cultivos cuyo material vegetal es limitado o que involucra un ciclo de cultivo muy extenso lo que complica el manejo de numerosos aislamientos. Esto hace necesario buscar alternativas que nos permitan realizar una caracterización de los aislamientos, asociarlos con su patogénesis, que nos permitan el ahorro de material vegetal, tiempo y recursos.

Este estudio estuvo encaminado a la búsqueda de alternativas de evaluación de los principales mecanismos de patogénesis asociados a *Fusarium oxysporum* bajo condiciones *in vitro* que permita asociarlos con la evaluación en planta Haware y Nene, (1982, 1980).

La asociación de los mecanismos de patogénesis con los aislamientos no es algo nuevo, anteriormente se han usado diferentes estrategias para evitar la evaluación en planta. Un ejemplo lo encontramos en el trabajo realizado por Duarte *et al*, (2003), donde realizando aislamientos de *Fusarium solani* (buscando asociarlos a *F. solani* f. sp. *piperis*) de tejido de enfermos de la base infectada de cultivos de Pimienta Negra, se buscó asociar su patogenicidad a la producción de fitotoxinas y su efecto fitotóxico en las hojas de la planta. La relación encontrada no fue suficiente para encontrar una correlación directa.

En este estudio se buscó relacionar los principales mecanismos de patogénesis asociados a *Fusarium oxysporum*. Uno de los primeros fue la producción de enzimas que degradan la pared celular de las raíces. La pared celular vegetal es uno de los principales obstáculos que los hongos fitopatógenos tienen que cruzar para poder lograr una infección eficaz, *F. oxysporum*, un hongo patógeno que tiene todo el arsenal para lograr este objetivo al ser capaz de colonizar a sus plantas huéspedes penetrando a través de las raíces y colonizando todo el sistema vascular, como infección inicial (Turlier *et al.* 1994). Esta especie produce gran variedad de enzimas líticas que despolimerizan todos los componentes de las paredes vegetales, como son la celulosa, el xilano, las pectinas, los ácidos poligalacturónicos y las proteínas (extencinas) (Roncero *et al.* 2000).

En este trabajo se diseñaron estrategias para evaluar la colonización y producción de estas enzimas. En el primer caso, se utilizaron raíces excisadas del bulbo para observar el grado de colonización del aislamiento. En cuanto a la producción de enzimas pectinolíticas se usó una estrategia utilizada principalmente para bacterias pectinolíticas (Andro *et al.* 1984) a través de un medio de cultivo denominado como PEL. Sin embargo, este medio tuvo nutrientes suficientes como para que los aislamientos de *Fusarium* crecieran independientemente de su capacidad pectinolítica, lo que hizo necesario modificarlo a un medio mínimo que lo forzó a degradar el sustrato (PGA) si tenía la capacidad de hacerlo.

Estos dos parámetros se observaron como de suma importancia como mecanismos de patogénesis. Ya que si estos dos mecanismos se encontraban con un índice bajo, la patogénesis observada en planta también era bajo (Tabla 7.3). Sin embargo hubieron dos aislamientos que no se relacionaron en este sentido, POF4 que presentó un índice de producción de enzimas que degradan la pared celular bajo (PEDPC) aunque una protección en planta moderada, y POF8, que presentó un índice de colonización (CR) muy alto y PEDPC moderado. En caso de POF4, esto podría relacionarse a la producción de otras enzimas no relacionadas a las poligalacturonasas (PG), como serían xilanasas, o algún mecanismo de patogénesis no determinado. Mientras que para POF8, esta actividad elevada no es de relevancia si no tiene la capacidad de contrarrestar a otro mecanismo de defensa como son las fitoanticipinas. Vázquez *et al.*, (1992), también evaluó la producción de enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal en tres aislamientos de *Fusarium oxysporum*. El medio de cultivo para el ensayo enzimático fue Czapeck-Dox modificado (Vázquez, 1986) donde la fuente de carbono fue sustituida por pectina al 1 %. A partir del filtrado que se obtuvo se evaluó la producción de estas enzimas, y se relacionó la virulencia de los aislamientos previamente caracterizados como patogénicos al tomate. Cuando se usa el ácido poligalacturónico como sustrato para la producción de este tipo de enzimas, como Di Pietro *et al.* (1998), en donde sus resultados mostraron que no existió una correlación entre la producción de las enzimas que degradan la pared celular con la virulencia de los aislamientos. En este trabajo por otra parte, si se observó como un factor determinante una adecuada colonización y producción de enzimas que degradan la pared celular con la severidad de la enfermedad y patogénesis encontrada en planta.

Por otra parte, en muchas interacciones planta-patógeno que involucra a *Fusarium*, se ha observado que este puede inducir la inhibición de la actividad de enzimas con actividad de peroxidasas (Bahena-Reyes 2014, Lopez-Velazquez 2015). Estas enzimas están relacionadas en el control del daño inducido por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y a su vez el desarrollo de la respuesta hipersensible (HR), uno de los principales mecanismos de resistencia por parte de las plantas (Levine *et al.*, 1994). Con la inhibición de estas enzimas, viene un aumento en la producción de ROS que el patógeno debe poder contrarrestar de manera eficiente o tener una resistencia importante a este estrés oxidativo. Por este motivo, fue que se evaluó la resistencia a este tipo de estrés por parte de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* (Fig. 7.6). Los resultados mostraron un grado de resistencia a ROS muy arraigado en todos aislamientos que fue de moderado a alto, lo que finalmente provocó que este mecanismo de patogénesis no sea considerado como diferencial, que nos permita distinguir un aislamiento patogénico de uno que no lo es. Aunque posiblemente si sea determinante como factor de patogenicidad. Un punto importante en la evaluación de resistencia al estrés oxidativo, fue que se observó que para algunos aislamientos el efecto en el crecimiento no fue dosis dependiente, y en algunos aislamientos el efecto antifúngico se dio en las dosis intermedias y no así en la dosis alta. Esto es un punto que resulta de interés para explorar en futuros estudios.

Por otra parte, en cuanto a la capacidad de detoxificar o resistir la presencia de fitoanticipinas del nardo, en este caso principalmente asociadas a saponinas. Si se observó una respuesta diferenciada entre los aislamientos (Tabla 7.3). La producción de este tipo de fitoanticipinas se genera de forma natural en las plantas, al ser un producto de su metabolismo normalmente, aunque también pueden ser inducidas por estrés biótico y abiótico. De los bulbos del nardo se han extraído metabolitos que han sido reportados con propiedades antispasmodicas, antisépticas y anti-inflamatorias (Maliga, 2003), además se ha explorado su uso en el tratamiento de la malaria (Firdous *et al.*, 1999). Los aceites esenciales de las plantas pueden ser extraídos utilizando una variedad de métodos, tales como la destilación hidráulica y extracción con disolvente, aunque algunos no lo son de uso común hoy en día, tales como extracción por frío y calor (Maliga, 2003). Muchas de las propiedades han sido asociadas a sus aceites esenciales pero también a sus saponinas. En este trabajo se realizó la extracción y cuantificación de las saponinas del bulbo y raíz del nardo para caracterizar su efecto en los aislamientos de *F. oxysporum*. Las saponinas presentan una elevada actividad antimicrobiana, incluyendo actividad antifúngica. Sin embargo, también ha sido descrito que uno de los principales mecanismos de patogenicidad es la capacidad para producir enzimas que detoxifican a fitoanticipinas, por mecanismos muy variados. En este estudio se relacionó la capacidad que tienen los diferentes aislamientos con resistir la actividad antifúngica de las saponinas extraídas del nardo (Fig. 7.8). Se observó que la mayoría de los aislamientos tuvieron la capacidad de resistir la actividad de las saponinas, presentando una resistencia de moderada a alta, con excepción del aislamiento POF8 que presentó una resistencia baja y se consideró que este fue el

principal motivo para que su patogenicidad en planta no fuera considerada como relevante. Mientras que aquellos que presentaron la mayor actividad dos de ellos presentaron una infección en planta de moderada a alta. Sin embargo destacó POF9, que aun cuando presentó una actividad alta, esta siguió siendo no patogénica. Esto se relacionó con la baja colonización de raíz y baja producción de enzimas que degradan la pared celular.

La evaluación de patogenicidad en planta es la prueba que nos permite diferenciar de manera inequívoca, la capacidad patogénica de los aislamientos de *Fusarium*, considerando su plasticidad y siendo cosmopolita en el suelo y tejido vegetal. Sin embargo, en el nardo este tipo de pruebas consideran un importante gasto de tiempo y material vegetal al ser un método de evaluación destructivo. Para observar los síntomas de la enfermedad en los bulbos y raíz se necesitó de al menos 30 días y 60 días para que estos síntomas fueran determinantes. Se encontró que al menos 4 aislamientos son considerados como patogénicos POF4, POF6 y POF7, destacando POF1 como el más virulento. Sin embargo también se encontró que tres aislamientos tienen un potencial patogénico, aunque puede asociarse más a una incapacidad para establecer una interacción compatible con el nardo. Mientras que dos aislamientos no presentaron síntomas por lo que fueron catalogados como no patogénicos (POF3 y POF9). En la correlación entre la evaluación in vitro y la evaluación in planta, fue posible relacionar a los mecanismos de patogénesis que podríamos considerar como factores de patogenicidad o determinantes del desarrollo de la enfermedad. Estos fueron el grado de colonización de la raíz del nardo (CR), la producción de enzimas que degradan la pared celular (PEDPC) y la resistencia a fitoanticipinas, saponinas en el caso del nardo. Un índice bajo en estos factores fue indicativo de una falta de patogenicidad o una baja presencia de síntomas de infección, aun cuando es posible encontrarlos dentro de la planta.

Aun cuando es posible encontrar esta correlación, hay otros mecanismos que pudieran ser interesantes de explorar como son la resistencia a los mecanismos de defensa de la planta, como pueden ser la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis como son la quitinasas y las β -1,3 glucanasas, evaluaciones que fueron realizadas en la evaluación de los mecanismos de defensa de *Trichoderma*, pero no fueron exploradas en los aislamientos de *Fusarium*, al ser realizadas de manera paralela. Sin embargo, es un mecanismo que pudiera permitirnos una mejor caracterización de los mecanismos de patogénesis de los aislamientos de *F. oxysporum*. Otro mecanismo que sería importante abordar es la evaluación de un número mayor de enzimas que degradan la pared celular, como pueden ser las xilanasas o pectatoliasas que pueden ser evaluadas utilizando un sustrato con una mayor especificidad en cuanto a la enzima a la que dirige la evaluación. Otro punto importante sería la producción de los metabolitos fitotóxicos, que en este trabajo fue abordado de manera limitada en un solo aislamiento con la mayor virulencia como fue POF1. Sin embargo, los demás aislamientos podrán ser evaluados bajo estas condiciones para poder asociar si este mecanismo de patogénesis tiene alguna relación con el establecimiento de la infección en el nardo.

En este trabajo, fue posible adaptar algunos métodos de evaluación *in vitro* de procesos o mecanismos de diferentes microorganismos como métodos de evaluación de los mecanismos de patogénesis, lo que provocó que mucho del trabajo tuviera implícito un establecimiento y estandarización de la metodología a utilizar. Por lo que se considera que es también una contribución importante del trabajo.

8.2. Relación cualitativa entre los mecanismos de protección de *Trichoderma* evaluados *in vitro* con su protección *in planta*

El control químico es el método de control de enfermedades vegetales más arraigado y el que ha mostrado una elevada efectividad. Sin embargo, sus efectos secundarios han sido cuestionados por su impacto ambiental, a la salud humana y la resistencia que desarrollan los microorganismos, lo cual ha generado una creciente y justificada preocupación por la contaminación, el deterioro ambiental y el desequilibrio de los ecosistemas (Torres y Capote 2004). El control biológico se ha levantado como la mejor opción para la paulatina sustitución de los agroquímicos, pero en la actualidad se ha encontrado que su combinación con el control químico y su uso correcto son opciones a considerar. La aplicación de estas técnicas a base de microorganismos benéficos se ha estado incrementando gracias al potencial que han mostrado algunos antagonistas y su bajo impacto ambiental directo o al disminuir el uso de agroquímicos como fungicidas y plaguicidas en los cultivos. En este sentido, en el mercado mundial y nacional existen diversos productos denominados como de control biológico, entre los que se incluyen microorganismos antagonistas o de biocontrol, inductores de defensa vegetal, potenciadores de la microflora o actividad antagonista, extractos vegetales, entre otros (Ezziyyani, M., Pérez, S., C., Ahmed, S., A., Requena, M., E. y Candela, M., E., (2004), Amini J. *et al.*, (2009)). Además al uso de los microorganismos antagonistas directos, actualmente se utilizan los derivados de los microorganismos así como sus extractos microbianos. Lo que habrá nuevas estrategias para seleccionar a los aislamientos que presenten el mayor potencial para la producción de estos derivados microbianos.

Los hongos del género *Trichoderma* son una gama de antagonistas que se han estudiado a lo largo de estos años (Cervantes, 2007; Harman, 2014), además que están asociados a las raíces de muchos cultivos ayudando a incrementar la masa radical y de esta manera la absorción de nutrientes por parte de la planta, y además ayudan a desencadenar los mecanismos de defensa y así la planta se encuentra preparada para la llegada de los fitopatógenos. *Trichoderma* spp. es conocido por tener un alto grado de biocontrol micoparasitando un amplio rango de hongos patógenos de las plantas entre lo que se encuentran *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* ya sea utilizando aislamientos

nativos o los de interés comercial ya conocidos (Mausam *et al.*, 2007). En este trabajo uno de los principales objetivos fue seleccionar aislamientos antagonistas de *Trichoderma* mediante pruebas *in vitro* que nos permitieran relacionar de forma directa la protección que estos mismos presentan en plantas. Lo que hizo necesario proponer y utilizar nuevas técnicas y en algunos casos modificar técnicas ya existentes para lograr nuestro propósito.

Las especies de *Trichoderma* se aíslan normalmente de la rizósfera de cultivos, ya que estos hongos se asocian con facilidad a las plantas. En las diferentes formas de aislar hongos lo que se busca es la efectividad de obtener aislamientos puros y que sea diferenciado a nivel de género o especie. Salazar *et al.* (2011), realizó una búsqueda de la efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. En este estudio se tomaron muestras de suelo húmedo provenientes de la rizósfera en algunas zonas de producción de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.) y se realizaron aislamientos de estos suelos. Esta ha sido la estrategia más ampliamente utilizada y replicada, con pocas diferencias siendo la principal, el cambio del inóculo rizosférico, que proviene de la especie vegetal a la que se pretende proteger. Por otro lado, también se realizan aislamientos de tejido vegetal los cuales pueden ser aún más efectivos en cuanto a aislar cepas de *Trichoderma* sp. con las características buscadas como son capacidad de colonización en las raíces de las plantas. Al realizar aislamientos de hongos podemos obtener infinidad de cepas de *Trichoderma* sp. pero no todas pueden cumplir con las características que se buscan, para esto se realizan una serie de filtros de selección y descarte de cepas.

El uso de cepas nativas en el caso de *Trichoderma* es una técnica que se ha estado explorando desde hace mucho tiempo, ya que no se sabe con certeza a que especie pertenece cada aislamiento. Sin embargo, al momento de realizar pruebas *in vitro* se amplía el panorama y se conoce poco sobre cada aislamiento, tipo de interacción que muestra, producción de enzimas, producción de metabolitos antifúngicos y otros mecanismos que utilizan los hongos del género *Trichoderma* cuando son expuestos a pruebas de antagonismo. En este trabajo, la caracterización de los aislamientos solo fue a nivel de identificación morfológica y la caracterización de los mecanismos de protección asociados a *Trichoderma* a nivel *in vitro*. Dando seguimiento a la selección de los aislamientos de *Trichoderma*, se realizaron pruebas de antagonismo con la confrontación directa de los aislamientos con *F. oxysporum* mediante la técnica de cultivos duales *in vitro* (Dennis y Webster, 1971). Fue de este modo como se seleccionaron 10 aislamientos los cuales se sometieron a una prueba de colonización para verificar su asociación con *Polianthes tuberosa*, donde el resultado fue positivo ya que todas las cepas de *Trichoderma* seleccionadas colonizaron las raíces de esta planta.

En otros casos, como en el trabajo realizado por Michel-Aceves (2001), donde utilizaron cepas nativas de *Trichoderma* sp. probando principalmente su antibiosis y

micoparasitismo contra dos especies del género *Fusarium* donde se seleccionaron 25 cepas de *Trichoderma* sp. por su efecto antagónico sobre el crecimiento de ambas cepas de *Fusarium*. La evaluación *in vitro* fue de antagonismo por producción de metabolitos o enzimas antifúngicas a través del ensayo con papel celofán. La evaluación *in vitro* de *Trichoderma* puede ser de forma directa (Samuels *et al.*, 2004) o indirecta (Sivakumar *et al.*, 2000; Otadoh *et al.*, 2011), aunque estas evaluaciones mantienen las mismas deficiencias en correlación entre esta actividad *in vitro* y lo observado en planta, en donde en muchos casos falta la correlación entre ambas actividades.

El uso de *Trichoderma* y su asociación con el nardo ya ha sido explorado con anterioridad. Sin embargo, este acercamiento no es el mismo que en este trabajo. En el primer caso Rahman *et al.*, (2012) fue un acercamiento a nivel *in vitro* solamente, realizando aislamiento de *Trichoderma harzianum* en pruebas de cultivos duales contra *Fusarium equiseti*. En este trabajo se comparó la inhibición de cuatro fungicidas seleccionados (Aimcozim, Cupraviv, Dithane M-45 y Newban), utilizados a tres diferentes concentraciones 100, 200 y 400 ppm, para evaluar la inhibición radical del crecimiento de *F. equiseti in vitro* y aceite de origen vegetal (*Brassica napus*) a alta concentración 3%. Los resultados mostraron un buen control de la colonización del patógeno por medio de *Trichoderma*. El segundo acercamiento fue por Muthukumar *et al.*, (2005), donde se utilizó *Trichoderma viride* y *Trichoderma* spp. en confrontación contra *Fusarium oxysporum* mediante la técnica de cultivos duales *in vitro*. En este caso el porcentaje de inhibición fue menor comparado a los resultados reportados por Rahman *et al.*, (2012), ya que en este caso la mayor inhibición la mostró *Trichoderma viride* con un 58.33% de inhibición *in vitro* y *Trichoderma* spp. mostró una inhibición de 53.32% *in vitro* contra *F. oxysporum*. Este trabajo llevó seguimiento, ya que posterior a esta prueba se realizaron las pruebas en invernadero evaluando el crecimiento de *Polianthes tuberosa* donde también se observó un buen resultado en cuanto a porcentajes de crecimiento de brotes y raíces, Aunque no se realizó la confrontación contra *F. oxysporum* en planta.

La habilidad de *Trichoderma* spp. para reducir los daños causados por hongos fitopatógenos, está relacionada con su capacidad de competición (Nelson *et al.*, 1988), de antibiosis por la producción de enzimas líticas y otros metabolitos secundarios (Ghrisalberti y Sivacithamparam, 1991), así como el micoparasitismo (Henis *et al.*, 1983). En el caso de micoparasitismo de *Trichoderma* sp., se considera uno de los mecanismos más estudiados, ya que es lo más usual observar este tipo de interacción mediante pruebas de cultivos duales *in vitro*. En este trabajo se realizaron este tipo de pruebas como un filtro de selección primario de aislamientos antagonistas de *Trichoderma* sp. contra *Fusarium oxysporum*, en el cual la mayoría de los aislamientos mostraron un antagonismo potencial en esta confrontación contra *F. oxysporum*. En este caso se eligieron principalmente los aislamientos que mostraron micoparasitismo, donde se observó que *Trichoderma* sp. cubrió

completamente la caja, micoparasitando a *F. oxysporum*, siendo en muchos casos una total inhibición. Sin embargo, en algunos casos se eligieron aislamientos que mostraron una especie de antibiosis, es decir que a pesar de no micoparasitar al patógeno directamente, lo inhibieron posiblemente por la producción de enzimas hidrolíticas y/o metabolitos secundarios, como es el caso de los aislamientos POT2 y POT9, los cuales no cubrieron el 100% del crecimiento micelial de *F. oxysporum* pero inhibieron su crecimiento a distancia, donde posiblemente hubo secreción de enzimas líticas y metabolitos antifúngicos o competencia por los nutrientes. En el caso de los tratamientos que mostraron micoparasitismo elevado fue en POT3, POT6 y POT10, los cuales mostraron un crecimiento micelial sobre el crecimiento de *F. oxysporum* inhibiéndolo completamente. Los tratamientos POT1, POT5 y POT7 lograron detener el crecimiento de *F. oxysporum* por competencia por espacio y nutrientes, ya que crecieron el 90% de la caja dejando al patógeno con un mínimo de crecimiento. POT5 tardó más tiempo en detener el crecimiento del patógeno, el cual logró un mayor crecimiento que en el caso de POT1 y POT7. En el caso de POT4 y POT8 se observó micoparasitismo y producción de metabolitos para POT4 y competencia por nutrientes y antibiosis para POT8, ya que este no tuvo contacto directo con el patógeno pero creció en un 80% sobre la caja inhibiendo su crecimiento.

Entre las enzimas líticas que producen especies de *Trichoderma* se reportan a las quitinasas, glucanasas (Bruce *et al.*, 1995; Benhamou y Chet, 1997), proteasas y celulasas; algunas están relacionadas con el fenómeno de antibiosis y micoparasitismo al degradar la pared celular y micoparasitar al hospedero (Schickler y Chet, 1997). Las quitinasas, glucanasas y proteasas, son las enzimas mayormente reportadas como involucradas en el control biológico de fitopatógenos. La cantidad de metabolitos producidos por *Trichoderma* depende de los nutrientes y no siempre está relacionada con la habilidad para controlar a la enfermedad (Worasatit *et al.*, 1994); sin embargo, Madi *et al.* (1997) indicaron una correlación positiva entre la cantidad de enzimas (quitinasas, glucanasas y otras) y el porcentaje de micoparasitismo y reducción de la enfermedad. Goldman *et al.* (1994), señalaron inhibición *in vitro* de la germinación de conidios y alargamiento de la hifa en *Fusarium solani* y *Fusarium gramineum* por enzimas quitinolíticas y glucanolíticas producidas por *T. harzianum*. Con respecto a la producción de este tipo de enzimas bajo condiciones *in vitro*, son dependientes de los nutrientes o sustratos en que se encuentre el hongo, ya sea un medio suplementado o modificado con algún tipo de promotor o de forma natural como lo es cuando se encuentra frente a hongos patógenos. En este caso se utilizó quitina coloidal al 1% como inductor para la producción de quitinasas y almidón al 1% para la producción de glucanasas, forzando al hongo a producir sus enzimas si tenía la capacidad para hacerlo. La producción de enzimas con actividad antifúngica fue muy variada entre los diferentes aislamientos y no se encontró una relación directa con la protección en planta de cada aislamiento. Destacó POT6 que tuvo una baja producción de glucanasas y quitinasas, así como su efecto sobre *F. oxysporum* fue bajo o sin actividad. Por otra parte POT2, POT5 y POT10 presentaron una actividad antifúngica alta asociada a quitinasas, no así en

glucanasas. En otros casos se han realizado este tipo de pruebas para obtener dichas enzimas y utilizarlas contra patógenos, como en el trabajo reportado por Michel-Aceves et al, (2005), donde se cuantificó la producción de las enzimas hidrolíticas: quitinasas y glucanasas producidas por cepas de *Trichoderma* spp., así como su efecto antibiótico *in vitro* sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum*. En este caso ellos utilizaron las enzimas extraídas a una concentración de 1:1 con medio de cultivo PDA para pruebas de inhibición del crecimiento micelial, evaluando el crecimiento en mm cada dos días durante 12 días, el resto se utilizó para cuantificar la producción de las enzimas. Ellos observaron que todos los aislamientos fueron capaces de producir quitinasas y glucanasas en diferentes concentraciones y como además de que la producción de enzimas y metabolitos no está en todos los casos relacionada con la capacidad de controlar la enfermedad (Worasatit *et al.*, 1994), algo que también se encontró en este trabajo.

Por otra parte, las especies de *Trichoderma*, como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolación, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Bengston et al, 1992, Cherif y Benhamou.1990, Mauch *et al.*, 1988, Sivan y I.Chet.1989). Los resultados obtenidos nos indican que si hubo diferencia en cuanto al efecto que causaron los diferentes tratamientos en *F. oxysporum* fueron POT2, POT4 y POT10, seguido de los aislamientos POT5, POT6, POT8 y POT9, mientras que POT1 y POT7 fueron los que mostraron el menor efecto en esta prueba.

En cuanto a la relación que existió entre la evaluación de los mecanismos de protección *in vitro* y la evaluación de la protección *in planta* (Tabla 7.10), no fue posible encontrar una relación directa entre los mecanismos de protección. Considerando que estos mecanismos involucran en su mayoría una inhibición directa contra el patógeno, no se evaluó aquellos mecanismos de protección indirectos o inducidos en la planta.

Los aislamientos POT1, POT2, POT5, POT6, POT8 y POT9 si presentaron una relación con lo observado *in vitro* (IPROT_{iv}) con lo observado en planta (IPROT_{ip}). En la búsqueda de un mecanismo que permita una relación directa y permita diferenciar a un aislamiento que protege en planta y presentó este mismo nivel de protección *in vitro*, los métodos empleados no permitieron encontrarla. Se buscó la relación de los resultados en la confrontación directa con la protección en planta, pero de nueva cuenta no se presentó la relación esperada.

A partir de estos resultados no fue posible relacionar la respuesta *in vitro* con la respuesta en planta, lo que hace necesario continuar con la búsqueda del método de evaluación *in vitro* que nos permita filtrar los aislamientos que sean activos en la planta. Uno de los

mecanismos que posiblemente contribuyan a esta meta, es evaluar mecanismos indirectos de protección por arte de *Trichoderma*, como son la inducción de mecanismos de defensa vegetal, la caracterización mucho más puntual de la colonización de raíz e incluso la producción de compuestos relacionados con el establecimiento de la interacción *Trichoderma*-planta.

La evaluación y caracterización realizada a los aislamientos de *Trichoderma*, por otra parte, pueden servir para el uso de los aislamientos como productores de metabolitos antifúngicos, enzimas antifúngicas o el mismo filtrado microbiano para el control por antibiosis o bioactivadores de las plantas, contra algunos patógenos radiculares.

Este estudio por lo tanto contribuye a la generación del conocimiento de los mecanismos de protección asociados a *Trichoderma*, el aislamiento de candidatos como agentes de control biológico que pueden llegar a utilizarse a nivel práctico y como fuente de extractos microbianos utilizados en el control biológico de *Fusarium oxysporum*, en el modelo vegetal *Polianthes tuberosa*, o en otros donde este patógeno es de relevancia como patógeno.

9. CONCLUSIONES

- Se aislaron y seleccionaron cepas de *Fusarium oxysporum* asociadas a la pudrición de raíz y bulbo del nardo (*Polianthes tuberosa*).
- Todas las cepas de *F. oxysporum* fueron capaces de colonizar las raíces del nardo en mayor y en menor grado, pero no todas fueron capaces de penetrar la raíz.
- Se demostró que existe relación con algunos mecanismos de patogénesis mostrados *in vitro* con la enfermedad causada en las plantas.
- Se encontró que la colonización de raíz, producción de enzimas degradadoras de pared celular y la resistencia a saponinas, son mecanismo relacionados con la patogénesis que *F. oxysporum* ocasiona en las plantas de nardo.
- Se aislaron y seleccionaron cepas nativas de *Trichoderma* sp. asociadas a la rizósfera de especies silvestres del género *Polianthes*.
- Todas las cepas de *Trichoderma* sp. colonizaron las raíces de nardo en mayor o menor medida.
- No se encontró relación directa entre los mecanismos de protección evaluados *in vitro* con la presencia de protección en planta, que pudiera ser concluyente.
- Se logró la caracterización de los aislamientos de *Trichoderma* sp. con la capacidad de controlar la enfermedad de pudrición de bulbo y raíz del nardo por asociación a la raíz del nardo.
- Se logró la caracterización de aislamientos de *Trichoderma* sp. con la capacidad de producir enzimas y metabolitos antifúngicos contra *Fusarium oxysporum* asociado al pudrición de bulbo y raíz del nardo.

10. BIBLIOGRAFIA

- A. MUTHUKUMAR, G. KARTHIKEYAN and K. PRABAKAR, 2005. BIOLOGICAL CONTROL OF TUBER ROT (*Fusarium oxysporum*) IN TUBEROSE (*Polygonum tuberosum* L.). Madras Agric. J. 92 (10-12): 742 – 744.
- Abd-Allah EF, Ezzat SM, Tohamy MR (2007) *Bacillus subtilis* as a alternative biologically based strategy for controlling *Fusarium* wilt disease in tomato: A histological study. *Phytoparasitica* 35:474-478.
- Agrios, G.N. (1997) Plant Pathology. San Diego, CA: Academic Press. Arie, T., Kaneko, I., Yoshida, T., Noguchi, M., Nomura, Y. and Yamaguchi, I. (2000) Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. Mol. Plant- Microbe Interact. 13, 1330–1339.
- Álvarez, A. 1987. Sistemática y filogenia de la familia Agavaceae Endlicher. Tesis doctorado, Facultad de Biología, Jardín Botánico Nacional. Universidad de La Habana. 210 p.
- Álvarez, A. 1988. Morfología y anatomía floral de las Agavaceae. Revista del Jardín Botánico Nacional 9:37-57.
- Amaral DOJ, Magalhaes M, Vilela L, Vanusa M. 2008; Differential gene expression induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection in tomato. Pesq Agrop Bras. 43(8): 1017-1023.
- Amini J. et al., (2009). Induced resistance in tomato plants against fusarium wilt invoked by nonpathogenic *Fusarium*, Chitosan and Bion. *Plant Pathology Journal*. 25(3), 256-262.
- Andro T, Chambost JP, Kotoujansky A, Cattaneo J, Bertheau Y, Barras F, Van Gijsegem F, Coleno A (1984) Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulose. J Bacteriol 160:1199–1203
- Anguelova-Merhar VS, Calistri C, Berjak P (2003) A study of some biochemical and histopathological response of wet-stores recalcitrant seed of *Avicennia marina* infected by *Fusarium moniliforme*. *Ann Bot* 92:401-408.
- ANTONIO DI PIETRO, MARTA P. MADRID, ZAIRA CARACUEL, JESÚS DELGADO-JARANA AND M. ISABEL G. RONCERO, (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. MOLECULAR PLANT PATHOLOGY. 4 (5) , 315–325
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.

- Baccou, J. C., Lambert, F., & Sauvaire, Y. (1977). Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. *Analyst*, 102, 458–465.
- Bahena, E. (2014). La interacción agave Tequilana weber variedad azul – *Fusarium oxysporum*. Caracterización de los mecanismos de defensa vegetal. Instituto Tecnológico de Acapulco.
- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi* (3^a Ed.). Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Belanger R, Dufuor N, Caron J & Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. *Biocontrol Science Technology* 5: 41-54.
- Bengston, G., K.W. Boeddeker, H.P. Hanseen and I.Urbasch. 1992. Recovery of 6-pentyl-alpha pyrone from *Trichoderma viride* culture medium by pervaporation. *Biotechnol. Tech.* 6 (1): 23-26.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *App. Environ. Microbiol.* 63: 2095-2099.
- Benschop, M. 1993. Polianthes. In: Hertog, A. de, M. L Nard (Eds.). *The physiology of flower bulbs*. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. p: 589-601.
- Blok, W. J., M. J. Zwankhuizen, and G. J. Bollen. 1997. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* by applying nonpathogenic isolates of *F. oxysporum*. *Biocontrol Science and Technology* 7: 527-541.
- BOOTH, C. 1970. *Fusarium oxysporum* CMI descriptions of plant pathogenic fungi and bacteria. No. 211. Commonwealth Agricultural Bureaux. London.
- BOSLAND, P. W. 1988. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in plant pathology.* 6: 281- 289.
- BRUCE, A.; SRINIVASAN, U.; STAINES, H., J.; HIGHLEY, T. L. 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi. *Intern. Biodet. & Biodeg.* 23: 337-353.
- Cabrera, J. R., R. Orozco M. 2003. Diagnóstico sobre las plantas ornamentales en el estado de Morelos. SAGARPA-INIFAP. Zacatepec, Morelos. 26 pp.
- Caprari, C; Richter, A; Bergman, C; Lo Cicero, S.; Salvi, G.; Cervone, F. y De Lorenzo, G., 1993: Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Mycol. Res.* 97:497-505.

- Cerkauskas R. Fusarium Wilt. 2005. (En línea) Disponible en <http://www.avrdc.org/pdf/tomato/fusarium.pdf>. (Consulta: 30 de agosto 2014).
- Cervantes A. 2007. Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos. (Consultado: 16 feb 2007). Disponible en: http://infoagro.comhortalizasmicroorganismos_beneficiosos_cultivos.htm
- Chan, K. W., Khong, N. M. H., Iqbal, S., & Ismail, M. (2013). Isolation and antioxidative properties of phenolics-saponins rich fraction from defatted rice bran. *Journal of Cereal Science*, 57, 480–485.
- Chandravadana MV, Nidiry ESJ. 1994. Antifungal activity of the essential oil of *Pelargonium graveolens* and its constituents against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Indian J Exp Biol* 32: 908–909.
- Cherif, M. and N. Benhamou.1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasite action of a *Trichoderma sp.* on *Fusarium oxysporum* f. spp *Radicis lycopersici*. *Phytopatology*: 80 (12): 1406-1414.
- Chérif M, Arfaoui A, Rhaiem A (2007) Phenolic compounds and their role in bio-control and resistance of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal of Plant Protection* 2:7-21
- Chet I & Ibar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48: 37-43.
- Chet I, Ibar J & Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (Wicklow DT & Soderstrom B, eds.). New York: Springer Verlag, pp. 165-192.
- Chet, I and Baker R. 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopatology* 70:994-998.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*; 124: 803- 814.
- Cichy KA, Sieglinde S, William S, Kirk W (2007) Fusarium root rot incidence and root system architecture in grafted common bean lines. *Plant Soil* 300:233–244.
- Danay Infante, B. Martínez, Noyma González y Yusimy Reyes, 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Veg. Vol. 24 No. 1: 14-21*.
- Dang, J.L. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-830.

- Deniss, C. and Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I production of non-volatile antibiotics. *Trans Brit. Mycol. Soc*, 57: 25-39.
- Dennis L, Webster J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III Hyphal interaction. *Trans Br Mycol Soc*; 57:363-369.
- De Lorenzo, G.; Castoria, R.; Bellicampi, D. y Cervone, F., 1996: Fungal invasion enzymes and their inhibition. En *Mycota*. Carroll y Tudzinky (eds). Springer-Verlag. Berlin.
- Díaz J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.
- Di Pietro A, Garcia-Macéira FI, Huertas-Gonzalez MD, *et al.* Endopolygalacturonase PG1 in different forma especiales of *Fusarium oxysporum*. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1967-1971.
- Di Pietro A, Garcia-Maceira FI, Meglec E, Roncero MIG. A MAP. kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol*, 2001; 39 (5): 1140-1152.
- DUARTE, M.L.R. & ARCHER, S.A. *In vitro* toxin production by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *Fitopatologia Brasileira* 28:229-235. 2003.
- Dudareva, N. and F. Negre. 2005. Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 113-118.
- Elad Y & Baker R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75: 1053-1058.
- Elad, Y. and Chet, I. (1983). Improved selective media for the isolation of *Trichoderma* or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica*, 11: 55-58.
- Elad Y & Chet I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77: 190-195.
- Erwin DC, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, pp. 562.
- Espejo, S. A. y A. R. López F. 1992. Las monocotiledóneas mexicanas. Una sinopsis florística. Parte I. Consejo Nacional de la Flora de México. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México, D. F. 76 p.
- Ezziyyani M, Pérez-Sánchez C, Sid-Ahmed A, Requena ME, Candela ME. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora*

- capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*. 26, pp: 35-45.
- García-Mendoza, A. y R. Galván V. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 56:7-24.
- García-Vera AG (2011) Evaluación de los hongos filamentosos asociados a la rizósfera de Agave tequilana Weber var. azul con potencial como biofertilizantes y/o agentes de biocontrol contra cepas patogénicas de *Fusarium oxysporum*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. Zapopán, Jalisco, México. 135 pp
- GHRISALBERTI, E. L.; SIVACITHAMPARAM, K. 1991. Antifungal antibiotic produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. & Biochem.* 23: 1011-1020.
- GOLDMAN, G. H.; HAYES, C.; HARMAN, G. E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Biotech. Tibtech.* 12: 478-482.
- HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69: 64-68.
- HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83: 313-318.
- HARMAN, GE. 2004. Mythos and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derive from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis*; 84:377-393.
- HARMAN, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopath.* 96:190-194.
- Haware MP and Nene YL (1980) Influence of wilt at different growth stages on yield loss in chickpea. *Tropical Grain Legumes Bulletin* 19:38-44
- Haware MP and Nene YL (1982) Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Plant Disease* 66:809-810
- HENIS, Y.; ADAMS, P. B.; LEWIS, J. A.; PAPAIVISAS, G. C. 1983. Penetration of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 73: 1043-1046.
- Hjeljord L, Tronsmo A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). Volumen 2. p.131-151. Taylor & Francis. 1998.

- HOITINK, H.A.J.; MADDEN, L.V.; DORRANCE, A.E. 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopath.* 96:186-189.
- Holtzmann, O. V. 1968. A foliar disease of tuberose caused by *Aphelenchoides besseyi*. *Plant Disease Reporter* 52:56.
- Houterman PM, Speijer D, Dekker HL, de Koster CG, Cornelissen BJC, Rep M. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol Plant Pathol.* 2007; 8: 215-221.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444: 323-329.
- Jones T. M., Anderson, A. J. & Albersheim, P., 1972: Host-pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide- degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol*, 2, 153-166.
- Joshi, A. C. y J. V. Pantulu. 1941. A morphological and cytological studies of *Polianthes tuberosa* Linn. *Journal of the Indian Botanical Society* 20:37-71.
- Kono, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, M., and Komada, H. 1995. Alterations in superoxide dismutase and catalase in *Fusarium oxysporum* during starvation-induced differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1268:35- 40.
- Kroes GMLW, Baayen RP, Lange W (1998) Histopathology of root of flax seedlings (*Linum usitatissimum*) infected by *Fusarium oxysporum* f.sp *lini*. *Eur J Plant Pathol* 104:725-736.
- Lawrence BM. 1995. Progress in essential oils. *Perfumer Flavorist* **20** (November-December): 42.
- Levine, A., Tenhhaaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583- 593.
- Lorenzo N. 2001. Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. Tesis en opción al título de Master en Protección Vegetal Universidad Agraria de La Habana.
- MADI, L.; KATAN, T.; KATAN, J.; HENIS, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology* 87: 1054-1060.
- Mallavarapu G. R. 1995. Essential oils from some aromatic ornamental plants. *Advance in Horticulture* 12: 1046. *Ornamental Plants*. Eds: K. L. Chadha and S. K. Bhattacharjee. 1995. Malhotra Publishing House, New Delhi, India.

- Maliga, L. 2003. Tantalizing tuberose. The Chamomile Times and Herbal News. Available Source: <http://www.chamomiletimes.com/articles/tuberose.htm>
- MARSCHNER, P.; TIMONEN, S. 2005. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology*. 28:23-36.
- Martínez J T. Uso de *Trichoderma* para el Control Biológico de Organismos Patógenos de Plantas. En Memorias del Simposium sobre Agricultura Orgánica y de baja residualidad. Cuautémoc, Chih. México; 2 de julio 1998, 25-27p.
- Mauch, F., B. Mauch-Manianti T. Boller.1988. Antifungal hidrolases in pea tissue. **11** Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3 gluconase, *Plant Physiol*; 88 (3) 936-942.
- Mausam Verma, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, J.R. Valero 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1–20.
- Medentsev, A.G., Arinbasarova, A., and Aimenko, V.K. 2002. Adaptation of the phytopathogenic fungus *Fusarium decemcellulare* to oxidative stress. *Mikrobiologiya* 70:34- 38.
- Medina-Fuentes, 2013. EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE QUITOSANO, QUITINA Y *Trichoderma* sp. EN EL CONTROL DE *Phytophthora capsici* L. EN CHILE SERRANO (*Capsicum annuum*). Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de la Costa. Santiago Inxcuintla, Nayarit, México. 102 pp.
- Michel-Aceves, A. C.; Otero-Sánchez, M. A.; Rebolledo-Domínguez, O.; Lezama-Gutiérrez, R.; Ochoa-Moreno, M. E. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp, en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* in vitro. *REVISTA CHAPINGO SERIE HORTICULTURA*, vol. 11, núm. 2, julio-diciembre, 2005, pp. 273-278
- Mohammed Ezziyyani, Consuelo Pérez Sánchez, Ahmed Sid Ahmed, María Emilia Requena & María Emilia Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- M. Stefanova, A. Leiva, L. Larrinaga, M. F. Coronado. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp; para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*.16: 509-516.
- M. T. Rahman, M. A. H. B. Bhuiyan, M. K. A. Bhuiyan & M.M. Khandaker. 2012. IN VITRO INTEGRATED MANAGEMENT OF BLOSSOM BLIGHT DISEASE OF TUBEROSE (*POLIANTHES TUBEROSA* L.) CAUSED BY *FUSARIUM EQUISETI*. Department of Plant Pathology, Bangabandhu Sheikh Mujibur Rahman

- Agricultural University (BSMRAU), Gazipur-1706, Pak. J. Phytopathol., Vol. 24(1): 48-52.
- Nash, S. M., and W. C. Snyder. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology* 52: 567-572.
- Navarro-Lopez, 2012. El regulador IscR en la patogenicidad de *Pseudomonas syringae* para el desarrollo de estrategias de control biológico en frijol. Tesis de Maestría en ciencias. Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco. Guadalajara, Jalisco, México. 71pp.
- Ncube, B., Ngunge, V. N. P., Finnie, J. F., & Staden, J. V. (2011). A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 775–780.
- Nelson, P. E. T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, PA. 193 pp
- NELSON, E. B.; HARMAN, G. E.; NASH, G. T. 1988. Enhancement of *Trichoderma*-induce biological control of *Pythium* seed rot and pre-emergence damping-off of peas. *Soil Biol. & Biochem.* 20: 145-150.
- Nidiry ESJ. 1998. Structure-fungitoxicity relationships of the monoterpenoids of the essential oils of peppermint (*Mentha piperita*) and scented geranium (*Pelargonium graveolens*). *J Essent Oil Res* 10: 628–631.
- Nidiry ESJ. 2001. Structure-fungitoxicity relationships of some volatile flavour constituents of the edible mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus florida*. *Flav Frag J* 16: 245–248.
- Ochanda, James, Okoth, Sheila A., Kahindi, James P., Otadoh, Jane A., ASSESSMENT OF *Trichoderma* ISOLATES FOR VIRULENCE EFFICACY ON *Fusarium oxysporum* F. sp. *Phaseoli* Tropical and Subtropical Agroecosystems [en línea] 2011, 13 (Sin mes) : [Fecha de consulta: 16 de junio de 2016] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93916247013>> ISSN.
- Oh E, Hansen EM, (2007). Histopathology of infection and colonization of susceptible and resistant Port-Orford-cedar by *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology* 97:684-693.
- Pantil, D. A. y R. M. Pai. 1985. The nectaries in the Agavaceae. *Acta Botanica Indica* 13:289-291.
- PRABAL SINGH, RUCHI BUNDIWALE AND LK DWIVEDI. 2011. *In-vitro* study of antifungal activity of various commercially available itra (volatile plant oil) against the keratinophilic fungi isolated from soil. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. Vol 2/Issue 3/ ISSN 0975-6299.

- RADJACOMMARE, R.; VENKATESAN, S.; SAMIYAPPAN, R. 2010. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology and Plant Protection*. 43(1):1-17.
- R. Lilia Barron-Hernandez, Lorena Amaya-Delgado, Dolores Gracia-Parra, Eugenia Lugo-Cervantes, 2015. Evaluacion de la actividad antimicrobiana y antifúngica de saponinas de *Agave lechuguilla torrey* sobre cepas deterioradoras y contaminantes de alimentos. Centro de Investigacion en Tecnologia y Diseño del Estado de Jalisco A.C. CIATEJ. Guadalajara, Jalisco México.
- Roberta Marra, Patrizia Ambrosino, Virginia Carbone, Francesco Vinale, Sheridan L. Woo, Michelina Ruocco, Rosalia Ciliento, Stefania Lanzuise, Simona Ferraioli and 6 more. 2006. Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Current Genetics* November 2006, Volume 50, Issue 5, pp 307-321.
- Rohringer R, Kim Wk, Samborske DJ, Howes NK (1977) Calcofluor: an optical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology* 67:808-810.
- Rose, J. N. 1903. Studies of Mexican and Central American Plants. Contributions from the United States National Herbarium 3:1-55.
- Roy A. K. 1984. Two new *Fusarium* diseases of Karbi Anglong, Assam, India, *Curr. Sci.* 53: 1303-04.
- SADIQA FIRDOUS, ADIL RASHID, VIQAR UDDIN AHMAD, KHALID MOHAMMED KHAN" AND SHAHID BADER USMANI.1999. A novel steroidal saponin from *Polianthes tuberosa* LINN. *Natural Product Letters* Volume 14(2), pp. 115-122.
- Salazar *et al.* (2011). Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. *Bioagro* 23(3): 185-190.
- Samuels, G.J., C. Suarez, K. Solis, K.A. Holmes, S.E. Thomas, A. Ismaiel, H.C. Evans, 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in south america. *Mycological Research* 110:381-392.
- SCHICKLER, H.; CHET, I. 1997. Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 196-201.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2015. Cierre de la producción agrícola por cultivo 2013. En línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (consulta: julio de 2015).
- Sid Ahmed A, Pérez Sánchez C & Candela ME. 2000. Evaluation of induction of systemic

- resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 106: 817-824.
- Sid, A. A., Ezziyyani, M., Perez ,S.C., y Candela, M. E.,(2003). Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus spp.* and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology*, 109,633-637.
- SIDDIQUI, Z.A.; AKHTAR, M.S. 2008. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Sci. Techn.* 18(3):279-290.
- Sivan, A. and I.Chet.1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum* J. Gen Microbiol. 135 (3): 675-682.
- Sivakumar D, R.S. Wilson Wijeratnam, R.L.C. Wijesundera, EM.T. Marikar and M. Abeyesekere., 2000. Antagonistic Effect of *Trichoderma harzianum* on Postharvest Pathogens of Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Phytoparasitica.* 28: 240-247.
- Shaaban H. Moussa, Ahmed A. Tayel, Ahmed A. A-Hassan, and A. Farouk. 2013. Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Mycology* Volume 2013, Article ID 753692, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/753692>
- Solano, C. E. 2000. Sistemática del Género *Polianthes* L. (Agavaceae). Tesis, doctorado Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 291 p.
- Solano E. y T. P. Feria. 2007. Ecological niche modeling and geographic distribution of the genus *Polianthes* L. (Agavaceae) in Mexico: using niche modeling to improve assessments of risk status. *Biodiversity and Conservation* 16:1885-1900.
- Speth EB, Lee YN, He SY. 2007. Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant celular functions. *Curr Opin Plant Biol.*; 10: 580-586.
- TELLO, J.; VARES, F. y LACASA, A. (1991): Análisis de muestras. In: Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Ed: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: 39-72.
- Toledo, G. G. 2003. El cultivo del nardo (*Polianthes tuberosa*). In: Cabrera, J. R. (Comp.). Fichas tecnológicas de ornamentales en el estado de Morelos. SAGARPA-INIFAP. Zacatepec, Morelos. pp: 20-21

- Torres, D. y Capote, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Ecosistemas* 13:2-6.
- Turlier MF, Epavier A, Alabouvette C. 1994; Early dynamic interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* and the roots of *Linus usitatissimum* as revealed by transgenic *GUS*marked hyphae. *Can J Bot.* 72: 1605-1612.
- VÁZQUEZ, C; MARTÍNEZ, M. J.; LAHOZ, R.; REYES, F., 1986: Effect of calcium and other metal ions on pectic activities from autolysed cultures of *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 37: 227-230.
- VÁZQUEZ, C. R. SELLEK y N. FERNÁNDEZ, 1992. Enzimas que degradan paredes vegetales en *Fusarium oxysporum*. Dpto. de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid. *Bol. San. Veg. Plagas*, 18: 693-698.
- Vujanovic, V., C. Hamel, S. Jabaji-Hare, and M. St. Arnaud. 2002. Development of a selective myclobutanil agar (MBA) medium for the isolation of *Fusarium* species from asparagus fields. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 841-847. (2)
- Wahitaka, K., M. S. Reid, L. L. Dodge. 2001. Cold storage and flower keeping quality of cut tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76: 271-275.
- WORASATIT, N.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; ROWLAND, C. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of rhizoctonia root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycol. Res.* 98: 1357-1363.
- Yedidia I, Benhamou N & Chet I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.