



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



**MECANISMOS DE DEFENSA INDUCIDOS POR LA
COMBINACIÓN DE *Trichoderma harzianum* Y QUITOSANO
EN NOCHEBUENA (*Euphorbia pulcherrima*) CONTRA
*Phytophthora drechsleri***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

ALMA GUADALUPE GARCÍA VERA



GUADALAJARA, JALISCO, MAYO 2014



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



**MECANISMOS DE DEFENSA INDUCIDOS POR LA
COMBINACIÓN DE *Trichoderma harzianum* Y QUITOSANO
EN NOCHEBUENA (*Euphorbia pulcherrima*) CONTRA
*Phytophthora drechsleri***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

ALMA GUADALUPE GARCÍA VERA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. JOAQUÍN ALEJANDRO QUI ZAPATA



GUADALAJARA, JALISCO, MAYO 2014

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Biotecnología Vegetal, en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). El cual se ubica en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco. Bajo la asesoría del Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapata.

Este trabajo formó parte del proyecto 2010-C03-14933 apoyado con recursos del Fondo Mixto CONACYT – Gobierno del Estado de Michoacán.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
CAPITULO I.....	5
ANTECEDENTES.....	5
2.1 Cultivo de nochebuena en México.....	5
2.1.1 Clasificación taxonómica.....	7
2.2 Problemas fitosanitarios en nochebuena.....	7
2.3 Marchitez y pudrición de la raíz asociada a <i>Phytophthora</i> sp.....	10
2.3.1 Características del genero <i>Phytophthora</i> sp. - Clasificación taxonómica.....	11
2.4 Control de <i>Phytophthora</i> sp.....	13
2.5 Control biológico.....	15
2.6 Microorganismos antagonistas.....	16
2.6.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	16
2.7. Fortalecedores o precursores de la actividad antagonica u organismos benéficos.....	18
2.8 Inductores de defensa vegetal.....	19
2.8.1 Quitosano.....	20
2.9 Estudios de la interacción entre diferentes estrategias de control biológico.....	21
2.9.1 Uso “voluntario” de las combinaciones- La búsqueda de potenciar su efecto protector ..	22
2.9.2 Uso “involuntario”- La inclusión en el Manejo Integrado del cultivo.....	24
2.10 Estudios de la interacción Planta-Patógeno.....	26
2.12 Mecanismos de defensa vegetal – La respuesta de la planta al ataque del patógeno.....	27
2.12.1 El desarrollo de la resistencia sistémica.....	28
2.13 Mecanismos de patogénesis de <i>Phytophthora</i> sp.- Las estrategias de ataque del oomiceto fitopatógeno.....	30
2.14 Mecanismos de defensa vegetal involucrados en la resistencia contra <i>Phytophthora</i> sp.....	31
2.15 Estudios de la interacción de inductores de defensa vegetal en el control de fitopatógenos.....	36
2.16 Bibliografía.....	38

3. Hipótesis	46
4. Objetivos	47
4.1 Objetivo general.....	47
4.2 Objetivos particulares.....	47
5. Resultados.....	48
CAPITULO II.....	49
CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE <i>Euphorbia pulcherrima-Phytophthora drechsleri</i>	49
2.1 INTRODUCCIÓN.....	49
2.2 METODOLOGÍA.....	54
2.2.1 Material vegetal	54
2.2.2 Material biológico	54
2.2.3 Evaluación del grado de severidad patogénica de <i>Phytophthora drechsleri</i> en plantas de nochebuena	54
2.2.3.1 Preparación del inóculo	54
2.2.3.2 Inoculación de <i>Phytophthora drechsleri</i> en plantas de nochebuena.....	55
2.2.4 Evaluación de la respuesta de las plantas de nochebuena a la inoculación de <i>P. drechsleri</i>	55
2.2.4.1 Evaluación de mecanismos de defensa tempranos en raíces de nochebuena.....	55
2.2.4.1.1 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	56
2.2.4.1.2 Evaluación de la respuesta hipersensible	56
2.2.4.1.3 Producción de calosa	57
2.2.4.1.4 Producción de lignina	57
2.2.4.2 Evaluación de mecanismos de defensa relacionados con la resistencia contra <i>Phytophthora drechsleri</i>	57
2.2.4.2.1 Determinación de compuestos fenólicos.....	58
2.2.4.2.2 Determinación de la actividad de la β -1,3 glucanasas.....	58
2.2.4.2.3 Determinación de actividad de quitinasas.....	58
2.2.4.2.4 Determinación de actividad de peroxidasas (POX).....	59
2.2.5 Observación de micelio en cortes histológicas de raíces de nochebuena inoculadas con <i>Phytophthora drechsleri</i>	59

2.2.6	Diseño experimental y análisis estadístico	60
2.3.	RESULTADOS.....	61
2.3.1	Evaluación de la patogenicidad de <i>Phytophthora drechsleri</i> en <i>Euphorbia pulcherrima</i>	61
2.3.2	Mecanismos de defensa vegetal en nochebuena inducidos por el patógeno <i>Phytophthora drechsleri</i>	66
2.3.2.1	Evaluación de los mecanismos de defensa inducidos tempranamente en raíces de nochebuena.....	66
2.3.2.2	Evaluación de los mecanismos de defensa relacionados con la resistencia a <i>Phytophthora</i> sp.	68
2.4	DISCUSIÓN	71
2.5	CONCLUSIONES.....	77
2.6	BIBLIOGRAFÍA.....	78
CAPITULO III.....		83
EFECTO EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA VEGETAL DE LA APLICACIÓN DEL QUITOSANO Y <i>Trichoderma harzianum</i> EN PLANTULAS DE NOCHEBUENA INFECTADAS CON <i>Phytophthora drechsleri</i>		83
3.1	INTRODUCCION.....	83
3.2	METODOLOGÍA.....	88
3.2.1	Material vegetal	88
3.2.2	Material biológico	88
3.2.2.1	Obtención de inóculos fúngicos.....	88
3.2.3	Solución de quitosano al 0.01%	89
3.2.4	Evaluación del grado de protección contra <i>Phytophthora drechsleri</i> en plántulas de nochebuena con la aplicación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i>	89
3.2.5	Evaluación de los mecanismos de defensa vegetal relacionados con el grado de protección contra <i>Phytophthora drechsleri</i> en nochebuena con la aplicación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i>	90
3.2.5.1	Evaluación de mecanismos de defensa relacionados con la resistencia contra <i>Phytophthora drechsleri</i>	90
3.2.5.2	Evaluación de mecanismos de defensa tempranos en raíces de nochebuena.....	90
3.2.5.3	Observación histológica de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.....	91
3.2.6	Análisis estadístico	92
3.3	RESULTADOS.....	93

3.3.1 Evaluación del grado de protección de la aplicación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en plántulas de nochebuena	93
3.3.2 Evaluación de mecanismos de defensa tempranos inducidos por la aplicación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en raíces de nochebuena	97
3.3.3 Evaluación de mecanismos de defensa relacionados con la resistencia contra <i>Phytophthora drechsleri</i> inducidos por la aplicación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i>	101
3.5 DISCUSIÓN	105
3.6 CONCLUSIONES.....	111
3.7 BIBLIOGRAFÍA.....	112
CAPITULO IV	117
EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE <i>Trichoderma harzianum</i> Y QUITOSANO SOBRE LOS MECANISMOS DE DEFENSA VEGETAL CONTRA <i>Phytophthora drechsleri</i> EN NOCHEBUENA.....	117
4.1 INTRODUCCIÓN.....	117
4.1 METODOLOGÍA.....	121
4.2.1 Material vegetal	121
4.2.2 Material biológico	121
4.2.2.1 Obtención de inóculos fúngicos.....	121
4.2.3 Solución de quitosano al 0.01%	121
4.2.4 Evaluación del grado de protección contra <i>Phytophthora drechsleri</i> en plántulas de nochebuena con la aplicación combinada de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i>	122
4.2.5 Evaluación de los mecanismos de defensa vegetal relacionados con el grado de protección contra <i>Phytophthora drechsleri</i> en nochebuena con la aplicación combinada de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i>	123
4.2.5.1 Evaluación de mecanismos de defensa relacionados con la resistencia contra <i>Phytophthora drechsleri</i>	123
4.2.5.2 Evaluación de mecanismos de defensa tempranos en raíces de nochebuena.....	123
4.2.5.3 Observación histológica de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.....	124
4.2.6 Análisis estadístico	124
4.3 RESULTADOS.....	125
4.3.1 Evaluación del efecto protector de la combinación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> contra la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en nochebuena	125

4.3.2 Evaluación de los mecanismos de defensa vegetal tempranos en raíces de nochebuena inducidos por la combinación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i>	129
4.3.3 Evaluación de los mecanismos de defensa vegetal de resistencia inducidos por la combinación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en plantas de nochebuena.....	132
4.4 DISCUSIÓN	139
4.5 CONCLUSIONES.....	145
4.6 BIBLIOGRAFÍA.....	146
CAPITULO V.....	149
DISCUSIÓN GENERAL.....	149
5.1 INFECCIÓN DE <i>Phytophthora drechsleri</i> EN <i>Euphorbia pulcherrima</i>	149
5.2 INDUCCIÓN DE PROTECCION DEL QUITOSANO EN <i>Euphorbia pulcherrima</i> CONTRA LA INFECCION DE <i>Phytophthora drechsleri</i>	151
5.3 INDUCCIÓN DE PROTECCION POR <i>Trichoderma harzianum</i> EN <i>Euphorbia pulcherrima</i> CONTRA LA INFECCION DE <i>Phytophthora drechsleri</i>	153
5.4 INTERACCIÓN DE QUITOSANO Y <i>Trichoderma harzianum</i> EN LA INFECCION DE <i>Phytophthora drechsleri</i> EN <i>Euphorbia pulcherrima</i>	155
CONCLUSIONES FINALES	158

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo biológico de <i>Phytophthora</i> sp.....	12
Figura 2.1. Escala de patogenicidad.....	62
Figura 2.2. Síntomas por la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en plántulas de nochebuena.	64
Figura 2.3. Progreso de la enfermedad provocada por la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en plántulas de nochebuena.	65
Figura 2.4. Mecanismos de defensa inducidos tempranamente por la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.	67
Figura 2.5. Mecanismos de defensa relacionados con la resistencia a <i>Phytophthora</i> en plántulas de nochebuena inoculadas con <i>Phytophthora drechsleri</i>	69
Figura 2.6. Observaciones de la infección del patógeno <i>Phytophthora drechsleri</i>	70
Figura 3.1. Efecto del quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en el progreso de la enfermedad provocada por la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en plántulas de nochebuena.....	95
Figura 3.2. Efecto protector por la aplicación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en plantas de nochebuena inoculadas con el patógeno. Se observaron los síntomas en las plantas de nochebuena ante la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> , en la planta completa.....	96
Figura 3.3. Mecanismos de defensa relacionados con la respuesta hipersensible inducidos tempranamente por la aplicación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.....	99
Figura 3.4. Mecanismos de defensa relacionados con el fortalecimiento de la pared celular inducidos por la aplicación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.....	100
Figura 3.5. Mecanismos de defensa relacionados con la resistencia inducidos por la aplicación de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.....	104
Figura 4.1. Efecto de la aplicación combinada de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en el progreso de la enfermedad provocada por la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en plántulas de nochebuena.	127
Figura 4.2. Efecto de la protección por la combinada de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en plantas de nochebuena infectadas por <i>Phytophthora drechsleri</i>	128
Figura 4.3. Mecanismos de defensa relacionados con la respuesta hipersensible inducidos tempranamente por la aplicación combinada de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.	130
Figura 4.4. Mecanismos de defensa relacionados con el fortalecimiento de la pared celular inducidos por la aplicación combinada de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.....	131

Figura 4.5. Producción de proteínas PR inducidas por la aplicación combinada de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.	136
Figura 4.6. Producción de enzimas con actividad de peroxidasas y fitoalexinas inducida por la aplicación combinada de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en raíces de nochebuena.....	137
Figura 4.7. Evaluación de la inducción de resistencia sistémica por la aplicación combinada de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en hojas de nochebuena.	138
Figura 5.1 Modelo propuesto para la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en <i>Euphorbia pulcherrima</i>	150
Figura 5.2 Modelo propuesto de la protección contra <i>Phytophthora drechsleri</i> inducida por quitosano en <i>Euphorbia pulcherrima</i>	152
Figura 5.3 Modelo propuesto de la protección contra <i>Phytophthora drechsleri</i> inducida por <i>Trichoderma harzianum</i> en <i>Euphorbia pulcherrima</i>	154
Figura 5.4 Modelo propuesto de la interacción de quitosano y <i>Trichoderma harzianum</i> en la infección de <i>Phytophthora drechsleri</i> en <i>Euphorbia pulcherrima</i>	156

RESUMEN

La enfermedad de la marchitez y de la pudrición de raíz y tallo en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) se ha asociado al oomiceto *Phytophthora drechsleri*. Sin embargo, el conocimiento de esta interacción ha sido limitado a la descripción de síntomas y la búsqueda del agente causal y su control empleando agroquímicos. Con el surgimiento de nuevas estrategias y productos de control, que incluyen la inducción de mecanismos de defensa vegetal, se hace necesario conocer cuáles son estos mecanismos de defensa en nochebuena y la estrategia de ataque de *P. drechsleri*. En este sentido, una alternativa para el control de *Phytophthora* es el uso de microorganismos antagonistas como *Trichoderma harzianum* y de inductores de mecanismos de defensa vegetal como el quitosano. El uso combinado de los productos de control biológico se considera como potenciador de su efecto protector. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se conoce cuál es la interacción entre ellos. En este trabajo se caracterizó la interacción *E. pulcherrima* – *P. drechsleri*., evaluando la respuesta de nochebuena a la infección por el oomiceto. Además, se evaluó el efecto de la aplicación individual y combinada de *T. harzianum* y quitosano en la protección y respuesta de defensa contra la infección de *P. drechsleri* en nochebuena. Para esto se evaluaron los mecanismos de defensa de inducción temprana como el fortalecimiento de la pared celular y la respuesta hipersensible (HR), así como también la inducción de mecanismos de defensa relacionados con la resistencia como la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) y fitoalexinas. En cuanto a la interacción planta-patógeno, se encontró que aun cuando es una interacción compatible, la respuesta observada en la infección, indicó que el patógeno era detectado y este suprimía la respuesta de defensa de la planta relacionada con la resistencia. En cuanto a la respuesta de defensa inducida por aplicación individual y combinada de *T. harzianum* y quitosano, se encontró que la combinación tuvo un efecto negativo sobre la protección a la infección de *P. drechsleri*, aun cuando algunos mecanismos de defensa se vieron potenciados como la producción de calosa, lignina, ROS y PCD. Los mecanismos que se relacionan con la resistencia no fueron inducidos con la combinación, pero si en la aplicación individual de *Trichoderma* y quitosano.

ABSTRACT

The disease of wilt and root rot on poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) has been associated with the oomycete *Phytophthora drechsleri*. However, the knowledge of this interaction has been limited to the description of symptoms, search of the causative agent and its control using agrochemicals. With the emergence of new strategies and products of control, which include the induction of plant defense mechanisms, this is a necessary step to learn about the mechanisms of plant defense induced on poinsettia and the strategies of attack used by the pathogen. In this sense, an alternative for the control of *Phytophthora* is the use of antagonist microorganisms such as *Trichoderma harzianum* and elicitors of plant defense mechanisms such as chitosan. The combined use of different products for biological control considers the increase of their protective effects. However, in many cases there is no known interaction between them. In this work were characterized the interaction *E. pulcherrima* - *P. drechsleri*, evaluating the response from poinsettia to infection by the oomycete. In addition, the effect of the individual and combined application of *T. harzianum* and chitosan in the protection and defense response against infection of *P. drechsleri* on poinsettia were evaluated. To obtain this, the defense mechanisms that induce early as the strengthening of the cell wall and the hypersensitive response (HR), as well as the induction of defense mechanisms related to the resistance as the production of pathogenesis-related proteins (PR proteins) and phytoalexins were evaluated. In terms of interaction plant-pathogen, the results showed a compatible interaction even when the response observed in the infection indicated that the pathogen was detected although it abolished the defense response related to the resistance. On the other hand, in terms of the defense response induced by individual application and combination of *T. harzianum* and chitosan, the results showed that the combination had a negative effect on the protection of the infection of *P. drechsleri*, even when some defense mechanisms were enhanced as the production of callose, lignin, ROS and PCD. The mechanisms that are related to the resistance were not induced with the combination, but if in the individual application of *Trichoderma* and chitosan

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de nochebuena en México es un cultivo que se produce en grandes cantidades en época navideña y que durante esta época tiene un aporte económico importante para el país, se estima que la producción al año 2013 fue de 20.5 millones de plantas, con un valor comercial de alrededor de 720 millones de pesos (SAGARPA, 2013). Se ha reportado que año con año con el crecimiento de su popularidad en todo el mundo (Vanderhoff, 2008), se ha incrementado la demanda en el mercado lo que implica el aumento en su producción y potencial para convertirse en un cultivo extensivo e intensivo, lo que a su vez favorece la aparición de plagas y microorganismos fitopatógenos (FAO, 2012). Entre los principales problemas fitosanitarios que afectan el rendimiento y producción de este cultivo, se encuentran las enfermedades ocasionadas por hongos relacionados con la marchitez y pudrición de raíz como *Fusarium* y *Rhizoctonia* y oomicetos como *Pythium* y *Phytophthora* (Benson, 2002; Yoshimura, 1985). En este sentido, debido al grave problema que causan las diferentes especies patógenas de *Phytophthora* sp. sobre los diferentes cultivos, se han desarrollado técnicas para controlar las enfermedades que ocasionan. Entre las alternativas empleadas se encuentran el uso de variedades resistentes y de microorganismos de control biológico como algunas especies del género *Trichoderma* sp. (Fernández-Herrera et al, 2007). Otra opción que se ha estado explorando es el uso de inductores de mecanismos de defensa en plantas, sensibilizándolas para responder rápidamente al ataque de patógenos. Uno de estos inductores es el quitosano, utilizado como un efectivo protector de plantas contra diferentes fitopatógenos, incluyendo *Phytophthora* sp. (Lárez-Velásquez, 2008). Existen diferentes reportes de la efectividad del uso de *Trichoderma* o quitosano para el control de *Phytophthora* con resultados alentadores (Ezziyyani et al, 2004; Ezziyyani et al, 2007; Tapia et al, 2009). Sin embargo, existen pocos reportes en donde se combinen diferentes opciones de biocontrol, considerando que cuando se han realizado estas combinaciones la protección se ha visto potenciada (Sid et al, 2003). Partiendo de estos conocimientos se considera la combinación de *Trichoderma harzianum* y quitosano como un sistema integrado para la inhibición y reducción de la incidencia de la enfermedad causada por las cepas patógenas de *Phytophthora*, así como la inducción de mecanismos de defensa vegetal potenciados por la aplicación de la combinación. A partir,

de este conocimiento, en este estudio se evaluaron los mecanismos de defensa que fueron inducidos al aplicar una combinación a base quitosano y *T. harzianum* contra *Phytophthora drechsleri* en plantas de nochebuena.

CAPITULO I ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de nochebuena en México

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Wild.), en México es un cultivo que se produce en cantidades importantes en época navideña. En el México prehispánico los aztecas la cultivaban antes de la llegada de los españoles y la llamaban “cuetlaxóchitl”, que en náhuatl significa “flor de piel” o “flor de cuero”, por la apariencia de las brácteas. Debido a su color brillante, para los aztecas la flor era símbolo de pureza asociada a la sangre de los sacrificios que los indígenas ofrendaban al sol para renovar sus fuerzas. En México a finales de los años 90’s se convirtió en la planta ornamental más cultivada y vendida en México tanto que el ánimo festivo de cada fin de año no se puede concebir en muchos hogares sin que estuviera presente la flor de nochebuena adornando algún espacio (Pérez, 2011). La flor de nochebuena es originaria de México, específicamente del estado de Guerrero, estas plantas fueron introducidas por primera vez a Estados Unidos en 1825 por Joel Robert Poinsett, y quien le dio el nombre de poinsettia a la nochebuena. Aunque, la flor de nochebuena es originaria de México, las nochebuenas nativas no se cultivan en macetas ya que no poseen las características propias para ser cultivadas en ellas (Aldama-Rojas, 2011). La nochebuena, en nuestro país es un cultivo que en maceta se producen cantidades muy importantes durante la época de decembrina, a los productores que la cultivan les proporciona grandes ingresos por unidad de superficie, debido a la fuerte demanda y a los elevados precios que puede alcanzar en el mercado durante el periodo comprendido del 15 de noviembre al 15 de diciembre, es decir, en época de fiestas navideñas (Pineda-Pineda et al, 2005).

En México, el cultivo de la nochebuena se inició en la década de los años 70’s. Con la introducción de variedades mejoradas ha mostrado un incremento en los últimos años, se estima que la producción en 2013 fue de 20.5 millones de plantas, con un valor comercial de alrededor de 720 millones de pesos (SAGARPA, 2013). De acuerdo con la SAGARPA en el año 2013 se tiene una superficie cultivada de aproximadamente 300 hectáreas, la gran mayoría en invernadero y donde se cultivan más de 30 variedades; esta actividad genera aproximadamente 3, 200 empleos directos y alrededor de 9, 600 indirectos, principalmente

en cinco estados del centro del país. Los principales cultivadores de nochebuena son Morelos (34.5%), Michoacán (21.5%), Distrito Federal (más del 16.9%); Puebla (11.3%) y Jalisco, Estado de México y Oaxaca (15.7); en el Distrito Federal de los 2,500 productores de ornamentales que registra, alrededor del 50% se dedican a su cultivo (SAGARPA 2013). El total de la producción de nochebuena es para consumo nacional, un 90% de la producción y consumo es roja; el 5% son blancas o amarillas y el resto rosas, rosadas o marmoleadas. Como producto de la modificación genética a la flor, en el mercado se venden también moteadas, salpicadas en rojo y blanco (SAGARPA 2013). Por otra parte, uno de los principales países con mayor producción es Estados Unidos, con aproximadamente 50 millones de plantas al año, generando un aporte económico de más de 250 millones de dólares (USDA y Ecke, 2010). En este país se cultivan más de 100 diferentes variedades comerciales con una gran diversidad de tamaños, formas y colores (Texas A&M, 2008), en la actualidad las plantas de nochebuena se han convertido en el principal elemento para oficinas y negocios (Cambereto y López, 2011), siendo las más vendidas en este país y que año con año ha crecido su popularidad en todo el mundo (Vanderhoff, 2008). En este sentido en México, en los últimos años la demanda en el mercado de las plantas de nochebuena se ha incrementado y por tanto la producción en invernaderos y viveros, lo que ha llevado a que este cultivo presente un alto potencial para convertirse en un cultivo extensivo e intensivo. El uso generalizado que aumenta año con año se debe a la influencia ejercida por su popularidad en otros países como símbolo asociado a las fiestas decembrinas (The nochebuena company, 2012). Este potencial implica un mayor control de los factores productivos, con el aumento en la producción y productividad en espacios reducidos, que favorece la aparición de plagas y microorganismos fitopatógenos (FAO, 2012). Una manera de combatir este problema por los productores es la aplicación de insecticidas y fungicidas que llegan a causar enormes consecuencias sobre el medio ambiente y su salud. Dentro de las principales plagas que atacan al cultivo se encuentra la araña roja (*Tetranychus urticae*), mosquita blanca (*Bemisia argentifolii*) y Fungus gnat (*Sciaridae* sp.); otro problema fitosanitario son las enfermedades ocasionada por hongos relacionados con marchitez y pudrición de raíz como *Fusarium* o *Rhizoctonia* y oomicetos como *Pythium* y *Phytophthora*, convirtiéndose en

problemas potenciales y reales para el rendimiento y producción de estos cultivos (Benson, 2002; Yoshimura, 1985).

2.1.1 Clasificación taxonómica

Clasificación según la CONABIO (2010):

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Euphorbiales

Género: *Euphorbia*

Especie: *Euphorbia pulcherrima*

2.2 Problemas fitosanitarios en nochebuena

El cultivo de nochebuena se ha visto afectado por una serie de problemas fitosanitarios que incluyen plagas y enfermedades por fitopatógenos microbianos, además de un deficiente manejo nutrimental durante el desarrollo de las plantas (García Pérez, et al 2009). Las plagas que con mayor frecuencia atacan a la nochebuena según la Secretaria de Agricultura (2006) son:

- “Araña roja”. Son ácaros que se encuentran en el envés de las hojas y si no se está monitoreando frecuentemente se nota su presencia hasta que el daño ya está muy avanzado. Los daños se manifiestan con decoloraciones en el haz de las hojas.
- “Mosquita Blanca”. Tiene un desarrollo rápido ya que de huevecillo a adulto se requieren de cuatro a cinco semanas, la presencia de esta plaga en el cultivo puede

causar daño directo e indirecto como los daños ocasionados por la presencia de fumagina y llegan a transmitir virus.

- “Mosca negra” o “Fungus gnat”. Es un díptero que ataca en el estado de larva directamente a las raíces de la nochebuena en el proceso de enraizamiento.

Por otra parte, debido a las condiciones ambientales que se encuentra el cultivo de nochebuena, principalmente en invernadero, se favorece la proliferación de microorganismo fitopatógenos que causan graves enfermedades. La nochebuena es muy vulnerable a enfermedades de raíz durante todas las etapas de su desarrollo, estas se pueden presentar en el proceso de enraizamiento o cuando están listas para las ventas, algunas de estas enfermedades llegan a causar daños sobre las flores causando pérdidas en la producción (Hartman y Kaiser, 2010). Las principales enfermedades reportadas asociadas a la nochebuena

(García Pérez, et al 2009; Hartman y Kaiser, 2010) son:

- “Mancha gris” (*Botrytis cinerea*). Es el más importante patógeno en la producción de plantas de nochebuena durante todas sus etapas de desarrollo. Aparece en condiciones de humedad alta y comienza principalmente en los bordes de las hojas y se extienden hasta cubrir la mayor parte del follaje y tallos, los tejidos dañados se necrosan rápidamente y se tornan de color oscuro. Este hongo puede aparecer en cualquier parte de la planta que se encuentra por encima del suelo y se caracteriza por producir conidios y conidióforos en grandes cantidades, sobre el tejido necrosado, lo cual le da una apariencia aterciopelada de color gris pardo.
- “Cenicilla” (*Oidium* sp). Es un hongo parásito obligado y por lo tanto requiere de una planta hospedante viva para completar su ciclo de vida, no mata a su planta pero causa daño sobre el aspecto de la planta ya que aparecen pequeñas manchas blancas en el haz de las hojas y brácteas. La cenicilla se puede presentar en cualquier etapa de desarrollo pero especialmente al inicio de la floración y la pigmentación.
- “Mancha de la hoja” (*Alternaria euphorbiicola*). Los síntomas son lesiones angulares, circulares o irregulares, rodeadas de un halo clorótico; las hojas infectadas pueden volverse cloróticas y caer prematuramente. En el tallo las lesiones

son alargadas y hundidas de color marrón con bordes negros que se encuentran alrededor del tallo.

- “Moho de la hoja” (*Cladosporium fulvum*). Es una enfermedad que se desarrolla en condiciones de humedad alta con temperaturas altas. Generalmente las hojas son las afectadas por esta enfermedad, cuyos síntomas inician con manchas de coloración verde pálido y finalizan de un color grisáceo, se observan en primer lugar en la superficie del haz de la hoja y necrosan el tejido.
- “Pudrición negra de la raíz” (*Thielaviopsis basicola*). Las raíces infectadas por este hongo se vuelven blandas y de una coloración oscura, que contrastan fuertemente con las partes blancas y saludables de la raíz; al avanzar la enfermedad finalmente, todo el sistema radicular se ennegrece. Debido a esto, hay una disminución en el transporte de nutrimentos y del crecimiento de las plantas provocando marchitamiento, las hojas se vuelven amarillas y caen prematuramente.
- “Pudrición por *Rhizoctonia*” (*Rhizoctonia solani*). Causa pudrición de las plántulas, pudrición de la raíz, podredumbre de la corona y marchitamiento foliar y del tallo. El desarrollo de la enfermedad es lento y la planta no muere sino hasta después de 20 o 40 días después del trasplante. El hongo ataca el tallo y lo hace blando, el cual es incapaz de sostener a la plántula y muere, en plantas maduras se invaden los tejidos corticales externos en los que produce lesiones grandes y de color pardo-rojizo.
- “Pudrición de la raíz” (*Fusarium* spp). El daño por pudrición de la raíz se observa como un necrosamiento en las raíces, las cuales se tornan oscuras y la planta se empieza a marchitar hasta que muere. Los síntomas pueden aparecer en cualquier etapa de desarrollo, desde que se colocan en la maceta definitiva, hasta la etapa de pigmentación; durante este periodo se puede ver que el follaje de las plantas se marchita, se caen las hojas y la planta muere. Las hojas de las plantas infectadas o de partes de plantas infectadas pierden turgencia, se debilitan, adquieren una tonalidad que va del verde claro al amarillo verdoso.
- “Pudrición de raíz por *Pythium*” (*Pythium* sp). Causa una decoloración y degeneración de las raicillas absorbentes. El haz vascular se vuelve estrecho impidiendo el paso de agua y nutrimentos, se presenta un cancro de color marrón y

podrición de las raíces. La pérdida de la función de raíz en las plantas produce un amarillamiento y marchitamiento que puede llevar hasta la muerte.

- “Podrición de raíz por *Phytophthora*” (*Phytophthora* sp). Causa manchas necróticas, cancro del tallo y pudrición de la raíz además de marchitamiento y muerte de la planta. También se describe como blanqueamiento de la nochebuena. Además que comparten los síntomas con la pudrición de raíz y marchitamiento asociado con otros hongos y oomicetos.

2.3 Marchitez y pudrición de la raíz asociada a *Phytophthora* sp.

Para el cultivo de nochebuena existen muy pocos reportes de la interacción entre la planta y los patógenos asociados a la marchitez y pudrición de la raíz. Aun cuando se relacionan a diferentes hongos y oomicetos con esta enfermedad y síntomas, destacando *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica* y *Phytophthora drechsleri* (Yoshimura et al, 1985; Daughtrey, 1995), aunque también se han descrito otras especies de *Phytophthora* sp., que pueden reproducir síntomas similares (Orlikowski y Ptaszek, 2013). Los estudios relacionados con esta enfermedad se concentran en la descripción de los síntomas de la marchitez y pudrición de la raíz en plantas de nochebuena y la búsqueda de su control. Yoshimura y colaboradores (1985) describen los síntomas del denominado tizón de nochebuena (poinsettia blight). Ellos describen que los síntomas desarrollados por dos especies de *Phytophthora* (*P. nicotianae* var. *parasítica* y *P. drechsleri*) son idénticos y se presentan como lesiones negras que se expanden rápidamente en una pudrición. Las lesiones son diseminadas de los tallos a las brácteas lo que degenera en síntomas de marchitamiento tanto en las hojas, brácteas como en el resto de la planta. Por otra parte, Engelhard y Ploetz (1979) describen los síntomas de la enfermedad en plantas infectadas por *Phytophthora parasitica*, que ataca las hojas, tallos, brácteas y raíces en plantas de nochebuena en invernadero y en instalaciones al aire libre. Ellos describen que *P. parasitica* ocasionó pérdidas del 20% de la plantación, con la presencia de síntomas que fueron manchas necróticas, y que bajo condiciones favorables de humedad y temperatura las plantas se marchitaron y murieron. Cuando las condiciones no son tan favorables, los síntomas se

relacionan con la formación de un cancro del tallo y pudrición de la raíz ocasionando daños graves a la planta. Otros estudios, más que describir los síntomas de la enfermedad, se relacionan con el control de estos patógenos con el uso de diferentes fungicidas y antibióticos (Lamour et al, 2003; Woodworth y Hausbeck, 2006).

2.3.1 Características del genero *Phytophthora* sp. - Clasificación taxonómica

El género *Phytophthora* proviene del griego *Phyton*: planta y *phthora*: destructor (Echemendia-Medina, 2011). A pesar de las superficiales similitudes morfológicas con hongos, pertenece al grupo de oomicetos formando un grupo distinto de organismos eucarióticos que están más estrechamente relacionados con las algas pardas y diatomeas. El género *Phytophthora* puede reproducirse por la generación de esporas asexuales, por la formación de clamidosporas y esporangios, que contienen las zoosporas, y de manera sexual mediante la formación de oosporas, características que contribuyen en gran medida a su éxito patogénico (Howard y Blanco, 2005). Todas las especies del género poseen un micelio hialino, continuo de paredes paralelas o irregulares, donde pueden observarse abundantes gotas oleaginosas (Echemendia-Medina, 2011). Por otra parte, las oosporas son la fuente de inóculo primario y sobreviven mas de dos años en ausencia del hospedante, mientras que el micelio es la fuente secundaria de inóculo y se ha observado que este no sobrevive mas de 7 días en suelo seco. Este patógeno vive como saprófito sobre restos de materia orgánica y con humedad constante produce esporangios y zoosporas que son distribuidos por el agua. Las zoosporas son consideradas propágulos mas efectivos, ya que nadan o simplemente son arrastradas por la corriente de agua e infectan las raíces de plantas susceptibles al entrar en contacto con ellas. La infección se puede dar por las heridas o lenticelas. Estas zoosporas después de un determinado tiempo y de acuerdo con las condiciones del medio ambiente, se enquistan y absorben sus flagelos; inmediatamente después emiten un tubo germinativo que penetra los tejidos de la planta por medio de apresorios.

Otra característica de este oomiceto es la formación de más micelio y zoosporas durante los climas húmedos y moderadamente fríos, característica que puede llevar la enfermedad a

otras plantas (Santos-Juárez, 2010; Howard y Blanco, 2005; Agrios, 2005). Por otra parte, cuando los climas son secos, cálidos o incluso demasiado fríos, puede sobrevivir en forma de oosporas o clamidosporas y cuando el suelo se encuentra húmedo y la temperatura es favorable, una vez más se inicia la nueva infección (Agrios, 2005). Por lo tanto, la lluvia y el mal drenaje favorecen la infección presentándose la enfermedad después del trasplante. El síntoma de marchitamiento se debe a una secreción de toxinas del patógeno y el taponamiento de los vasos conductores (Santos-Juárez, 2010; Howard y Blanco, 2005; Agrios, 2005). Las plantas que presentan la infección por *Phytophthora* sp., con frecuencia empiezan a mostrar los síntomas debidos a la sequía y deficiencia nutricional, se debilitan y se hacen susceptibles al ataque por otros patógenos o muchas otras causas que erráticamente se consideran como la causa de la muerte de las plantas (Fig. 1.1) (Agrios, 2005).

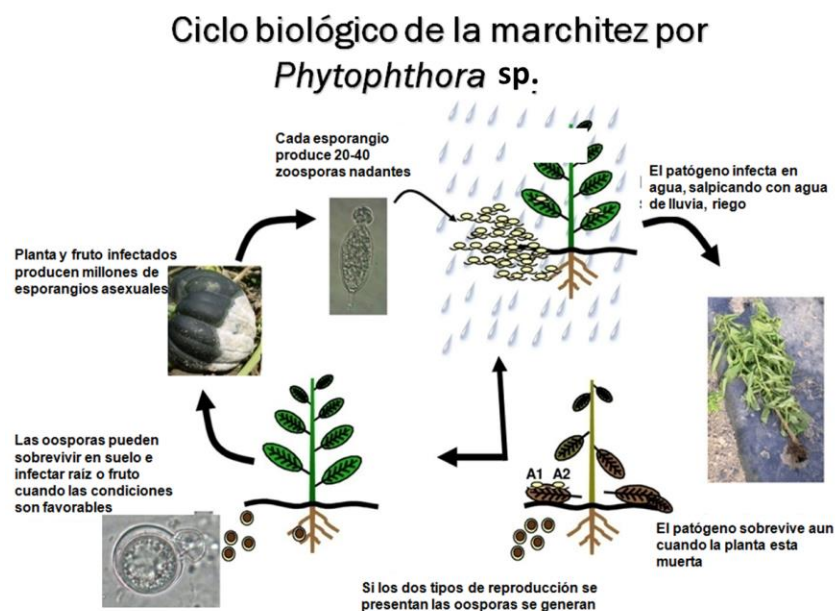


Figura 1.1 Ciclo biológico de *Phytophthora* sp. (Imagen modificada Medina-Fuentes, 2013).

Los miembros del género *Phytophthora* se encuentran entre las amenazas más graves para la agricultura y la producción de alimentos, causando enfermedades devastadoras en cientos de plantas hospederas (Santos-Juárez, 2010). Las diferentes especies de *Phytophthora* causan varias enfermedades en distintos tipos de plantas, desde plántulas de hortalizas

anuales o de ornato hasta árboles forestales y frutales completamente desarrollados y estas básicamente afectan a los órganos de la planta que se localizan en el suelo o que se encuentran en contacto con él, como es el caso de las raíces, tallos cortos, tubérculos, semillas y frutos carnosos depositados sobre el suelo (Agrios, 2005). Estas especies viven y se reproducen principalmente en el suelo y por lo común atacan las plantas susceptibles a nivel de la superficie del suelo o por debajo de ella. Tal es el caso de *Phytophthora capsici* y de *Phytophthora drechsleri* que ocasionan la marchitez en chile y nochebuena respectivamente (Agrios, 2005; Engelhard y Ploetz, 1979).

La clasificación para *Phytophthora drechsleri* es la siguiente según Lamour *et al.* (2012):

Dominio: Eukaryota

Reino: Chromista

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Peronosporaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora drechsleri*

2.4 Control de *Phytophthora* sp.

El control de *Phytophthora* sp. ha sido principalmente a través del uso de agroquímicos, al considerarse una de las medidas más efectivas y rápidas, aunque su principal ventaja es su uso fácil y ampliamente arraigado en el productor. En general, se ha reportado que este tipo de control tiene una baja efectividad, además de su elevado costo y en muchas ocasiones limitada a nivel experimental. Se han probado aplicaciones con cloropicrina, cambios de pH por adición de sulfato, seguido por aplicaciones de cal y de urea, con lo que se ha logrado cierta reducción de la enfermedad. Así mismo, se registró que hay cierto grado de control con la aplicación de cal hidratada al suelo, también se ha encontrado que los fungicidas como Captan, Maneb, Mancozeb y Thiram, mostraron efecto biocida a

diferentes concentraciones, pero también presentaron fitotoxicidad (Chen, 2006; Rinaudo, 2006).

El desarrollo de nuevos agroquímicos es una constante en la agricultura, en la actualidad y buscando la prevención en cuanto al desarrollo de resistencia por parte del patógeno, se desarrollan nuevos productos que incluyen combinaciones de compuestos activos dirigidos a atacar con diferentes mecanismos de acción al patógeno. Buscando con esto, prevenir el desarrollo de resistencia, que se ha encontrado con prevalencia del uso de un solo compuesto activo. Entre estos productos se encuentra el denominado como INFINITO® de Bayer CropScience que incluye como compuestos activos en su formulación al fluopicolide y el propamocarb HCl. Para este fungicida se reporta su mecanismo de acción a nivel de la mitosis. El fluopicolide tiene efecto sobre las proteínas tipo espectrina, las cuales mantienen la estabilidad de la membrana jugando un papel muy importante al conservar en óptimo estado el citoesqueleto del patógeno. Este compuesto induce una rápida distribución de estas proteínas de la membrana al citoplasma en hifas y zoosporas del oomiceto. Este nuevo sitio de acción es diferente al de cymoxanil, dimetomorf, fenamidona, fluazinam, cyazofamid, zoxium y no tiene resistencia cruzada con los fungicidas comúnmente utilizados como metalaxy/mefenoxam ni con estrobilurinas. Es uno de los pocos pesticidas dirigidos al control de *Phytophthora* sp. Su uso se recomienda contra el tratamiento del tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans*), aunque también existen reportes en donde se ha comprobado su efectividad en el control del patógeno (*P. infestans*) en tomate (Stepanovic et al, 2011). En aplicaciones a una dosis de 1.2 y 1.6 L·ha⁻¹ demostró una reducción significativa de la enfermedad en evaluaciones en campo.

El uso de agroquímicos ha sido la constante. Sin embargo, cada vez se muestran mayores evidencias de su uso en gran medida desproporcionado, que puede llegar a acarrear graves daños al medio ambiente, así como a la salud humana. Por este motivo se hace necesario el desarrollo de nuevas opciones de bajo impacto ambiental que permitan erradicar el uso de los agroquímicos, o generar opciones que permitan su rotación y combinación en circunstancias más controladas. Entre estas opciones se considera al control biológico como aquella que presenta mayores ventajas con respecto a los agroquímicos.

2.5 Control biológico

El control biológico ha sido definido por Baker y Cook, citados por Agrios (2005), como la reducción de la densidad del inóculo o actividad productora de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o latente, por uno o más organismos antagónicos, en forma natural o por manejo del habitante, hospedero o de los propios microorganismos (Ahmad 1987; Baker, 1984; Chet, 1980 y Strashnov, 1985). 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 hiperparásito o micoparásitos (Ahmad, 1987; Baker, 1984; Chet, 1980 y Strashnov, 1985). En el control biológico, se utilizan las esporas o los filtrados de cultivos que actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de sus hospederos o por micoparasitismo matando las estructuras invadidas directamente, reduciendo de esta manera la concentración de esporas o la densidad poblacional, y por ende el ataque de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica (Elad y Katan, 1980). El control biológico ofrece ventajas por su bajo costo, no contamina el ambiente, y no presenta problemas de residuos. Anteriormente el control biológico de enfermedades vegetales consideraba el uso exclusivo de organismos vivos para contrarrestar a los organismos patógenos, sin embargo, esta definición ha sido extendida a derivados de organismos e incluso a compuestos químicos que pueden mimetizar o disparar respuestas en la planta. Aunque la validación de estos productos en su mayoría ha sido bajo condiciones controladas, falta la transferencia a nivel de campo, para diferentes cultivos de importancia. Este conocimiento ha provocado una evolución del concepto del control biológico o manejo orgánico a un término mucho más adecuado como es un manejo de cultivo de bajo impacto ambiental. El control biológico actual puede clasificarse de acuerdo a su mecanismo de acción en 3 tipos principales (Sid Ahmed et al, 2000; Castro-Rocha, 2012):

- 1.- Microorganismos antagonistas.
- 2.- Fortalecedores o precursores de la actividad antagónica u organismos benéficos.
- 3.-Inductores de mecanismos de defensa vegetal.

2.6 Microorganismos antagonistas

Los microorganismos antagonistas de control biológico o biocontrol (MOB) pueden ser tan diversos como hongos, oomicetos, estreptomicetos, bacterias y virus, dependiendo del patógeno a combatir su efectividad reportada ha sido mayor o menor, destacando de manera importante los hongos (Cook y Baker, 1983). El principal representante de este tipos de microorganismos lo encontramos con diferentes especies del género *Trichoderma* sp. ya que posee la capacidad para colonizar las raíces de las plantas, además de que ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidos por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al, 1982).

2.6.1 *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum es un hongo antagonista de patógenos vegetales, y se encuentra presente en la mayoría de los suelos. Su crecimiento se ve favorecido por la presencia de raíces de plantas, a las cuales coloniza rápidamente. Algunas cepas, son capaces de colonizar y crecer en las raíces a medida que éstas se desarrollan. Su aplicación, una vez formulado el producto es fácil, pues puede añadirse directamente a las semillas o al suelo, semilleros, trasplantes, bandejas y plantas de maceta, empleando cualquier método convencional. *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. *cubense*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* spp, *Pythium* spp, *Alternaria* spp, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora* spp, entre otros (Lorenzo, 2001). En la acción biocontroladora de *Trichoderma* 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).

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* presenta otros mecanismos, cuya acción biorreguladora es de forma indirecta (Chet et al, 1997, Sid Ahmed et al, 2000, Sid Ahmed et al, 2003). Entre estos se pueden mencionar los que “elicitan” o 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 inglés), 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. La inducción de estos mecanismos ha mostrado un efecto protector contra diversos hongos fitopatógenos en muchos cultivos, incluyendo al oomiceto *Phytophthora* (Elad y Baker, 1985; Elad y Chet 1987; Chet e Ibar, 1994; Belanger et al, 1995; Serrano y Galindo, 2007).

Entre los estudios que validan la efectividad de *Trichoderma* como inductor de los mecanismos de defensa vegetal se encuentra el estudio realizado por Sid-Ahmed y colaboradores (1999). En este estudio se evaluó la capacidad de *T. harzianum* para controlar la podredumbre de la raíz del pimiento (*Capsicum annuum*) causadas por *P. capsici*, a través de la evaluación *in vitro* e *in vivo* de las interacciones entre *Trichoderma* y *Phytophthora*. Los resultados mostraron que tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*, *P. capsici* fue inhibida por *T. harzianum*. Se encontró que el mecanismo por el cual *Trichoderma* protege a la planta, fue por la inducción de sus mecanismos de defensa vegetal. Otro estudio realizado por Ezziyani y colaboradores (2004), reportó que el control biológico en pimiento ejercido por *T. harzianum* sobre *P. capsici*, se relaciona con el aumento en los niveles de enzimas hidrolíticas β -1,3- glucanasas. Otro estudio aunque no relacionado con *Phytophthora*, fue el de El-Katatny y colaboradores (2001), en donde evaluaron la actividad *in vitro* de quitinasas y β -1,3-glucanasas en el control del hongo *Sclerotium rolfii*. Ellos evaluaron 24 aislados que fueron examinados bajo diversas condiciones de cultivo; encontrando que la producción de estas enzimas es significativamente influenciada por la

fuelle de carbono incorporado en el medio y estimulada por un pH ácido de 5.5 a 6.0, y esto se relacionó con una inhibición significativa del crecimiento de *S. rolfsii*. Además del efecto protector de *Trichoderma* también se ha reportado un efecto benéfico en el crecimiento de la planta. En este sentido está el estudio de Guigón y González (2003), donde aislaron cepas de *Trichoderma* spp. de chile jalapeño, las cuales mostraron actividad micoparasitaria *in vitro*, y en campo se observó una reducción en la severidad del marchitamiento de plantas de chile causada por *P. capsici*, además de observar una promoción en el crecimiento y desarrollo de las plantas de chile.

2.7. Fortalecedores o precursores de la actividad antagónica u organismos benéficos.

Una nueva alternativa que se está explorando en el control biológico es el fortalecimiento de la microflora del suelo, preferentemente de microorganismos benéficos y antagonistas empleando compuestos que induzcan y favorezcan la reproducción de estos microorganismos, que se encuentran de manera natural en el suelo. Este tipo de productos han sido utilizados en su mayoría de manera empírica, y tiene sus orígenes en la aplicación de fertilizantes y materia orgánica en forma de desechos por ejemplo de “cascaras” de camarón o material vegetal. Destaca de manera importante el uso de la quitina o material que contiene este tipo de polímero para fortalecer la prevalencia de microorganismos antagonistas. La quitina es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos, del resistente exoesqueleto de los artrópodos (arácnidos, crustáceos e insectos) y algunos órganos de otros animales. La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina). Éstas están unidas entre sí con enlaces β -1,4, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa. La quitina se ha utilizado en combinación con otros microorganismos o productos de control biológico para combatir patógenos que causan serias enfermedades en la agricultura. La quitina ha sido utilizada como potenciador del efecto antagónico de microorganismos del suelo, además de aumentar el inóculo microbiano de organismos antagonistas. Actualmente en el mercado se encuentran disponibles algunos productos que incluyen a la quitina como su principio activo. Sin embargo, en México los productos

disponibles se limitan a la bioquitina o HYT C® de la empresa Agrinos. La presentación de este producto es como quitina micronizada, es decir quitina en polvo que combinada con ciertos minerales pueden formar una suspensión en agua. La recomendación de su uso es combinarlo con microorganismos quitinolíticos y dejarlos en fermentación. Esta combinación es aplicada a la base de la planta, como un biofertilizante. A partir de este manejo se considera que los microorganismos inducen la producción de quitosano que luego servirá como inductor de mecanismos de defensa vegetal, además de la preparación de quitina y microorganismos benéficos para la planta. Sin embargo, también se ha visto que la aplicación directa del producto en combinación con microorganismos antagonistas mantiene sus propiedades como potenciadores de la actividad antagónica o de biocontrol. Se ha evaluado que combinándolo con *Trichoderma* y *Bacillus subtilis* se aprovecha como protector de plantas (Agrinos, 2014).

2.8 Inductores de defensa vegetal

El uso de microorganismos ya sea parasitarios, depredadores o antagonistas ha sido la principal premisa del control biológico. Sin embargo, actualmente se han generado estudios de la interacción planta-patógeno, que han permitido elucidar los mecanismos de patogénesis de una gran cantidad de fitopatógenos, así como los mecanismos de defensa vegetal que utiliza la planta para contrarrestar a los patógenos, con lo cual el control biológico se ha visto fortalecido con nuevos compuestos y moléculas que son derivados de los fitopatógenos, microorganismos de control biológico, o incluso moléculas señal de la propia planta. Entre estas moléculas destacan los polímeros como la quitina y su derivado el quitosano, que en la actualidad por sus propiedades como inductores de mecanismos de defensa vegetal, además de su inocuidad para la salud humana y el medio ambiente, han surgido como fuertes candidatos para sustituir de manera efectiva productos químicos tóxicos y contaminantes. Los inductores de mecanismos de defensa vegetal que presentan un efecto protector en las plantas equivalentes a “vacunas”, al provocar un efecto de “encendido” o “priming” en la planta, que la prepara de manera efectiva contra el ataque de plagas y enfermedades utilizando sus propios mecanismos de defensa. En este sentido

podemos encontrar derivados de microorganismos o plantas incluyendo metabolitos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas y oligosacáridos, así como derivados químicos que presenta una toxicidad baja o nula.

2.8.1 Quitosano

El quitosano, también llamado quitosana, quitosan o chitosán, es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). El quitosano se produce comercialmente mediante la desacetilación de la quitina, que es un elemento estructural en el exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, gambas, camarones, jaibas, langostas, etc). El quitosano se emplea principalmente como un complemento en el crecimiento de las plantas, debido a sus propiedades como sustancia que permite promover la defensa de las plantas contra infecciones provocadas por hongos. La actividad fungicida del quitosano se ha estudiado, tanto *in vitro* (El-Ghaouth et al, 1992) como *in vivo* (Li y Yu, 2001; Yu *et al.*, 2007). El quitosano inhibe a una multitud de especies de hongos, exceptuando, o siendo menos efectivo con aquellas que lo poseen en sus paredes celulares (Roller y Covill, 1999; Allan y Hardwiger, 1979).

En la actualidad el uso del quitosano y sus derivados ha sido una nueva alternativa al promover la inducción de mecanismos de defensa vegetal contra diferentes fitopatógenos, incluyendo *Phytophthora* sp., sensibilizándolas para responder más rápidamente a su ataque. El quitosano tiene otra propiedad como un agente antimicrobiano, al inhibir el crecimiento de hongos, bacterias y virus fitopatógenos. Los mecanismos de defensa que el quitosano activa es la síntesis de lignina y calosa, la inducción de la fenilalanina amonio liasa (PAL), biosíntesis de fitoalexinas, producción de inhibidores de proteasas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) como son: quitinasas, glucanasas, peroxidasas (POD) y quitosanasas (Rodríguez-Pedroso, 2009). Los trabajos que permiten elucidar los mecanismos de defensa inducidos por el quitosano, incluyen el realizado por Awadalla y Mahmoud (2005) que estudiaron el mecanismo de resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* inducida por algunos derivados de quitosano en plantas de algodón

susceptibles. Las semillas fueron tratadas con quitosano y posteriormente se realizó una inoculación con cinco derivados de quitosano; todos los tratamientos reprimieron el crecimiento del micelio del patógeno, además de un incremento en la producción de fitoalexinas principalmente en las raíces. Otro estudio fue el realizado por Falcón y colaboradores (2002), utilizaron al quitosano y su hidrolizado enzimático en plantas de tabaco, donde se determinó la capacidad para inducir marcadores de resistencia. Para esto se evaluó la actividad de la quitinasa, glucanasa y PAL contra *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Se mostró una inducción de la quitinasa y glucanasa por quitosano, en el caso del hidrolizado enzimático hubo una inducción de PAL y β 1-3-glucanasa. El quitosano es un compuesto natural que se ha observado que presenta un importante potencial para inducir una serie de reacciones de defensa. Por lo que, representa una buena alternativa en la sustitución de una amplia gama de plaguicidas de alta persistencia promoviendo de esta forma el uso de compuestos totalmente biodegradables y no tóxicos para los seres humanos y los vertebrados (Porrás et al, 2009; Lárez-Velásquez, 2008).

2.9 Estudios de la interacción entre diferentes estrategias de control biológico

El control biológico y los productos comerciales derivados de él, han estado incluyéndose de manera paulatina y creciente en el manejo de prácticamente todo el cultivo. El uso generalizado de estos productos y el aumento en las alternativas de ellos, significan una ventaja importante para ser incluidos en el cada vez más popular Manejo Integrado del Cultivo. Sin embargo, este mismo aumento en la popularidad de su uso, provoca ciertos efectos adversos que se ven acrecentados por la falta del conocimiento en su manejo adecuado. Esto puede atribuirse a que la mayoría de los usuarios, lo consideran como un producto equivalente a un agroquímico, sobre todo, porque muchos de estos productos tienen una presentación prácticamente idéntica a un agroquímico. La mayoría de los agroquímicos utilizados en el control de plagas y enfermedades tienen un efecto biocida, es decir, su efecto va dirigido a matar a la plaga o patógeno al cual se dirige. En este sentido, los cuidados que deben considerarse en su combinación implica el conocimiento de la composición y propiedades químicas, además de su solubilidad (Cano, 2011; Madriz-

Ordeñana, 2002). En contraste, los productos de control biológico, presentan naturalezas diversas, así como diferentes mecanismos de acción. Entre estos productos se pueden encontrar desde microorganismos vivos, hasta derivados de ellos, incluyendo proteínas y polímeros. También se emplean productos de naturaleza química, que por las características de uso, dosis y toxicidad, caen dentro de los productos de bajo impacto ambiental, que incluyen a los productos de control biológico. Por estos motivos, el uso de estos productos, así como los cuidados en su almacenamiento, caducidad e interacciones que desarrolla con su combinación, implica un conocimiento nuevo que en la mayoría de las ocasiones, los usuarios no tienen.

La creciente validación de los productos de control biológico para diferentes cultivos ha permitido la inclusión de ellos en el manejo integrado. Sin embargo, la mayoría son evaluados de manera individual, sin considerar su interacción con otros productos similares, ya sean agroquímicos o biológicos. Esto representa una utopía, ya que de manera práctica los cultivos no se protegen contra una sola plaga o enfermedad, sino que se aplican diferentes productos contra toda la gama de plagas y enfermedades que pueden afectar al cultivo. A partir de esta premisa se consideran dos situaciones con respecto a la combinación de productos de control biológico:

1. Uso “voluntario”.
2. Uso “involuntario”.

2.9.1 Uso “voluntario” de las combinaciones- La búsqueda de potenciar su efecto protector

Actualmente el uso de productos de control biológico en combinación se ha observado de manera común en la práctica para combatir las plagas y enfermedades de los cultivos. Sin embargo, existen muy pocos estudios que exploran este tipo de interacciones tanto benéficas como negativas al combinar diferentes productos de control (Cruz-Ortega, 2012; Medina-Fuentes, 2013). Por otra parte, existen algunos estudios que han evaluado el uso combinado de algunos productos de control biológico buscando potenciar su efecto

protector, entre los que se incluyen inductores de defensa vegetal, microorganismos antagonistas y potenciadores de la actividad antagonista. Estos estudios siguen siendo encaminados a la protección de una sola plaga o enfermedad, pero presentan un gran potencial para conocer las interacciones que pueden darse entre estos productos. En la actualidad la interacción entre productos de control biológico puede significar un gran aporte a nivel agrícola, al disminuir el uso de compuestos químicos tóxicos que usualmente se utilizan. Desde el punto de vista económico, esto reduciría costos al estar explotando recursos ya existentes. Así también un impacto ecológico por un tratamiento de la enfermedad en forma natural y solamente se trabajaría con la manipulación e incremento de microorganismos antagonistas y no alteraríamos el ecosistema existente en la microflora de la raíz en las plantas.

Entre algunos ejemplos de investigaciones que buscan potenciar el efecto protector por combinaciones de productos biológicos, están aquellos en donde se busca potenciar el efecto de la actividad quitinolítica de los inóculos de *Trichoderma harzianum* con el enriquecimiento con quitina, estos estudios han sido realizados a nivel *in vitro* y bajo invernadero. Entre estos estudios, está el realizado por López-Mondéja y colaboradores (2012). Ellos evaluaron el control biológico de *F. oxysporum* en el cultivo de melón, utilizando tres tipos de enriquecimiento con residuos de quitina para *T. harzianum*. Este enriquecimiento fue derivado de tres fuentes diferentes de quitina o derivados de ella, siendo los tratamientos quitosano, polvo de cáscara de camarón y residuos de hongos. Dichos resultados mostraron que los tres tipos de enriquecimiento mejoraron el control de *F. oxysporum*, al activar genes que codifican para quitinasas, destacando el enriquecimiento con residuos de hongos. Además, estos enriquecimientos presentaron un efecto benéfico en las plantas que se vio reflejado en el crecimiento de las plántulas (longitud de la hoja, la longitud del tallo y peso seco). A partir de sus resultados se consideró que la adición de quitina a algún organismo de control biológico puede aumentar sus efectos biocontroladores o antagonistas. Por otra parte, Chittenden y Singh (2009) evaluaron *in vitro* la combinación de *T. harzianum* y quitosano para el control de los hongos “teñidores de la savia” del pino (“sapstain”) como son *Leptographium procerum* y *Sphaeropsis sapinea*. En este estudio se observó que la combinación del quitosano y *Trichoderma* provocan una reducción importante en el crecimiento y germinación de los hongos, donde

esta reducción fue mayor en comparación de usar quitosano o *Trichoderma* de manera individual. Partiendo de estos estudios, la combinación de algunos productos de control biológico con diferentes mecanismos de acción, representa una alternativa para fortalecer el efecto de estos productos con miras de aumentar su actividad protectora en los cultivos.

Sin embargo, también se han encontrado estudios que muestran evidencias que el uso combinado de productos de control biológico no siempre presentan efectos benéficos. Entre estos estudios se encuentra el realizado por Cruz-Ortega (2012). En este trabajo se evaluó la interacción *in vitro* del quitosano sobre microorganismos de control biológico bajo condiciones controladas y su efecto en la actividad protectora contra *Phytophthora capsici* cuando se combinan con el quitosano. Sus resultados mostraron que a concentraciones altas e intermedias de quitosano en bacterias inhibe completamente su crecimiento, incluyendo aquellas utilizadas como biocontroladoras como *Bacillus subtilis*. En el caso de los hongos, su efecto fue variable presentándose una alta susceptibilidad en los oomicetos evaluados y una mayor tolerancia en los hongos de control biológico. En cuanto a la evaluación de la protección en planta, los resultados fueron contrastantes aunque se observó una tendencia negativa sobre el efecto protector de los microorganismos.

Otro estudio en esta misma línea lo encontramos en el realizado por Medina-Fuentes (2013), En este estudio se evaluó la actividad protectora contra *P. capsici* de la aplicación combinada de tres productos: *Trichoderma harzianum*, quitosano y quitina, con respecto a la aplicación individual en plántulas de chile. Sus resultados mostraron que la combinación de *Trichoderma* y quitina presentó la mejor actividad protectora, considerando su aplicación previa. Mientras que las combinaciones de quitosano con *Trichoderma* en muchas combinaciones presentaron un efecto negativo en la protección contra *P. capsici*.

2.9.2 Uso “involuntario”- La inclusión en el Manejo Integrado del cultivo

Por otra parte, en la práctica el uso combinado de productos de control de plagas y enfermedades en campo es muy común, tal es la premisa del Manejo Integrado de Plagas y enfermedades (MIPE), que es la utilización de todos los recursos necesarios, por medio de procedimientos operativos estandarizados, para minimizar los peligros ocasionados por la

presencia de plagas y enfermedades. El Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades es una forma de mantener los huertos de manera que el daño de enfermedades y plagas está bajo el nivel económicamente aceptable (MINSA et al, 2010). En este sentido, el MIPE es una combinación de varias medidas de control de enfermedades y plagas. En la agricultura actual depende del uso de los productos químicos ya que tienen un efecto inmediato sin mucha mano de obra. Sin embargo, los productos químicos tienen desventajas ya que afectan la salud y al medio ambiente. En el manejo integrado de plagas las formas de control utilizadas son: control químico, control mecánico, control biológico, control del cultivo y otras maneras como vacuna o antibiótico (MINSA et al, 2010). En el MIPE se busca privilegiar el uso de un manejo de bajo impacto ambiental, por lo cual se prefiere el uso de productos biológicos para el control de plagas y enfermedades. En este sentido, se ha desarrollado investigación para la búsqueda de las interacciones entre los agroquímicos y los productos de control biológico, que en mayor medida está dado por el uso de los microorganismos antagonistas. En este sentido se conocen muchas de las interacciones negativas entre *Trichoderma* con diferentes fungicidas comúnmente utilizados (Khan y Shahzad, 2007; Chaparro et al, 2011), y para otras interacciones. Sin embargo, en el sentido de las interacciones entre los productos de control biológico, ha habido pocos reportes al respecto de la interacción en invernadero o campo. En este sentido ha habido algunos reportes en donde se describen algunas interacciones entre algunos microorganismos como *Trichoderma*, micorrizas y bacterias benéficas o de biocontrol, aunque aún faltan muchos más estudios al respecto (Cano, 2011). Esto es porque actualmente no solo son los microorganismos antagonistas los únicos utilizados en el MIPE o incluso en el manejo nutricional de los cultivos, ya se incluyen inductores de defensa vegetal, que pueden llegar a interactuar de manera negativa o positiva en el efecto que se dé entre ellos. Aunado a esto, cada cultivo presenta ciertas características propias de la respuesta de defensa vegetal, además de las vías de defensa inducidas van a ser determinantes en el aumento de la actividad o incluso la falta de ella. Por estos motivos, el estudio de las interacciones entre los productos de control biológico se convierte en una necesidad cada vez más apremiante.

2.10 Estudios de la interacción Planta-Patógeno

Anteriormente los estudios de la interacción planta-patógeno estaban limitados al conocimiento de la etiología y epidemiología de la enfermedad. Sin embargo, con el avance del conocimiento de los mecanismos de patogénesis de los principales fitopatógenos, así como de los mecanismos de defensa que utilizan las plantas para contrarrestarlos ha sido necesario un estudio más exhaustivo de esta interacción. Las interacciones con microorganismos patógenos pueden afectar significativamente la sanidad de las plantas de diversas maneras, pero para fines prácticos, también son importantes las interacciones que estos desarrollan con otros microorganismos presentes en el suelo o en la planta (Pal y McSpadden-Gardener, 2006). Los mecanismos de acción de las interacciones entre microorganismos pueden ser la antibiosis, que es la inhibición del patógeno por los compuestos antimicrobianos, que inhiben el crecimiento o matan al patógeno, se puede llegar a presentar inducción de resistencia de las plantas o por la degradación de los factores de patogenicidad del patógeno, tales como toxinas (Whipps, 2001). En este sentido, se hace importante considerar a los microorganismos que pudieran estar presentes en las zonas de interacción entre el patógeno y la planta, lo que introducen nuevos factores a considerar en los procesos de interacción planta-patógeno.

En el caso del oomiceto fitopatógeno *Phytophthora* sp., se han realizado diferentes estudios relacionados con sus procesos de infección y los mecanismos de defensa con su control (Birch y Whisson, 2001; Lamour et al, 2012; Castro-Rocha et al, 2012). Sin embargo, la mayoría de ellos se limitan a las principales especies que afectan a cultivos de importancia como son *Phytophthora infestans* (Birch y Whisson, 2001) y *Phytophthora capsici* (Lamour et al, 2012). Para poder identificar cuáles son los mecanismos de resistencia contra el género *Phytophthora*, es importante conocer cuáles son los mecanismos de defensa eficiente y deficiente cuando se realiza el proceso de infección por parte del oomiceto.

2.12 Mecanismos de defensa vegetal – La respuesta de la planta al ataque del patógeno.

La generación del conocimiento que involucra los mecanismos que utiliza la planta para contrarrestar el ataque de los patógenos se ha convertido en un proceso capital para el desarrollo de tecnología y productos para el control de las enfermedades vegetales, incluyendo agroquímicos como productos de control biológico. Las plantas pueden presentar una defensa pasiva o preformada (preexistente), si está determinada por propiedades ya existentes antes del intento de infección del patógeno; también denominados factores constitutivos, o una defensa activa o inducida, dinámica, si resulta de estructuras o sustancias producidas como respuesta a la penetración del patógeno (Gómez-Renaud, 2004). Los mecanismos de defensa vegetal activos o inducibles, de manera general, inician con el reconocimiento del patógeno, tras lo cual la planta desencadena respuestas de defensa con un rápido flujo de iones, el estallido oxidativo extracelular, la reprogramación transcripcional dentro y alrededor de los sitios de infección y en la mayoría de los casos la respuesta hipersensible (HR) (Cortés-Rodríguez et al, 2010). Durante la infección se pueden activar los genes de resistencia (genes *R*) que pueden funcionar para impedir el desarrollo del patógeno, produciendo una muerte rápida de las células y la síntesis de compuestos antimicrobianos en el sitio de infección, que restringe el crecimiento del patógeno y lo torna avirulento (Cortés-Rodríguez et al, 2010). Como resultado ocurre una necrosis visible llamada HR, un mecanismo que provoca una muerte rápida de las células infectadas (Gómez-Renaud et al, 2004), y es considerada como la máxima expresión de resistencia de las plantas al ataque por patógenos. Durante la HR, las células localizadas alrededor del sitio de penetración se suicidan con la intención de detener la infección y el avance del patógeno. Esta muerte de las células durante la HR se considera como una muerte celular programada (PCD); y es una muerte genéticamente controlada que requiere de la participación activa del organismo e involucra una secuencia de eventos metabólicos celulares que conducen a la destrucción de la célula (Sanzón-Gomez, 2010). La HR además está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina (Madriz-Ordeñana, 2002). Se ha consignado que las

plantas en las que se dispara HR ocurre una síntesis de ácido salicílico y acumulación de agentes antimicrobianos, como las proteínas PR (proteínas relacionados con la patogénesis; y por ejemplo quitinasas y glucanasas) y fitoalexinas (Cortés et al, 2010), que se han asociado con el fenómeno de resistencia sistema adquirida (SAR) (Madriz-Ordeñana, 2002).

Por otro lado, los compuestos fenólicos pueden ser sustancias fungitóxicas como el ácido clorogénico y el cafeíco; o productos de la oxidación como la florentina, hidroquinona, hidroxitiramina y fitoalexinas; estas últimas se producen en mayor cantidad en el momento de la infección. Estos compuestos se encuentran en los tejidos, tanto en las plantas sanas como enfermas, pero que se incrementan en su producción con la infección e inhiben el desarrollo de los hongos (Gómez-Renaud et al, 2004). En el caso de la enzima polifenoloxidasas (PPO) es más alta en los tejidos de variedades resistentes que en las susceptibles, su importancia como mecanismo de defensa es que actúa oxidando los compuestos fenólicos a quinonas, los cuales son a menudo más tóxicos que los fenoles originales (Gómez-Renaud et al, 2004). Por otra parte, se conoce que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son componentes comunes de las respuestas de defensa en plantas contra patógenos, al entrar en contacto con las células o tejidos vegetales con agentes microbianos ocurre una ráfaga oxidativa caracterizada por la rápida generación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2); la formación extracelular de ROS y la ráfaga oxidativa tienen un rol predominante en la ejecución de la muerte celular como defensa en plantas (Gómez-Renaud et al, 2004). La inducción de estos mecanismos de defensa en las plantas llevan a la inducción ya sea de forma local o puede llegar a hacer una resistencia sistémica inducida o adquirida, en ambos fenómenos, la resistencia local o sistémica es subsecuente por el ataque del patógeno (Madriz-Ordeñana, 2002; Squeo y Cardemil, 2007).

2.12.1 El desarrollo de la resistencia sistémica

Dentro de los mecanismos de defensa que se inducen en la planta al detectar un patógeno, algunos se relacionan con la inducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR) o inducida (ISR). En el caso de la SAR, es inducida por la exposición de raíces y follaje a

inductores (elicitors) bióticos y abióticos, y se considera que es dependiente de la vía del ácido salicílico (SA), además de estar asociada con la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Con la transducción de señales de la parte infectada a otros tejidos que no han interactuado con el patógeno, se produce un efecto sistémico que provoca que la planta pueda responder de manera más rápida al ataque del mismo patógeno o de otro diferente, predisponiendo a la planta a resistir efectivamente ante los ataques adicionales. La SAR presenta dos características principales: (1) es efectiva contra un amplio espectro de diferentes patógenos y (2) es a largo plazo. Un requerimiento esencial para la resistencia sistémica adquirida es que la primera infección por un patógeno cause lesión necrótica, esta necrosis puede ser el resultado de la muerte celular programada después del reconocimiento del patógeno en una interacción incompatible.

Por otra parte, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados como resistencia sistémica inducida, se activan solamente como una respuesta al ataque de un patógeno, o de la interacción de la planta con microorganismos no patogénicos, benéficos o incluso de control biológico. Se desarrolla a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos de la rizósfera, particularmente rizobacterias, hongos antagonistas que colonizan las raíces y micorrizas. Es caracterizada por estar mediada por vías metabólicas sensibles al ácido jasmónico (AJ) y al etileno, sin que necesariamente aumente la concentración de estos compuestos, considerándose independiente de la expresión de los genes PR y del ácido salicílico (Madriz-Ordeñana, 2002). La ISR es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes y que posiblemente durante este proceso las plantas se sensibilizan a la acción del AJ y etileno durante la ISR (Squeo y Cardemil, 2007).

Se ha observado que algunos hongos de biocontrol como es el caso de algunas cepas de *Trichoderma* sp., que controlan numerosas enfermedades de las plantas, están relacionadas con la inducción de la ISR. Además, de que han mostrado la capacidad de provocar una mejoría en la planta ante algunos tipos de estrés abióticos, incluyendo la capacidad de mejorar la absorción de nutrientes en las plantas y aumentar sustancialmente la eficiencia del uso del nitrógeno en los cultivos. Todas estas habilidades se deben a su capacidad para

reprogramar la expresión de genes en las plantas. Estudios han revelado que alguna clase de componentes que se producen durante la interacción entre *Trichoderma* y la planta están relacionados con la inducción de la resistencia de las plantas, entre estas se encuentran enzimas que el hongo produce como son xilanasas, glucanasas, metabolitos, la expresión de proteínas relacionadas con la patogenicidad que producen una reacción local y necrosis lo que probablemente lo está relacionado con la inducción de la defensa de la planta. Además se ha encontrado evidencia de que el ácido jasmonico y el etileno están involucrados en la transducción de señales cuando las raíces son inoculadas con *Trichoderma*. Lo que nos lleva a inferir que la inducción de resistencia que producen las cepas de *Trichoderma* es una resistencia sistémica inducida (Shoresh et al, 2010).

2.13 Mecanismos de patogénesis de *Phytophthora* sp.- Las estrategias de ataque del oomiceto fitopatógeno.

La otra parte de la interacción planta-patógeno, está dada por los mecanismos que utilizan las diferentes especies del género *Phytophthora* para infectar a las plantas. Estos mecanismos han sido elucidados para ciertas especies por el daño que significan para especies como el chile y la papa.

Los oomicetos, el grupo del cual forma parte *Phytophthora*, pueden formar hifas especializadas, que secretan un amplio espectro de proteínas efectoras que entran en las células del hospedante y alteran las respuestas de defensa y el metabolismo celular (Dodds, 2010; Thines y Kamoun, 2010). Los estudios sobre las interacciones planta-patógeno se enfocan en gran parte al estudio de genes de avirulencia (Avr) (Tyler, 2001). Los genes que determinan la resistencia y la susceptibilidad en las plantas son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en los patógenos (Madriz-Ordeñana, 2002). Los genes Avr codifican productos que son detectados por los sistemas de defensa de las plantas, específicamente por receptores codificados por los genes de resistencia (R) de éstas. Si los productos de los genes Avr del patógeno son detectados por los de los genes R de la planta, entonces se desencadena la respuesta de resistencia. Si los mecanismos de

defensa de la planta son incapaces de detectar los productos de los genes Avr, entonces la planta es susceptible a ser infectada (Tyler, 2001; Castro-Rocha et al, 2012).

La infección inicia cuando la hifa emerge de una oospora germinada, un esporangio directamente germinado o de una zoospora enquistada, esta penetra a través de la cutícula de la planta y obtiene acceso a las células del hospedero. En algunos casos, se observa un apresorio en el sitio de infección. Después de la invasión exitosa, sigue un crecimiento y la colonización de los tejidos del hospedero, lo cual culminará con el colapso del tejido vegetal y esporulación. *Phytophthora* es designado como un patógeno hemibiotrófico, por lo cual, presenta dos fases en su ciclo de vida dentro del hospedero, una fase biotrófica y una fase necrotrófica. En la etapa temprana, presenta un comportamiento biotrófico, que se visualiza con la presencia de protrusiones de la hifas (haustoria) que oprimen hasta penetrar la membrana celular del hospedero y establecen una interface directa con las células de la planta (Schornack et al, 2010). En esta etapa temprana, las células no parecen ser afectadas, indicando que se presenta una supresión local de los mecanismos de defensa vegetal. En la segunda fase de la infección, *Phytophthora* cambia a una fase necrotrófica, al matar a las células del hospedero, causando un colapso del tejido y una necrosis significativa. El tejido colapsado es entonces seguido por la emergencia de esporangios, que proveerán los medios para la dispersión y el nuevo ciclo de infección (Lamour et al, 2012). Un punto determinante en la interacción planta-*Phytophthora*, es la supresión de la defensa vegetal por medio de efectores fúngicos. En este punto, se hace de vital importancia conocer cuáles son los mecanismos de defensa involucrados en la susceptibilidad y resistencia de *Phytophthora*.

2.14 Mecanismos de defensa vegetal involucrados en la resistencia contra *Phytophthora* sp.

El uso de cultivares genéticamente resistentes ha sido una de las estrategias más buscadas para el control de *Phytophthora*, así como de otros fitopatógenos. Sin embargo, existen pocas variedades resistentes que sean efectivas contra las principales especies de este género. El estudio de estas variedades resistentes o con diferentes grados de resistencia, ha permitido elucidar los mecanismos de defensa efectivos contra la mayoría de las especies

de este oomiceto. Las respuestas de las variedades resistentes a *Phytophthora* sp., comparten ciertas características, algunas de ellas incluyen una rápida inducción de la reacción de hipersensibilidad (HR), con una expresión más rápida de genes que codifican la síntesis de la enzima Fenilalanina amonioliasa (PAL), también ocurre una mayor expresión de genes que codifican peroxidasas y la presencia de fenoles considerados como tóxicos al oomiceto (Sanzón-Gómez, 2010). Sin embargo, aunque se conocen diversos mecanismos de defensa que se activan por el reconocimiento del patógeno, depende de la especie, la planta y el patógeno para que algunos de los mecanismos puedan ser activados. Por lo tanto, se han realizado diversos estudios en búsqueda de los mecanismos de defensa que son inducidos contra las cepas patogénicas de *Phytophthora* sp.

En el patosistema *Phytophthora capsici* - *Capsicum annuum*, se ha encontrado una especie criolla resistente de Chile serrano, denominada como CM-334, que presenta una marcada resistencia con la mayoría de los aislamientos de *P. capsici* (Oelke et al, 2003; Glosier et al, 2008). La genética que se relaciona con la resistencia contra *Phytophthora* ha sido descrita como multigénica (Ogundiwin et al, 2005). Esto se relaciona con diferentes partes de la planta de Chile que pueden ser infectados por *P. capsici*, por lo que cada parte infectada puede ser considerada como un síndrome distinto, y la resistencia a cada uno de los síndromes es controlada por genes distintos (Oelke et al, 2003). Esto provoca que aún no exista a la fecha, una comprensión clara en este patosistema, de que hace a un cultivar resistente, o no, para ser infectado.

Existen diversos cambios histológicos y citológicos en plantas de Chile al ser inoculadas con *P. capsici*. Las paredes de las células hospedantes adyacentes a las hifas del patógeno son parcialmente degradadas y estructuralmente debilitadas, probablemente debido a la acción de enzimas. En las plantas de Chile resistentes, el patógeno se mantiene en la superficie de la epidermis de la raíz, atrapado en los exudados radicales compuestos de proteínas y polisacáridos. También se observa un engrosamiento de la lamela media entre las células epidérmicas y corticales, un mecanismo de la planta para detener la infección al prevenir la penetración de las hifas de la epidermis hacia el córtex. Una de las características estructurales más prominentes en las plantas resistentes es la formación de

apositiones de la pared celular unidas a hifas. Existe una diferencia en la supresión del desarrollo de la enfermedad en los tallos y las raíces de las plantas de Chile resistentes, esto probablemente debido a la ausencia de exudados en los tallos. Esto sugiere que las respuestas en Chile resistentes son más discriminativas en las raíces que en las partes aéreas de la planta (Kim y Kim, 2009).

También se ha evaluado el grado de estrés oxidativo presente durante esta interacción planta-patógeno. Después de la inoculación de las plantas de Chile con *P. capsici* se ha visto un incremento en los niveles de peróxido en los tejidos. La enzima que presenta un mayor aumento en su actividad durante este proceso es la catalasa, mostrando un incremento en los tallos de las plantas. Los niveles de actividad de la ascorbato peroxidasa disminuyen durante la interacción. Esto sugiere que la interacción en este patosistema lleva consigo un incremento sustancial en el estrés oxidativo, probablemente como consecuencia directa de un declive progresivo en los sistemas enzimáticos responsables del catabolismo de las especies reactivas de oxígeno o ROS (Gayoso et al, 2004). Algunos estudios, relacionan la resistencia en algunos cultivares de Chile con un aumento en mecanismos de defensa relacionados con el control del estrés oxidativo. Se ha descrito que *P. capsici* aumenta la producción de ROS y de la peroxidación de lípidos de membrana en la hojas de una planta infectada, mientras que en variedades tolerantes se observa una mayor protección contra la peroxidación lipídica, con un aumento en los contenidos de prolina, un aminoácido con propiedades antioxidantes (Koç y Üstün, 2011).

Algunos estudios con células en suspensión de Chile con diferente susceptibilidad a *P. capsici*, mostraron que en los cultivares resistentes se produce la síntesis o acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) con actividad de peroxidasas y la acumulación de un polímero similar a la lignina. Se observó que las variedades susceptibles redujeron sus niveles de actividad total de la peroxidasa. Dicha actividad, aumentó en la variedad resistente y estuvo acompañada por la expresión *de novo* de isoenzimas ácidas de la peroxidasa (Egea et al, 2001).

En otro estudio se reporta que existe una expresión diferencial de los genes relacionados con los mecanismos de defensa en cultivares de Chile con diferentes grados de resistencia a

P. capsici después ser inoculados con este fitopatógeno. Se ha reportado dicha expresión diferencial en los genes que codifican para una proteína PR-1 básica (CABPR1), una β -1,3-glucanasa básica (CABGLU), una peroxidasa (CAPO1) y una sesquiterpeno ciclasa (CASC1). Los niveles de mRNA de estos genes incrementan de manera marcada a las 24 horas después de la inoculación, observándose una inducción máxima de los genes responsables de la PR-1 y la sesquiterpeno ciclasa. Los niveles de expresión de los cuatro genes fueron diferentes entre los genotipos de Chile. Los genes de la PR-1, la peroxidasa y la sesquiterpeno ciclasa siempre se expresan en mayor nivel en los cultivares resistentes que en los susceptibles (Silvar et al, 2008).

Con respecto a la acumulación de proteínas PR, se ha reportado que enzimas con actividad de β -1,3-glucanasas se presentan en interacciones incompatibles. Se han reportado varias isoformas de enzimas con actividad de β -1,3-glucanasas en este tipo de interacciones. En contraste, la acumulación de enzimas con actividad de quitinasas no presenta una diferencia significativa en interacciones compatibles e incompatibles, siendo la actividad enzimática ligeramente mayor en las interacciones incompatibles (Kim y Hwang, 1994; Jung y Hwang, 2000; Castro-Rocha et al, 2012). En los tallos de Chile inoculados con *P. capsici* se produce la inducción del mRNA de la quitinasa (CACHi2) después de la inoculación y el nivel de expresión aumentó de manera gradual en interacciones incompatibles. En las interacciones compatibles, la inducción de los transcritos de quitinasa se detectó de manera más tardía. El transcrito de esta enzima se localizó en los tejidos vasculares y su expresión se restringió a las células relacionadas con el floema. Se infiere que estas quitinasas extracelulares tienen un papel inicial en limitar el crecimiento del patógeno (Lee et al, 2000).

Para otros patosistemas, también se han realizado estudios que nos permiten vislumbrar que otros mecanismos de respuesta se inducen o comparten entre ellos. En este sentido, Korgan y colaboradores (2009), evaluaron diferentes mecanismos de defensa como son la deposición de la lignina y calosa, polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasas (POX), así como la acumulación de fenoles, para correlacionarlos con los niveles de resistencia de *Solanum tarijense* contra *Phytophthora infestans*. Se encontró que hubo una mayor acumulación de

fenoles, lignina y calosa y una fuerte inducción de la PPO y actividades POX en las plantas de papa resistentes a *P. infestans*. Por otra parte Lozoya y colaboradores (2006), en este mismo patosistema en variedades Alpha y Zafiro, susceptibles y resistentes al tizon tardío, encontraron que se elevan los niveles de actividad de las peroxidasas y de PAL en la variedad resistente.

Para otro patosistema, soja y *Phytophthora sojae*, Chen y colaboradores (2008), analizaron los efectos sobre la promoción y control del estrés oxidativo en el proceso de infección de *P. sojae*, con una variedad medianamente resistente y una susceptible. Se encontró en la variedad resistente se presentó una acumulación de H₂O₂ mayor que en la susceptible, además de un muerte celular más severa. Empleando tres tipos de reductores de ROS, aplicados de manera exógena, se observó que se favorecía la infección en ambos cultivares. Sus resultados muestran la importancia de las ROS en la interacción de *P. sojae* en soja.

A partir de estos estudios, ha sido posible inferir que mecanismos de defensa vegetal están implicados en la resistencia a *Phytophthora*. Sin embargo, también se observó que la respuesta dependerá de las características de cada especie vegetal. Entre las respuestas que se comparten es la inducción de una muerte celular programada, al parecer relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno, con una activa participación de enzimas con actividad de peroxidasas y procesos de control del estrés oxidativo. En otros casos, el fortalecimiento de la pared y membrana celular tiene un papel menor, pero también se ve implicado. La producción de metabolitos secundarios, relacionados con la presencia de fitoanticipinas o fitoalexinas, es muy contrastante y dependiente de la especie vegetal. Finalmente, las proteínas PR presentan una respuesta variada, siendo en algunos casos determinantes y en otras, no se ha elucidado su verdadero papel.

El factor determinante en los estudios de la interacción planta-patogeno y la determinación de los mecanismos de defensa vegetal implicados en la resistencia a *Phytophthora*, y de los hongos y oomicetos fitopatogenos en general, han sido el uso de variedades resistentes y susceptibles. Sin embargo, con el desarrollo de moléculas inductoras de defensa vegetal, se ha abierto una nueva gama de posibilidades para elucidar los mecanismos de resistencia.

Sin embargo, el uso de estas moléculas no solo significa una importancia en esta clase de estudios, con la salida al mercado de estas moléculas como productos de bajo impacto ambiental con una actividad de inductores de defensa vegetal, se vislumbra el uso combinado de ellos, aun cuando en muchos casos, no se conoce la vía de señalización.

2.15 Estudios de la interacción de inductores de defensa vegetal en el control de fitopatógenos.

El uso de inductores de defensa vegetal ha empezado a vislumbrarse como una opción real en el control de plagas y enfermedades. Es en el control de enfermedades en donde se ha encontrado el mayor uso y potencial. Sin embargo, el uso de estos productos implica un conocimiento mayor que se necesita cuando se usa el tratamiento convencional de agroquímicos o productos biológicos que están diseñados para actuar directamente contra el patógeno (biocidas o bioestáticos). Aun cuando su validación a nivel de campo sigue las pautas que se usan en la mayoría de los productos agrícolas, una planeación basada en su mecanismo de acción permitiría una mejor validación. En primer lugar, es necesario conocer la respuesta de la planta al patógeno y que mecanismos de defensa están presentes en la planta, así como la estrategia del patógeno para poder suprimir esta respuesta o contrarrestarla. En segundo lugar, se considera la principal ventaja de esta estrategia al controlar al patógeno de manera indirecta, haciendo uso de la respuesta de la planta para este control. En este punto incide la vía de señalización que esté implicada en inducción de la defensa vegetal, ya sea por medio de la vía del ácido salicílico o la vía del ácido jasmónico (Castro-Rocha et al, 2012). Esto se convierte en primordial, al ser vías de señalización antagónicas, lo que implica que el aumento de una de estas moléculas señal, provoca una disminución en la otra (La-O et al, 2011). Esto podría significar que en determinado momento pueda ser contraproducente el empleo de dos o más de estos productos de inducción (Medina-Fuentes, 2013).

Un punto que en muchas ocasiones no se considera cuando se emplean microorganismos benéficos y de control biológico, es que su efecto no se limita a un efecto antagónico directo contra el patógeno, además, muchos de ellos establecen una interacción con la

planta que enciende mecanismos de defensa vegetal (Vinale et al, 2008). En este sentido, el uso combinado de microorganismos benéficos o de control biológico e inductores de defensa vegetal, se considera como una estrategia muy efectiva para el control de enfermedades, aunque hace falta realizar estudios para determinar si existe una interacción positiva o negativa.

Por otra parte, el cultivo de nochebuena, el conocimiento que se tiene de sus mecanismos de defensa vegetal, así como de los procesos de patogénesis que se relacionan con las enfermedades que le afectan, es prácticamente nulo. Por estos motivos, se hace necesario el desarrollo de investigación que permita desarrollar este conocimiento, lo que también permitiría que otros patosistemas puedan ser abordados de manera más sencilla.

Una alternativa para el control de *Phytophthora* es el uso de microorganismos con efecto de control biológico como *Trichoderma*, quien también presenta un efecto inductor de defensa vegetal. Por otra parte, también se han usado productos inductores de mecanismos de defensa vegetal como el quitosano, que las sensibiliza para responder rápidamente al ataque de patógenos al estimular mecanismos de defensa específicos. Sin embargo, el conocimiento de su interacción, desde el punto de vista de la inducción de los mecanismos de defensa vegetal, ha sido marginalmente explorado. De acuerdo a lo reportado en la bibliografía se considera que tanto el quitosano (El-Hadrami et al, 2010) como el efecto de inducción de defensa por *Trichoderma* están relacionados con la vía de señalización por ácido jasmónico (Nawrocka y Małolepsza, 2013), por lo cual, se considera que su interacción puede llegar a ser positiva.

2.16 Bibliografía

Abou Sereih N, Abd-El-Aal KH. and Sahab AF. 2007. The mutagenic activity of chitosan and its effect on the growth of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* F. sp. *sesami*. *Journal of Applied Sciences Research* 3(6): 450-455.

Agrios GN. 2005. Fitopatología. Elsevier Academic Press. New York, USA. pp:4-883.

Ahmad, J. and Baker 1987. Competitive saprophytic and cellulolytic activity of rhizosphere competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 358-362.

Aldama-Rojas G. 2011. La flor más bella del mundo: La nochebuena *Euphorbia pulcherrima* Willd. Disponible en: http://revistahypatia.org.mx/index.php?option=com_k2&view=item&id=50:la-flor-mas-bella-del-mundo (Consultado 10/03/2013).

Allan CR and Hardwiger LA. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology* 3:285-287.

Álvarez-Zamorano R. 2004. Enfermedades del tomate y chile Bell. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: diseño, manejo y producción. Torreón, Coah, México. pp:69-99.

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.

Awadalla OA and Mahmoud YA. 2005. New Chitosan Derivatives Induced Resistance to *Fusarium* Wilt Disease through Phytoalexin (Gossypol) Production. *Sains Malaysiana* 34(2): 141-146.

Baker R, Elad Y and Chet Y. 1984. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology* 74:1019-1021.

Belanger R, Bowen P, Ehret D and Menzies J. 1995. Soluble silicon: its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant Disease* 79:329-336.

Benson DM. 2002. The history and diseases of poinsettia, the christmas flower. *Plant Health Progress*. Disponible en: C:\Users\Hp\Desktop\ALMA2\NOCH Poinsettia History and Diseases.mht (consultado el 17/04/2012).

Birch PRJ and Whisson SC. 2001. *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Molecular Plant Pathology* 2(5):257-263.

Bruce RJ and West CA. 1982. Elicitation of casbene synthetase activity in castor bean: The role of pectic fragments of the plant cell wall in elicitation by a fungal endopolygalacturonase. *Plant Physiology* 69:1181-1188.

Cano MA. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 14(2):15-31.

Castro-Rocha A, Fernández-Pavía SP y Osuna-Ávila P. 2011. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* (30):49-65.

Chaparro AP, Hoyos-Carvajal A and Orduz S. 2011. Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. *Agricultural Sciences* 2(3):301-307.

Chen XR, Xin-Le W, Zheng-Guang Z, Yuan-Chao W and Xiao-Bo Z. 2008. Differences in the induction of the oxidative burst in compatible and incompatible interactions of soybean and *Phytophthora sojae*. *Plant Pathology* 73:16–24.

Chen, L. 2006. Anti-microbial chitosan composition for textile products. United States Patent Application, 20060008515.

Chet I, Ibar J and 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. *Phytopathology* 70:994-998.

Chittenden C and Singh T. 2009. In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. *Biological Control* 50:262–266

Cortés-Rodríguez MA, Hernández-García A, López-Gómez R y Salgado-Garciglia R. 2010. La búsqueda de genes de resistencia como una alternativa para la selección de portainjertos de aguacate con tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*. *Biológicas* 12(2):143–150.

Dao T and Xing L. 2009. Producción de esquejes y manejo de un cultivo de *Euphorbia pulcherrima*. Disponible en: <http://floricultura34.blogspot.com/2009/11/pointsettia-estrella-federal-nochebuena.html> (consultado el 10/04/2012).

De-Ascensao A and Dubery IA. 2000. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race Four. *The American Phytopathological Society* 90(10):1173-1180.

Echemendia-Medina Y. 2011. *Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. *Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical*. 30p.

Elad Y and 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.

Egea PF, Rochel N, Birck C, Vachette P, Timmins PA and Moras D. 2001. Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. *Journal of Molecular Biology* 307:557-576.

Elad Y and Chet I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77:190-195.

Elad Y, Chet I and Henis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28:719-725.

Elad Y, Katan J and Chet I. 1980. Physical, biological and chemical control integrated for soilborne diseases in potatoes. *Phytopathology* 70:418-422.

El-Ghaouth A, Arul J, Grenier J and Asselin A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82:398-402.

El-Hadrami A, Adam LR, El-Hadrami I and Daayf F. 2010. Chitosan in plant protection. *Marine Drugs* 8: 968-987.

Engelhard AW and Ploetz RC. 1979. Phytophthora crown and stem rot, an important new disease of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*). *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 92:348-350.

Espinosa-Victoria D, González-Mendoza D, Placencia-de la Parra J y García- Espinosa R. 2004. Reducción de la incidencia de *Phytophthora capsici* Leo en el sistema radical de plántulas de chile pre-micorrizadas con *Glomus intraradices*. *Terra Latinoamericana* 22(3):317-326.

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* 26:35-45.

Ezziyyani M, Requen ME y Candela-Castillo ME. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología* 27:133-135.

Ezziyyani M, Requena ME, Egea-Gilabert C and Candela ME. 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal Phytopathology* 155:342-349.

Fernández-Herrera E, Acosta-Ramos M, Ponce-González F, y Manuel Pinto V. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:FR. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(001):35-42.

Fuentes-Silva D y Rodríguez-Romero A. 2006. ENDO- β -1,3-glucanasas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de sueros de pacientes alérgicos. *Medigraphic* 15(1):35-42.

Gómez-Renaud VM, Torres-Pacheco I, Bárcena-Romero AR, Cervantes-Landaverde JJ, Olvera-Luna A, Quijas-Martínez J y Rosales-Cueto LL. 2004. Efecto de la aplicación de peróxido de hidrógeno para la inducción de resistencia en chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) contra la enfermedad de marchitez del chile ocasionada por *Phytophthora capsici*. Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2009/OctavoVerano_38/12_Gomez_Renaud2.pdf

Guigón-López C y González-González PA. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonista sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 2(001):117-124

Hausbeck MK and Harlan BR. 2007. Evaluation of registered and nonregistered fungicides in managing *Phytophthora* root rot of poinsettia. *Department of Plant Pathology*. http://hypatia.morelos.gob.mx/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=83

Hwang BK, Sunwoo JY, Kim YJ and Kim BS. 1997. Accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:305-322.

Koç E and Üstün AS. 2011. Influence of *Phytophthora capsici* L. inoculation on disease severity, necrosis length, peroxidase and catalase activity, and phenolic content of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Turkish Journal of Biology* (36):357-371.

Korgan S, Wolski EA, Cicore P, Suarez P, Capezio S, Huarte MA and Andreu BA. 2010. *Solanum tarijense* reaction to *Phytophthora infestans* and the role of plant defence molecules. *Plant Breeding* 130:231-236.

Kowalski B and Cassells AC. 1999. Mutation breeding for yield and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary foliar resistance in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden Wonder) using computerized image analysis in selection. *Euphytica* 42(1):75-80.

Kubicek CP and Aké S. 2009. Antagonist potential of *Trichoderma* indigenous isolates for biological control of *Phytophthora palmivora* the causative agent of black pod disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Côte d'Ivoire. *African Journal of Biotechnology* 8(20):5280-5293.

Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13(4):329-37.

La-O-Hechavarría M, Zardón-Navarro MA, Arencibia-Rodríguez A, Rodríguez-Lema E, Acevedo-Rojas R and Mesa-López JM. 2011. Técnicas para el estudio de la interacción caña de azúcar-*Sporisorium scitamineum*. *Agronomía Mesoamericana* 22(1):157-165.

Lárez-Velásquez C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola* 8(1):1-22.

Lawrence CB, Singh NP, Qiu J, Gardner RG and Tuzun S. 2000. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (57): 211-220.

López-Mondéjar R, Blaya J, Obiol M, Ros M and Pascual JA. 2012. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: In vitro and greenhouse nursery experiments. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103(1):1-8

Lozoya-Saldaña H, Almanza-Serrano MG y Colinas-León MT. 2006. Infección mixta *Phytophthora infestans*-virus x de la papa (PVX) y mecanismos de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agrociencia* 40(006):753-764.

Madriz-Ordeñana K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* 63:22-32.

Mpika J, Kébé IB, Issali AE, N'Guessan FK, Druzhinina S, Komon-Zélazowska M, Orlikowski LB and Ptaszek M. 2013. First notice of *Phytophthora* crown and root rot of *Euphorbia pulcherrima* in polish greenhouses. *Journal of Plant Protection Research* 53(4):307-311.

Ozgonen H, Yardimci and Cula-Kilic H. 2009. Induction of phenolic compounds and Pathogenesis-Related Proteins by mycorrhizal fungal inoculations against *Phytophthora capsici* Leonian in pepper. *Journal of Biological Sciences* 12(17):1181-1187.

Pao-Jenn A. 1992. New diseases and records of some important flower plants caused by *Phytophthora parasitica* in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 1(4):166-173.

Papavizas GC, Lewis JA and Abd-Elmoity TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.

Pérez E. 2011. Flor de nochebuena, herencia prehispánica de México. Disponible en: <http://vmexicoalmaximo.com/media/img/revista2/art8.pdf> (consultado el 15/04/2012).

Pineda-Pineda J, Castillo-González AM, Morales-Cárdenas JA, Colinas-León MT, Valdez-Aguilar LA y Avitia-García E. 2008. Efluentes y sustratos en el desarrollo de nochebuena. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2): 131-137.

Porras G, Calvo M, Esquivel M, Sibaja M y Madrigal-Carballo S. 2009. Quitosano n-acilado con cinamaldehído: un potencial bioplaguicida contra agentes patógenos en el campo agrícola. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 10(3):197-210.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31:603-632.

Rodríguez-Pedroso AT, Ramírez-Arrebató MA, Rivero-González D, Bosquez-Molina E, Barrera-Necha LL y Bautista-Baños S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 15(3):307-317.

Roller S, Covill N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 47:67-77.

Santos-Juárez P. 2010. Estrategia para el control de *Phytophthora capsici* Leo. y *Fusarium solani* Mart. En el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). Tesis de Maestría en ciencias. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 51p.

Sanzón-Gómez D. 2010. Comparación de los cambios estructurales en células de chile CM334 en una interacción compatible y una incompatible. Tesis de Doctorado. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 37p.

Schorneck S, Van Damme M, Bozkurt, TO, Cano LM, Smoker M, Thines M, Gaulin E, Kamoun S and Huitema E. 2010. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(17):421-426.

Secretaría de Agricultura y Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2013. Chile mexicano. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/ChileMexicano.aspx> (consultado el 15/03/2014).

Secretaría de Agricultura y Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2013. Productores de nochebuena listos para la temporada navideña. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2010b537.aspx> (consultado el 15/04/2014).

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010. Productores de nochebuena listos para la alimentación navideña. Consultado en agosto 2012 en: <http://sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2010B537.aspx>

Serrano-Carreón L, Galindo-Fentanes E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia* 1(58):77-88.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2013. México es primer lugar mundial en la producción de chile verde. Disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=310:mexico-primer-lugar-mundial-en-produccion-de-chile-verde-y-sexto-en-la-de-chile-seco&catid=6:boletines&Itemid=335 (consultado el 15/04/2014).

Sid Ahmed A, Pérez-Sánchez C, Egea C and Candela E. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology* 48:58-65.

Sid-Ahmed A, Ezziyyani M, Pérez-Sánchez C and Candela ME. 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.

Silvar-Pereiro C, Diaz-Varela J, Candela-Castillo ME, Federico Pomar-Barbeito F and Gil-Ortega G. 2005. Interacción *Phytophthora capsici* Leonian-*Capsicum annuum* l.: caracterización de diferentes illados e resposta da planta ante. *Biología Vexetal e Ecoloxía*. pp:2.

Stepanovic M, Rekanovic E, Todorovic B, Potocnik I, Milijasevic-Marcic S. 2011 Field evaluation of new fungicide mixture against *Phytophthora infestans* (MONT.) de Bary on tomato. *Acta Horticulturae* (914):377-379.

Strashnov Y, Elad Y, Sivan, A and Chet I. 1985. Integrated control of *Rhizoctonia solani* by methyl bromide and *Trichodema harzianum*. *Plant Pathology* 34:146-151.

Texas and AM. 2008. Poinsettias popular again for christmas season. En: http://insects.tamu.edu/feature/poinsettia_facts/index.html (consultado en agosto 2012).

Torres MA. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* (138):414-429.

USDA y Ecke P. 2010. Crop scheduling. En: http://www.ecke.com/ecke/?page_id=411 (consultado en Agosto 2012).

Vanderhoff R. 2008. Poinsettia Pointers. En: http://www.themulch.com/index.php?id=347&option=com_content&task=view (consultado en agosto 2012).

Woodworth J and Hausbeck MK. 2002. Comparison of cultivar susceptibility to *Phytophthora* root rots of poinsettia. *Plant Pathology* (18):6.

Yoshimura MA. 1985. Etiology and control of poinsettia blight caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and *P. drechsleri*. *Plant Disease* 69:511-513.

Yu T, Li HY and Zheng XD. 2007. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *International Journal of Food Microbiology* 114:261-266.

3. Hipótesis

La aplicación combinada de *Trichoderma harzianum* y quitosano potencia la respuesta de los mecanismos de defensa vegetal contra *Phytophthora drechsleri* en nochebuena, en contraste a su aplicación por separado.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar los efectos de la combinación de *Trichoderma harzianum* y el quitosano en la respuesta de los mecanismos de defensa vegetal contra *Phytophthora drechsleri* en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*).

4.2 Objetivos particulares

- Descripción de la interacción *Phytophthora drechsleri* y *Euphorbia pulcherrima*, mediante la respuesta de defensa vegetal.
- Evaluar la respuesta de los mecanismos de defensa vegetal contra *Phytophthora drechsleri* en nochebuena inducidos por *Trichoderma harzianum* y quitosano.
- Evaluar la respuesta temprana de los mecanismos de defensa vegetal por la combinación de *Trichoderma harzianum* y quitosano contra *Phytophthora drechsleri* en nochebuena.
- Evaluar la respuesta de la combinación de *Trichoderma harzianum* y el quitosano en los mecanismos de defensa vegetal relacionados con la resistencia contra *Phytophthora drechsleri* en nochebuena.

5. Resultados

Los resultados se presentan en tres secciones, cada una enfocada al cumplimiento de los objetivos específicos.

En el segundo capítulo se describe la caracterización de la interacción *Euphorbia pulcherrima-Phytophthora drechsleri*. Para esto, se obtuvo la escala de severidad de la enfermedad en plantas de nochebuena, a partir de la cual se evaluó el grado de virulencia observando los síntomas tanto de la parte aérea como en la raíz. También se evaluaron los mecanismos de defensa vegetal tempranos y los relacionados con la resistencia contra *Phytophthora* en raíces de nochebuena, después de la inoculación con *P. drechsleri*.

En el tercer capítulo se describe la evaluación de los efectos en los mecanismos de defensa vegetal contra *Phytophthora* de la aplicación individual y previa del quitosano y de *Trichoderma harzianum* en plantas de nochebuena. Para esto, se realizó la evaluación de los mecanismos de defensa vegetal de respuesta temprana y los relacionados con la resistencia a *Phytophthora* que se inducen en plantas de nochebuena después de la inoculación con *P. drechsleri*.

En el cuarto capítulo se describe la evaluación de los efectos en los mecanismos de defensa vegetal contra *Phytophthora* de la aplicación combinada y previa de quitosano y *T. harzianum* en plantas de nochebuena. Para esto, se realizó la evaluación de los mecanismos de defensa vegetal de respuesta temprana y los relacionados con la resistencia a *Phytophthora* que se inducen en plantas de nochebuena, cuando se aplica de manera combinada el quitosano y *Trichoderma* y después de la inoculación con *P. drechsleri*.

CAPITULO II

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE *Euphorbia pulcherrima*- *Phytophthora drechsleri*

2.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas para alcanzar un manejo racional de las enfermedades que afectan a los cultivos, es la falta de la información básica relacionada con la interacción entre la planta y sus patógenos, que permita conocer los mecanismos de resistencia de la planta, los mecanismos que utiliza el patógeno para contrarrestar estas defensas, y en consecuencia diseñar estrategias de control de estas enfermedades. Se considera, que entre mayor sea el conocimiento sobre como las plantas reaccionan ante el ataque de patógenos, mucho más eficientes serán los métodos que puedan desarrollarse para su control. Durante la infección, parte del ciclo de la enfermedad cuando el patógeno ha ingresado en el hospedero, normalmente la asociación se manifiesta por la sintomatología típica del patosistema correspondiente. Esto permite la visualización de una parte de la interacción. Sin embargo, un punto importante son las fases de la asociación en las cuales no se observan los síntomas (asintomática). Estas etapas tempranas o inmediatamente previas a la infección, la pre-penetración y la penetración misma en la interacción planta-patógeno muchas veces definen el éxito de una invasión patogénica. Desentrañar las bases de estas asociaciones permitirá avanzar en el control de las enfermedades y en el aumento de la producción de los cultivos de una manera sustentable y eficiente.

Los oomicetos del género *Phytophthora* son patógenos vegetales que son devastadores para la agricultura y ecosistemas naturales (Attard et al., 2008). Por sus características fisiológicas particulares, la disponibilidad de productos para su control son limitados. Para el desarrollo de los tratamientos eficientes, se considera esencial la disección de los mecanismos moleculares que determinan la interacción entre las diferentes especies de *Phytophthora* y sus plantas hospederas. Los datos disponibles en cuanto a estos patosistemas se encuentran dirigidos principalmente para *Phytophthora infestans*, *P. sojae* y *P. capsici*. Estas especies presentan características que se consideran como no

representativas para el género. En este sentido, *P. infestans* es un patógeno foliar, mientras que *P. sojae* y *P. capsici* infectan un rango limitado de plantas hospederas, en contraste, se considera que la mayoría de las especies de *Phytophthora* son no selectivas y productoras de pudrición de raíces (Attard et al, 2008). Entre estas especies se encuentra *Phytophthora drechsleri*, un patógeno asociado a pudriciones de raíz y marchitez de diferentes cultivos como el pepino (Roustaei et al, 2004), vid (Latorre et al, 1997) y diferentes ornamentales (Orson, 2010). Uno de los cultivos ornamentales afectados por *P. drechsleri* es el de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*), aunque los síntomas que presenta son también asociados a otras especies como *P. nicotianae* var. *parasitica* (Yoshimura et al. 1985; Daughtrey, 1995). Este cultivo ha sido marginalmente abordado desde la perspectiva de las interacciones planta-patógeno, por lo cual se convierte en una oportunidad para ir aumentando el conocimiento en las interacciones entre *Phytophthora* y su planta hospedera.

Para poder identificar cuáles son los mecanismos de resistencia contra el género *Phytophthora*, es importante conocer cuáles son los mecanismos de defensa eficientes y deficientes cuando se realiza el proceso de infección por parte del oomiceto. Los oomicetos pueden formar hifas especializadas, llamadas haustorios, que penetran las paredes celulares de las plantas y que permiten la asimilación de nutrientes de las células del hospedante (Castro-Rocha et al, 2012; Dodds, 2010). Estas estructuras también secretan un amplio espectro de proteínas efectoras que entran en las células del hospedante y que alteran las respuestas de defensa y el metabolismo celular (Dodds, 2010; Thines y Kamoun, 2010). *Phytophthora* es designado como un patógeno hemibiotrófico, por lo cual, presenta dos fases en su ciclo de vida dentro del hospedero. En la etapa temprana o biotrófica, se visualiza con la presencia de protrusiones de la hifas (haustoria) que oprimen hasta penetrar la membrana celular del hospedero y establecer una interface directa con sus células (Schornack et al, 2010). Las células no parecen ser afectadas, indicando que se presenta una supresión local de los mecanismos de defensa vegetal por medio de efectores fúngicos. En la segunda fase de la infección o necrotrófica, se induce la muerte a las células del hospedero, causando un colapso del tejido y una necrosis significativa. El tejido colapsado es entonces seguido por la emergencia de esporangios, que proveerán los medios para la dispersión y el nuevo ciclo de infección (Lamour et al, 2012). En este punto, se hace de

vital importancia conocer cuáles son los mecanismos de defensa involucrados en la susceptibilidad y resistencia de *Phytophthora*.

El estudio de las variedades resistentes o con diferentes grados de resistencia a especies de *Phytophthora*, ha permitido elucidar los mecanismos de defensa efectivos contra algunas de las especies de este oomiceto. Las respuestas de las variedades resistentes a *Phytophthora* sp., comparten ciertas características, algunas de ellas incluyen una rápida inducción de la reacción de hipersensibilidad (HR), con una expresión más rápida de genes que codifican la síntesis de la enzima Fenilalanina amonioliasa (PAL), también ocurre una mayor expresión de genes que codifican peroxidasas y la presencia de fenoles considerados como tóxicos al oomiceto (Sanzón-Gómez, 2010). Sin embargo, aunque se conocen diversos mecanismos de defensa que se activan por el reconocimiento del patógeno, depende de la especie, la planta y el patógeno para que algunos de los mecanismos puedan ser activados. Por lo tanto, se han realizado diversos estudios en búsqueda de los mecanismos de defensa que son inducidos contra las cepas patogénicas de *Phytophthora* sp.

Un patosistema ampliamente estudiado es *Phytophthora capsici*-*Capsicum annum*. La genética que se relaciona con la resistencia contra esta especie ha sido descrita como multigénica (Ogundiwin et al, 2005). Debido a que diferentes partes de las plantas de Chile pueden ser infectados por *P. capsici*, se considera como un síndrome distinto por cada parte infectada, y la resistencia a cada uno de los síndromes es controlada por genes distintos (Oelke et al, 2003). En las plantas de Chile resistentes, el patógeno se mantiene en la superficie de la epidermis de la raíz, atrapado en los exudados radicales compuestos de proteínas y polisacáridos. También se observa un engrosamiento de la lamela media entre las células epidérmicas y corticales, un mecanismo de la planta para detener la infección al prevenir la penetración de las hifas de la epidermis hacia el córtex. Una de las características estructurales más prominentes en las plantas resistentes es la formación de aposiciones de la pared celular unidas a hifas (Kim y Kim, 2009). Con respecto al grado de estrés oxidativo presente durante esta interacción, se ha descrito que después de la inoculación con *P. capsici*, se observa un incremento en los niveles de peróxido en los tejidos. La enzima que presenta un mayor aumento en su actividad durante este proceso es

la catalasa, mostrando un incremento en los tallos de las plantas. Los niveles de actividad de la ascorbato peroxidasa disminuyen durante la interacción. Esto sugiere que la interacción en este patosistema lleva consigo un incremento sustancial en el estrés oxidativo, probablemente como consecuencia directa de un declive progresivo en los sistemas enzimáticos responsables del catabolismo de las especies reactivas de oxígeno o ROS (Gayoso et al, 2004). Algunos estudios, relacionan la resistencia en algunos cultivares de Chile con un aumento en mecanismos de defensa relacionados con el control del estrés oxidativo (Koç et al, 2011). Se ha reportado que *P. capsici* aumenta la producción de ROS y de la peroxidación de lípidos de membrana en la hojas de una planta infectada, mientras que en variedades tolerantes se observa una mayor protección contra la peroxidación lipídica, con un aumento en los contenidos de prolina, un aminoácido con propiedades antioxidantes (Koç y Üstün, 2011).

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) también ha sido descritas y evaluadas destacando enzimas con actividad de β -1,3-glucanasas se presentan en interacciones incompatibles. Se han reportado varias isoformas de enzimas con actividad de β -1,3-glucanasas en este tipo de interacciones (Kim y Hwang, 1994; Jung y Hwang, 2000; Pinto et al., 2012). En contraste, la acumulación de enzimas con actividad de quitinasas no presenta una diferencia significativa en interacciones compatibles e incompatibles, siendo la actividad enzimática ligeramente mayor en las interacciones incompatibles (Kim y Hwang, 1994; Jung y Hwang, 2000; Pinto et al., 2012). En los tallos de chiles inoculados con *P. capsici* se produce la inducción de la quitinasa (CACHi2) y su nivel aumenta de manera gradual en interacciones incompatibles. En las interacciones compatibles, la inducción de quitinasa se detecta de manera más tardía. Se infiere que estas quitinasas extracelulares tienen un papel inicial en limitar el crecimiento del patógeno (Lee et al, 2000).

Para el patosistema papa-*Phytophthora infestans*, se ha descrito una mayor acumulación de fenoles, lignina y calosa y una fuerte inducción de la PPO y actividades POX en las plantas de papa resistentes a *P. infestans* (Korgan et al., 2009). En otras variedades (Alpha-susceptible y Zafiro-resistente), encontraron que se elevan los niveles de actividad de las

peroxidasas y de PAL en la variedad resistente (Lozoya et al, 2006). Mientras que para el patosistema soja y *Phytophthora sojae*, se ha descrito la importancia del control de las especies reactivas de oxígeno y su relación con la presencia de resistencia al patógeno (Chen et al, 2008).

A partir de estos estudios, ha sido posible inferir que mecanismos de defensa vegetal están implicados en la resistencia a *Phytophthora*. Sin embargo, también se observó que la respuesta dependerá de las características de cada especie vegetal. Entre las respuestas que se comparten es la inducción de una muerte celular programada, al parecer relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno, con una activa participación de enzimas con actividad de peroxidasas y procesos de control del estrés oxidativo. En otros casos, el fortalecimiento de la pared y membrana celular tiene un papel menor, pero también se ve implicado. La producción de metabolitos secundarios, relacionados con la presencia de fitoanticipinas o fitoalexinas, es muy contrastante y dependiente de la especie vegetal. Finalmente, las proteínas PR presentan una respuesta variada, siendo en algunos casos determinantes y en otras, no se ha elucidado su verdadero papel.

Sin embargo, el conocimiento generado para otras especies de *Phytophthora* a nivel de la interacción planta-patogeno ha sido limitado. Para *P. drechsleri*, la mayoría de los estudios se han limitado a la descripción de la sintomatología de la enfermedad. Por este motivo, en este trabajo se realizó la descripción de la interacción *Phytophthora drechsleri*-*Euphorbia pulcherrima* asociada a la pudrición de raíz de la nochebuena.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Material vegetal

Se utilizaron plántulas enraizadas de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) de la var. Freedom Red de aproximadamente dos meses de edad. Estas plántulas fueron colocadas en macetas bajo condiciones de invernadero, en sustrato estéril a una proporción de 6:2:1 peat-moss, arena y vermiculita respectivamente para su posterior evaluación. Diez días previos a la aplicación de los tratamientos, las plántulas fueron colocadas bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento a temperatura constante de 28°C y un fotoperiodo de 16H luz/8H oscuridad, para evitar un efecto negativo por el cambio de las condiciones de invernadero a las condiciones de la cámara.

2.2.2 Material biológico

Se utilizó una cepa patogénica de *Phytophthora drechsleri* (**PHD**) aislado de plantas con síntomas de enfermedad de nochebuena por la Dra. Sylvia Fernández Pavía, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Este aislamiento fue mantenido como cultivo “padre” en tubos con medio de cultivo V8 clarificado.

2.2.3 Evaluación del grado de severidad patogénica de *Phytophthora drechsleri* en plantas de nochebuena

2.2.3.1 Preparación del inóculo

Para obtener el inóculo para la evaluación del grado patogenicidad en plantas de nochebuena, la cepa de *Phytophthora drechsleri* fue crecida sobre agar V-8 clarificado a 27°C por 5-7 días. Posteriormente se indujo la esporulación colocando porciones de aproximadamente 1 cm² de medio de cultivo con micelio en cajas Petri a las cuales se agregó agua estéril hasta cubrir las porciones y se incubaron en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo la inducción de la liberación de las zoosporas se inició colocando

las cajas Petri, en refrigeración a una temperatura de 4°C por un periodo de aproximadamente 24h después de este tiempo se colocaron a temperatura ambiente por una hora y cuantificó en la cámara de Neubauer ajustando a 1×10^5 zoosporas/mL.

2.2.3.2 Inoculación de *Phytophthora drechsleri* en plantas de nochebuena

Las plantas de nochebuena fueron trasplantadas a sustrato estéril (proporción 6:2:1 peat-moss, arena y vermiculita) e inoculadas con 5mL de la suspensión de *Phytophthora drechsleri* a la concentración final de 1×10^5 zoosporas/mL. La suspensión de esporas se agregó directamente en la raíz y posteriormente se cubrió con el sustrato. Las plántulas fueron colocadas bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento (T 28°C, fotoperiodo 16H luz/8H oscuridad), durante 15 días. Se realizaron las lecturas y toma de muestras para las pruebas posteriores (día 0 antes de la inoculación con el patógeno, 1, 10 y 15 posterior a la inoculación).

2.2.4 Evaluación de la respuesta de las plantas de nochebuena a la inoculación de *P. drechsleri*.

2.2.4.1 Evaluación de mecanismos de defensa tempranos en raíces de nochebuena

Se evaluaron los mecanismos de defensa vegetal que se inducen de manera temprana en la interacción planta-*Phytophthora* (Sanzón-Gómez, 2010; Chen et al, 2008; Gomez, 2010). Los mecanismos evaluados fueron: la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), respuesta hipersensible (HR) y en la fortificación de la pared se observó la producción celular de calosa y lignina.

Las plántulas de nochebuena de aproximadamente 2 meses de edad, fueron desinfectadas superficialmente y colocadas en cámaras húmedas, sobre papel toalla estéril humedecida. Las plántulas fueron inoculadas posterior al trasplante de manera directa aplicando una gota de aproximadamente 5 μ L en secciones de la raíz, con la suspensión de esporas de *P. drechsleri* a 1×10^5 zoosporas/mL. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y se

colocaron en cuartos de cultivo a 25°C a fotoperiodo 16H luz/8H oscuridad. Se tomaron muestras de las secciones inoculadas a las 24 y 48h.

2.2.4.1.1 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se tomaron muestras de las secciones inoculadas a las 24 y 48h. Estas secciones fueron cortadas de forma longitudinal, colocadas en tubos eppendorf, a las cuales se les agregó diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) al 1%. Se mantuvieron durante 3h en refrigeración a 4°C y en oscuridad. Posteriormente se eliminó el exceso de colorante y se realizaron tres lavados con alcohol al 96°, por último se mantuvo 24h en alcohol para después realizar la detección de ROS. La presencia de ROS en la raíces se observó en el microscopio óptico como áreas de coloración café-rojiza por la precipitación del DAB (Allardice, 2011).

2.2.4.1.2 Evaluación de la respuesta hipersensible

La reacción de hipersensibilidad forma parte de los mecanismos de defensa de la planta y es considerada como la máxima expresión de resistencia de las plantas al ataque por patógenos. Para evaluar esta respuesta, se determinó la presencia de la muerte celular programada (PCD) en muestras de las raíces inoculadas a las 24 y 48h y cortadas longitudinalmente. Donde se observó la acumulación de colorante en las células muertas de la raíz, esta se presentaba como una coloración azul intenso en las mismas. Para teñir la raíces se utilizó lactoglicerol-azul de tripano al 0.5% (glicerol-ácido láctico-agua destilada en proporción 1:1:1 respectivamente). Las secciones de raíz fueron mantenidas durante 24h en el colorante y posteriormente se realizaron lavados con lactoglicerol hasta eliminar el exceso de colorante. Para eliminar el exceso de colorante y que nos permitiera observar claramente las raíces, se hicieron lavados con salicilato de metilo y alcohol al 96° a concentraciones de 3:1, 2:1 y 1:1 respectivamente. Se adicionó 1 mL de cada una de las soluciones por aproximadamente una hora y por último se agregó lactoglicerol para montarlas en el portaobjetos. Por último se realizaron observaciones en un microscopio óptico (Allardice, 2011), observando la presencia o ausencia de la PCD.

2.2.4.1.3 Producción de calosa

En la evaluación de la fortificación de la pared celular, para la detección de calosa la tinción se realizó posterior a la tinción de especies reactivas de oxígeno con DAB (2.2.4.1.1). Después de varios lavados, las raíces se mantuvieron en alcohol al 96° por 24h aproximadamente y posteriormente se agregó 1 mL de azul de anilina al 0.5 % (w/v) disuelto en buffer de fosfato dipotásico (0.15 M), dejándose por otras 24h. Posteriormente se les realizaron lavados con lactoglicerol hasta eliminar el exceso de colorante. Las raíces fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Allardice, 2011).

2.2.4.1.4 Producción de lignina

Para la evaluación de lignina después de cortar las raíces longitudinalmente se mantuvieron en alcohol al 96° por 24h aproximadamente. Posteriormente, se añadió el colorante fluroglucinol al 1% y se dejó en reposo por 24h. Transcurrido este tiempo, se retiró el colorante y se adicionó ácido clorhídrico (HCl) al 20% dejándose en reposo por 5 min Se realizaron lavados con lactoglicerol y fueron montados en porta-objetos para observar en el microscopio óptico. En las células que presentaron producción de lignina la pared celular se tiñeron de color rojo-violeta (Allardice, 2011).

2.2.4.2 Evaluación de mecanismos de defensa relacionados con la resistencia contra *Phytophthora drechsleri*.

Los mecanismos de defensa vegetal relacionados con la resistencia a *Phytophthora* fueron la producción de componentes fenólicos totales, la actividad de las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) con actividad de quitinasas, β -1,3-glucanasa y la actividad de la peroxidasas (Sanzón-Gómez, 2010; Chen et al, 2008; Gomez, 2010). Para esta evaluación las plántulas fueron inoculadas con la suspensión de zoosporas de *P. drechsleri*. Se realizaron 20 repeticiones por tratamiento, las plantas fueron colocadas en cámara de cultivo bajo condiciones controladas y las lecturas se realizaron los días 0 (previo a la inoculación con *P. drechsleri*), 1, 10 y 15. En cada una de las evaluaciones, se tomaron 5 plantas para extracción de raíz y posteriores evaluaciones.

2.2.4.2.1 Determinación de compuestos fenólicos

Para la determinación de compuestos fenólicos totales, se realizaron extracciones con metanol al 80% de las raíces tratadas. La prueba se realizó agregando 1 mL del extracto metanólico de raíz y 1 mL de agua destilada, posteriormente se adicionaron 125 μ L del Folin-Ciocalteu para parar la reacción después de 3 min se agregó 1 mL de carbonato de calcio. Se diluyó en 5 mL de agua destilada y se dejó reposar por 30 min. Se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro a 650 y 725 nm.

2.2.4.2.2 Determinación de la actividad de la β -1,3 glucanasas

Para la determinación de la producción de las proteínas PR con actividad de β -1,3-glucanasas, se realizó el método colorimétrico del reactivo ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS). Las raíces tratadas fueron maceradas con nitrógeno líquido y colocadas en buffer de fosfatos 0.1M (pH 7), y mantenidas a -20°C . Al extracto de raíces (1 mL) se agregó 1 mL del sustrato laminarina (0.5% w/v), y se colocó en baño maría por 5 min a 55°C . Para detener la reacción, los tubos fueron colocados en hielo y se adicionaron 3 mL del reactivo DNS. Nuevamente fueron colocados en baño maría por 12 min más. Transcurrido este tiempo, los tubos se pasaron a hielo. Por último se agregaron 5 mL de agua destilada y se dejaron reposar por 15 min aproximadamente. La lectura se realizó a 490 nm (Ozgonen et al, 2009).

2.2.4.2.3 Determinación de actividad de quitinasas

Para la determinación de la producción de las proteínas PR con actividad de quitinasas, se utilizó el método colorimétrico con el reactivo 4-Dimetilaminobenzaldehído (4-DMABA). Las raíces tratadas fueron maceradas con nitrógeno líquido y colocadas en buffer de fosfatos 0.1M (pH 7), y mantenidas a -20°C . La prueba se realizó agregando 1 mL de quitina coloidal al 1% a 1 mL del extracto de raíz, y se dejó por 2 horas en incubación a 37°C . Transcurrido ese tiempo se adicionaron 150 μ L de tetraborato de sodio y fue llevado a baño maría por 8 min a 55°C . Transcurrido el tiempo se agregaron 3 mL de 4-DMABA y se dejaron en incubación por 30 min más. Por último se agregaron 5 mL de agua destilada y se

realizó la lectura en un espectrofotómetro a 490 nm (Molano et al, 1977; Pérez et al, 1983 y Roncero et al, 1985).

2.2.4.2.4 Determinación de actividad de peroxidasas (POX)

La actividad de la peroxidasa forma parte del mecanismo de defensa hipersensible de la planta y también se ha relacionado con la inducción de resistencia en la planta (Ezziyani et al, 2005). Para la determinación de proteínas PR con actividad de peroxidasas se utilizó el método colorimétrico con la oxidación del guaiacol en presencia de peróxido de hidrógeno. Las raíces tratadas fueron maceradas con nitrógeno líquido y colocadas en buffer de fosfatos 0.1M (pH 7), y mantenidas a -20°C. La evaluación se realizó agregando 3 mL del buffer de fosfatos, 50 µL de la solución de guaiacol a 20 mM, 100 µL del extracto de raíz. La solución del peróxido de hidrógeno se agregó al último 30 µL a cada muestra, pero esto fue antes de realizar la lectura, por último en el espectrofotómetro se midió la absorbancia a 436 nm. La lectura fue tomada en tiempo hasta que la absorbancia incrementara a 0.05 (Putter, 1974; Malik et al, 1980). La actividad de la enzima peroxidasa se determinó mediante la siguiente formula:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{3.18 \times 0.1 \times 1000}{6.39 \times 1 \times \Delta t \times 0.1} = \frac{500}{\Delta t}$$

Unidades/Litro

2.2.5 Observación de micelio en cortes histológicas de raíces de nochebuena inoculadas con *Phytophthora drechsleri*

De las raíces inoculadas con la suspensión de esporas de la cepa patogénica *Phytophthora drechsleri*, al día final del experimento (D15) se tomaron raíces de plantas de nochebuena y se mantuvieron en una solución fijadora (FAA: Formol, ácido acético, etanol y agua destilada, 10:5:50:35 v/v respectivamente) y mantenidas a 4°C. A partir de estas muestras se tomaron trozos de raíz y colocaron en hidróxido de sodio en baño maría a 50°C durante 30 min. Posteriormente se agregó peróxido de hidrógeno al 5% y se dejó en incubación por 30 min. Transcurrido este tiempo se adicionó ácido clorhídrico al 0.1N y se mantuvo en esta solución por 8 min en baño maría y por último se tiñeron con lactoglicerol-azul de tripano al 0.5% (glicerol-ácido láctico-agua destilada en proporción 1:1:1 respectivamente)

por 30 min. Al terminar el proceso de tinción se realizó un lavado con lactoglicerol para eliminar el exceso de colorante. A partir de las raíces teñidas con lactoglicerol-azul de tripano, se realizó una segunda tinción con Uvitex 2B al 1% por aproximadamente 30 min para observar la presencia de micelio. Posteriormente se realizaron las observaciones al microscopio equipado con epifluorescencia y filtros adecuados para el Uvitex 2B (Patto y Niks, 2001).

2.2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental en bloques completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y cuando hubo diferencias estadísticas significativas, se realizaron pruebas de separación de medias con Tukey $p \leq 0.05$ ambos análisis se realizaron con el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

2.3. RESULTADOS

El presente trabajo se realizó en plantas de nochebuena variedad Freedom Red de aproximadamente dos meses de edad, se realizaron los experimentos inoculando las plántulas con el oomiceto patógeno *Phytophthora drechsleri* (PHD). El cultivo se mantuvo en condiciones controladas, en cámara de cultivo con una temperatura de 28°C y un fotoperiodo de 16 H luz/8 H oscuridad.

2.3.1 Evaluación de la patogenicidad de *Phytophthora drechsleri* en *Euphorbia pulcherrima*.

La prueba de patogenicidad de *Phytophthora drechsleri* (PHD), se realizó en las plantas de nochebuena bajo condiciones controladas. Se utilizó como testigo sustrato estéril inoculado con agua estéril. Las lecturas se tomaron cada tercer día durante 15 días, fecha considerada como la evaluación final del experimento. Tomando como días representativos los días 0 (previo a la inoculación con *P. drechsleri*; DØ), 1, 10 y 15 (después de la inoculación con *P. drechsleri*; D1, D10 y D15 respectivamente), ya que fueron en estas lecturas donde se realizaron observaciones de la planta completa, es decir, de la parte foliar, tallo y raíz.

El primer paso fue obtener una escala de la severidad de la enfermedad, que sirvió para determinar el efecto del patógeno *Phytophthora drechsleri* sobre las plantas de nochebuena. Se observó la presencia de síntomas 10 días después de la inoculación de *P. drechsleri*. Los síntomas observados fueron un cambio en el color de las hojas, presentando clorosis en las hojas afectadas. La presencia de marchitez, que iniciaba con la presencia de necrosis en las puntas de las hojas que aumentaba hasta afectar la hoja completa. El avance de la marchitez provocaba que el tejido previamente marchito se necrosara. Por otra parte, en raíz y tallo, se observó una coloración café, que se relacionó con la muerte del tejido vegetal (**Fig. 2.1**).

De acuerdo a los síntomas observados se realizó la escala del grado de severidad de la enfermedad de 1 a 5, tomando 1 como planta sana y 5 como planta con síntomas terminales de enfermedad o planta muerta. La toma de lectura fue cada cinco días, observándose que en un periodo de 10 días se presentan diferencias evidentes de los síntomas de la enfermedad. Para las evaluaciones de la raíz solamente se observó a los días 1, 10 y 15, por lo tanto se tomaron en cuenta las características de la planta completa, es decir la parte

radicular y aérea. A partir de estas observaciones fue posible obtener una escala de severidad de la enfermedad (**Fig. 2.1**).

ESCALA	PLANTA	CARACTERÍSTICAS
1		<p>Planta sana. Buen desarrollo foliar y radicular.</p>
2		<p>Planta con síntomas ligeros de enfermedad. Presencia de hojas con puntas marchitas. Presencia de síntomas ligeros en raíz y tejido vascular.</p>
3		<p>Planta con síntomas evidentes de enfermedad. Presencia de hojas marchitas. Raíces con síntomas de pudrición. Tejido vascular dañado.</p>
4		<p>Planta con síntomas severos de enfermedad. Hojas marchitas, planta defoliada. Raíces con síntomas evidentes de pudrición. Tejido vascular con daño severo.</p>
5		<p>Plantas con síntomas terminales de enfermedad o planta muerta. Tallos y hojas con síntomas de marchitez. Raíces completamente podridas. Tejido vascular completamente invadido y dañado.</p>

Figura 2.1. Escala de patogenicidad, o severidad de la enfermedad, donde: 1: Planta sana; **2:** Planta con síntomas ligeros de enfermedad; **3:** Planta con síntomas evidentes de enfermedad; **4:** Planta con síntomas severos de enfermedad; **5:** Plantas con síntomas terminales de enfermedad o planta muerta.

Los resultados obtenidos de las lecturas nos muestran que en el caso de las plantas inoculadas con el patógeno *P. drechsleri* presentan síntomas a partir del día 10 después de la inoculación con el patógeno. En comparación con el testigo se puede observar que al día uno las plantas de nochebuena sufren estrés, debido al cambio a una concentración de agua más alta, ocasionando que las plantas presenten un efecto marchitez en las hojas, sin embargo, las plantas se recuperan y al día 10 y 15 se restablecen (**Fig. 2.2**). En el caso de las plantas inoculadas con el patógeno, no se observó este efecto. Por otra parte, las plantas inoculadas con *P. drechsleri* a partir del día 10 sufrieron de pérdida de hojas, además de amarillamiento en algunas de ellas. En el día 15 la mayoría de las plantas presentaban pérdida total de hojas. Por otro lado, en los síntomas de raíces y tallos, se apreciaron manchas necróticas cerca de la base (**Fig. 2.2**). Al cortar los tallos longitudinalmente se observó la presencia de necrosis que iniciaba en la base del tallo. Esta necrosis fue más evidente al día 15, donde además, se observó pudrición en la base del tallo. En el testigo se observó la presencia de una necrosis ligera al final del experimento, que fue atribuido al exceso de humedad relacionado con las condiciones experimentales. Por otro lado, en las observaciones de la raíces hay un efecto negativo evidente en las plantas inoculadas con *P. drechsleri*, ya que al día 10 y 15 se presentó oscurecimiento y disminución de las mismas en comparación el testigo. De acuerdo a la escala de patogenicidad obtenida (**Fig. 2.1**), después de la inoculación con el patógeno las plantas comienzan a presentar síntomas de la enfermedad, el cual conforme transcurren los días el grado de patogenicidad se incrementa. Aunque las plantas al final del experimento (D15) no mueren, presentan un grado de severidad de la enfermedad alto de 3 a 4 (**Fig. 2.3**).

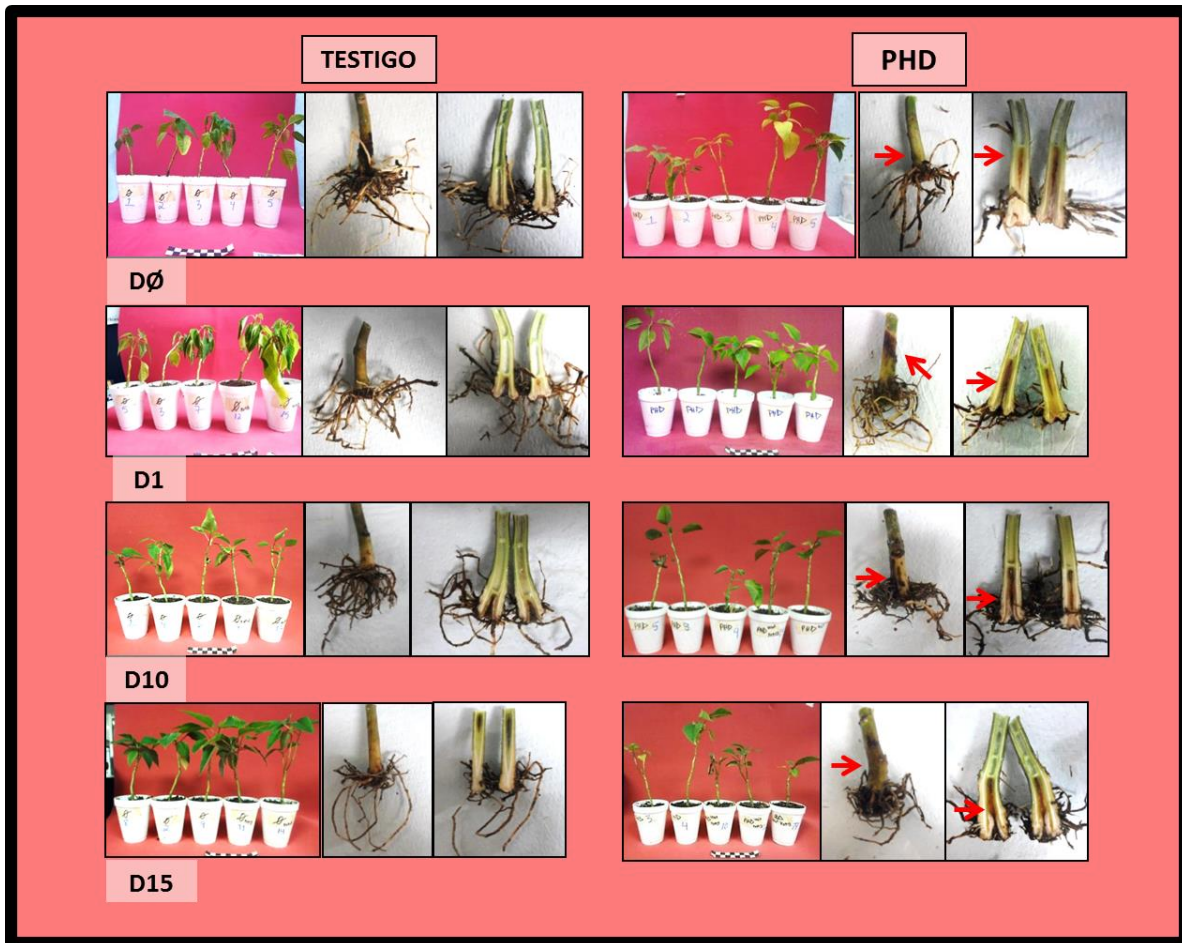


Figura 2.2. Síntomas por la infección de *Phytophthora drechsleri* en plántulas de nochebuena. Plántulas de nochebuena inoculadas con la cepa patógena de *Phytophthora drechsleri* (**PHD**); **TESTIGO**: Plantas inoculadas con agua estéril. (**DØ**): día previo a la inoculación; (**D1**): día 1 después de la inoculación; (**D10**): día 10 después de la inoculación y (**D15**): día 15 después de la inoculación. Las flechas indican el daño por la infección de *Phytophthora drechsleri*.

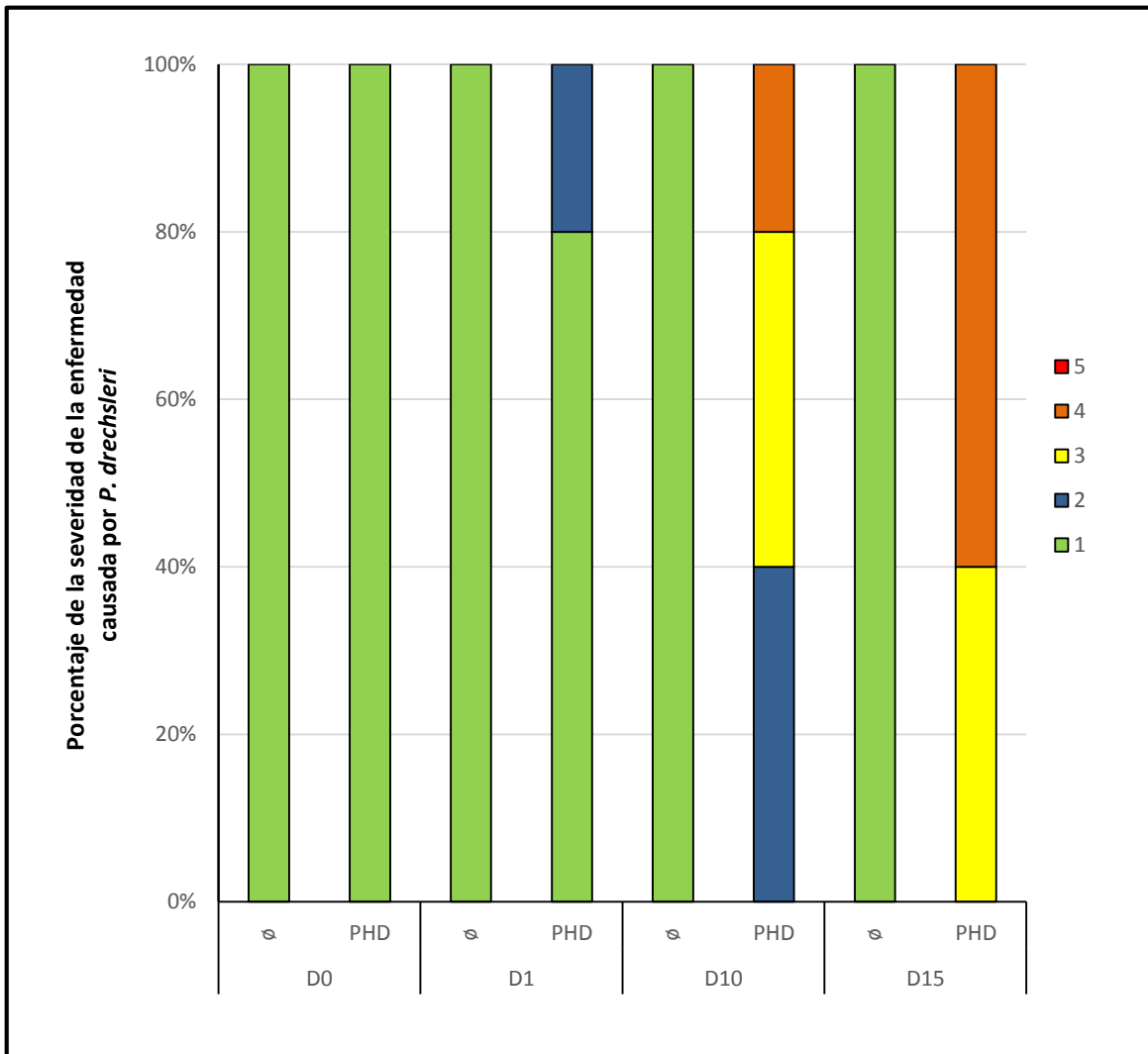


Figura 2.3. Progreso de la enfermedad provocada por la infección de *Phytophthora drechsleri* en plántulas de nochebuena. Porcentaje de la severidad de la enfermedad provocada por la infección de *Phytophthora drechsleri* (PHD) en plántulas de nochebuena. Ø: Testigo, plantas inoculadas con agua estéril; PHD: plantas inoculadas con la cepa patogénica de *P. drechsleri* con una suspensión de 1×10^5 zoosporas/ml. DØ: Día previo a la inoculación de PHD. D1: Día 1 después de la inoculación de PHD; D10: Día 10 después de la inoculación de PHD; D15: Día 15 después de la inoculación de PHD. 1 (■): Planta sana; 2 (■): Planta con síntomas ligeros de enfermedad; 3 (■): Planta con síntomas evidentes de enfermedad; 4 (■): Planta con síntomas severos de enfermedad; 5 (■): Plantas con síntomas terminales de enfermedad o planta muerta.

2.3.2 Mecanismos de defensa vegetal en nochebuena inducidos por el patógeno *Phytophthora drechsleri*

2.3.2.1 Evaluación de los mecanismos de defensa inducidos tempranamente en raíces de nochebuena

Se realizó la evaluación de mecanismos de defensa vegetal que son considerados como la primera línea de defensa contra *Phytophthora*, y por lo tanto, su inducción se realizó en las primeras etapas de la infección. Para la evaluación de estos mecanismos de defensa después de la inoculación con *P. drechsleri* (PHD, 24h después de la inoculación) se consideraron el fortalecimiento de la pared celular por medio de la producción de calosa y lignina. También, se observó la inducción de la respuesta hipersensible (HR) por medio de la inducción de la muerte celular programada (PCD) y con producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las raíces de nochebuena.

Los resultados mostraron que en el fortalecimiento de la pared celular hubo diferencias en comparación con el testigo (**Fig. 2.4**), en el caso de la calosa se puede observar la presencia de fluorescencia en algunas células de la raíz de nochebuena inoculadas con el patógeno *P. drechsleri* y en las cuales se observa un engrosamiento de la pared celular en comparación con el testigo, en el cual no hay presencia de fluorescencia. En el caso de la producción de lignina en las raíces inoculadas con *P. drechsleri*, se observa la presencia de lignina de color rojo en la pared celular y donde incluso parecía que estaba más engrosada en comparación con las células que se encuentran alrededor de la sección donde se presentó la inducción por la detección de *P. drechsleri*. Por otra parte, en cuanto a las respuestas relacionadas con la inducción de la HR, la producción de especies reactivas de oxígeno se observó en las raíces como precipitado color marrón (**Fig. 2.4**). En las raíces inoculadas con *P. drechsleri*, se pudo observar que hay inducción de ROS en algunas secciones de las raíces de las plantas de nochebuena en comparación con el testigo. Por otro lado, en la observación de la PCD, se presentó inducción en las raíces que fueron inoculadas con el patógeno *P. drechsleri*, al observarse células con coloración azul, lo que nos dice que en ese punto se presentó una muerte celular. Además, se observó la presencia de micelio de *P. drechsleri* lo que nos confirma que la inducción se debió al detectar el patógeno (**Fig. 2.4**).

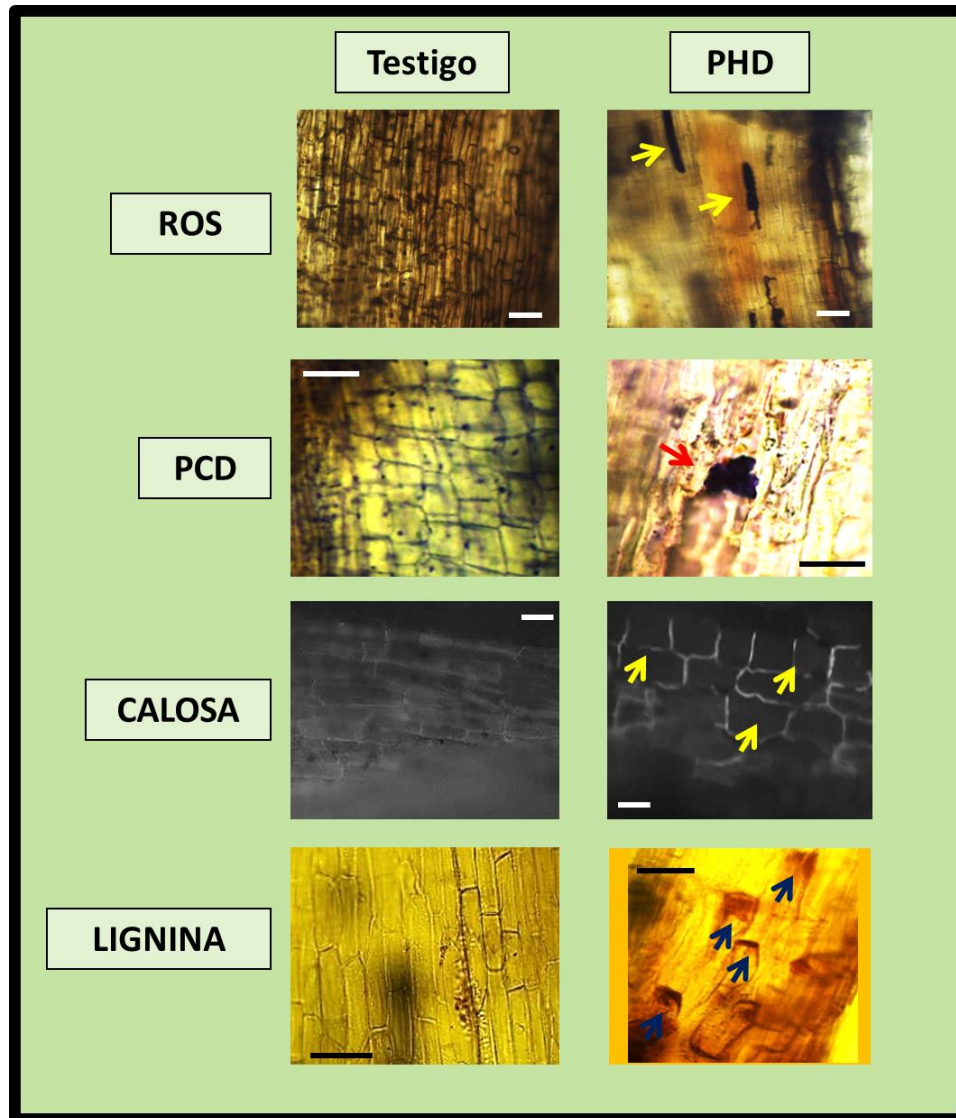


Figura 2.4. Mecanismos de defensa inducidos tempranamente por la infección de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena. TESTIGO: Plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD:** Plántulas inoculadas con *P. drechsleri*. **ROS:** Acumulación de especies reactivas de oxígeno en raíces de nochebuena; **PCD:** muerte celular programa; **CALOSA:** Acumulación de calosa en raíces; **LIGNINA:** Producción de lignina en raíces de nochebuena. La barra equivale a 50 μ m. Las flechas indican la presencia de la respuesta de cada una de las evaluaciones.

2.3.2.2 Evaluación de los mecanismos de defensa relacionados con la resistencia a *Phytophthora* sp.

Se realizó la evaluación de mecanismos de defensa vegetal que se relacionan con la inducción de resistencia a diferentes especies patogénicas del género *Phytophthora*. Al evaluar qué mecanismos se inducen y cuáles no, es posible seguir el proceso de patogénesis de *P. drechsleri*. Estos mecanismos incluyen la producción de metabolitos secundarios relacionados con la actividad antimicrobiana, como son las fitoanticipinas y fitoalexinas por medio de la cuantificación de los fenoles totales. También se evaluó la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), con actividad de β 1,3-glucanasas, quitinasas y peroxidasas. Las evaluaciones se realizaron a partir de raíces de plántulas de nochebuena inoculadas con *P. drechsleri* (PHD), el día previo a la inoculación (DØ), y 1, 10 y 15 después de esta (D1, D10 y D15 respectivamente).

Los resultados mostraron que en la producción de compuestos fenólicos totales (**Fig. 2.5 B**) y la actividad de las β 1,3- glucanasas (**Fig. 2.5 A**), con respecto al testigo no se presentaron diferencias en su inducción. Se observó que no hay respuesta de compuestos fenólicos totales y de la actividad β 1,3- glucanasas antes de la inoculación (DØ) ni posterior a ella. Sin embargo, en la actividad de las quitinasas y peroxidasas, se presentan diferencias en las respuestas de estos mecanismos con respecto al testigo. En el caso de las quitinasas, al final del experimento (D15) se presentó un aumento en su actividad aunque este no fue significativo (**Fig. 2.5 D**). Por otro lado, en las peroxidasas este aumento en la actividad si es significativo (Tukey, $p \leq 0.05$) en el primer día de la inoculación presentándose un aumento considerable con respecto al testigo y los otros días de lectura se observó una disminución en su actividad (**Fig. 2.5 C**).

Se observó que en los primeros días después de la inoculación del patógeno en la actividad de los mecanismos evaluados no mostraron una respuesta en cuanto a la actividad de las proteínas PR (β 1,3-glucanasas y quitinasas), ni en la producción de compuestos fenólicos. Sin embargo, se observó a los 10 días después de la inoculación un efecto negativo en la actividad de estas enzimas (**Fig. 2.5 A y D**). La actividad de las peroxidasas mostró un aumento a partir del primer día después de la inoculación, este aumentó correspondió a cerca del 500% (**FIG. 2.5 C**). Esto se relacionó con la producción de ROS y PCD, que aun

cuando se presentó en las raíces inoculadas con *P. drechsleri*, la respuesta no fue tan evidente como era de esperarse en una interacción incompatible (Fig. 2.4).

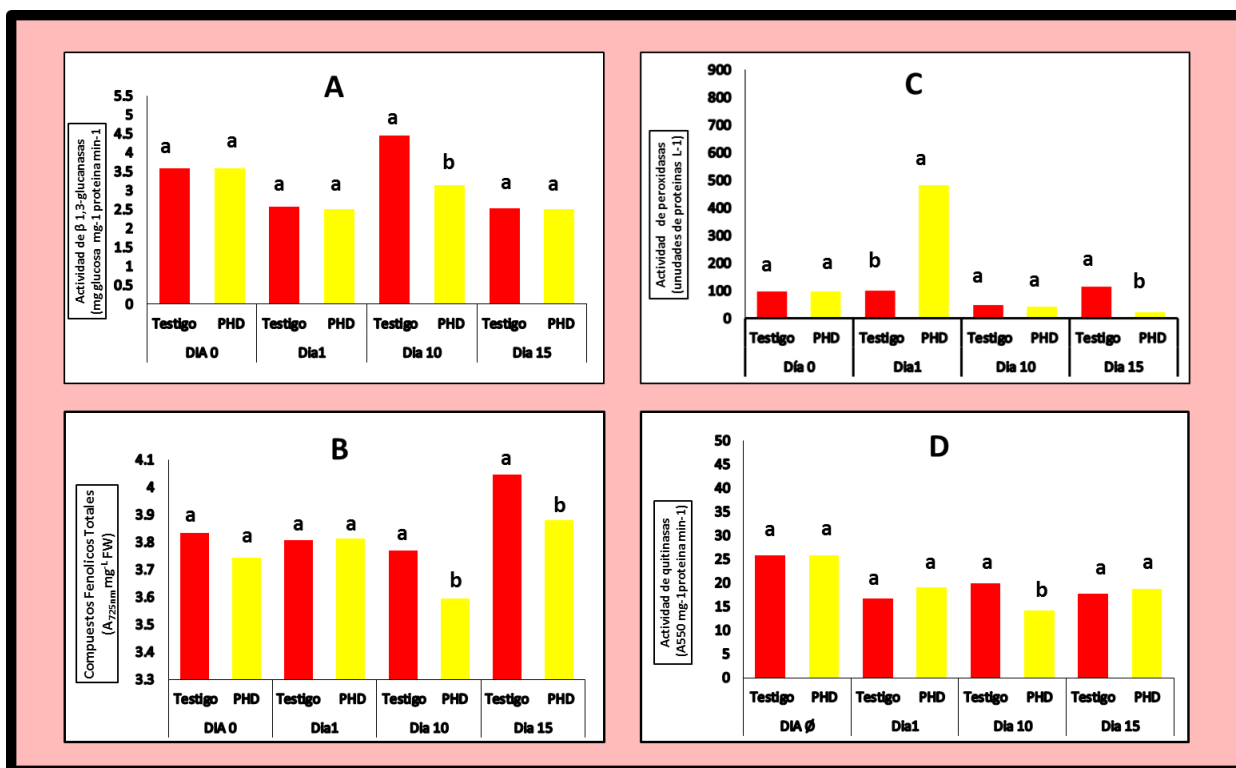


Figura 2.5. Mecanismos de defensa relacionados con la resistencia a *Phytophthora* en plántulas de nochebuena inoculadas con *Phytophthora drechsleri*. **TESTIGO:** Plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD:** Plántulas inoculadas con *P. drechsleri*. **A:** Actividad de β 1,3-glucanasas. **B:** Producción de compuesto fenólicos; **C:** Actividad de peroxidasas; **D:** Actividad de quitinasas. Se evaluó una n=5, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Tukey con $P \leq 0.05$.

Finalmente, se corroboró que los síntomas se relacionaran con la infección de *P. drechsleri* con la observación microscópica de micelio del oomiceto en raíces de nochebuena con la tinción de azul de tripano (Fig. 2.6 B) y UVITEX 2B (Fig. 2.6 A).

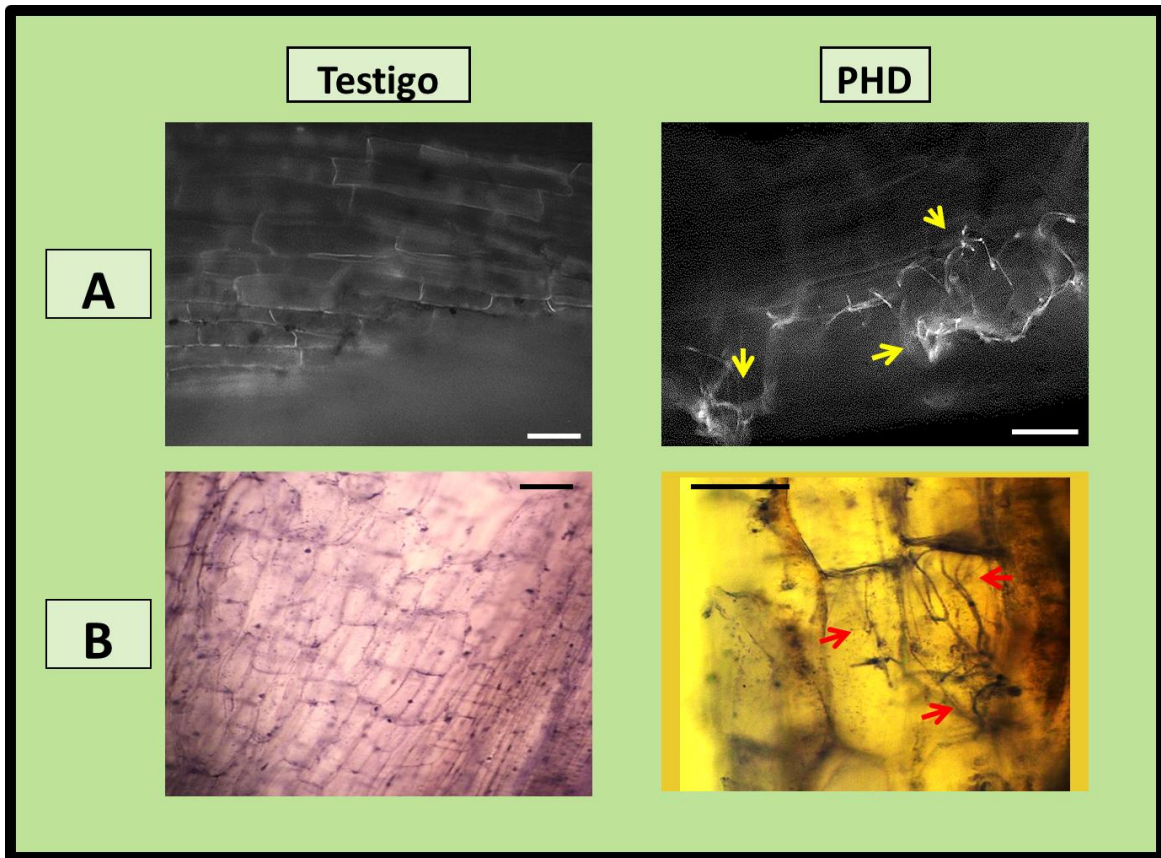


Figura 2.6. Observaciones de la infección del patógeno *Phytophthora drechsleri*. TESTIGO: Plántulas inoculados con agua estéril; **PHD:** Plántulas inoculadas con *P. drechsleri*. **A:** Raíces de nochebuena teñidas con Uvitex 2B (epifluorescencia) y **B:** Raíces de nochebuena teñidas con azul de tripano. La barra equivale a 50 μ m. Las flechas indican la presencia de micelio.

2.4 DISCUSIÓN

El estudio de la interacción planta-patógeno cada vez se convierte en una necesidad para el diseño de nuevas estrategias para el control de las enfermedades vegetales. Con el surgimiento de nuevas herramientas en el control de fitopatógenos con diferentes mecanismos de acción y que no solamente se limitan a un efecto biocida o directo sobre el patógeno a controlar, sino que incluyen efectos indirectos al activar la respuesta de la planta para que se defienda de la infección o con un efecto conjunto con la planta para establecer el control. Por lo tanto, se hace necesario conocer cuáles son los mecanismos de defensa implicados en la interacción, tanto aquellos que son efectivos para el control del patógeno, como aquellos que no son efectivos o aprovechados por el patógeno para infectar. En este sentido, existen diferentes cultivos que han sido exhaustivamente estudiados lo que ha permitido obtener las diferentes redes y vías de señalización de la defensa de la planta (Lancioni 2008; Castro-Rocha et al, 2012). Sin embargo, existen muchas especies vegetales que no se han explorado o han sido poco estudiadas, además de no tener especies o géneros relacionados que permitan extrapolar de manera adecuada, la respuesta de defensa de la planta.

Entre las enfermedades que han sido marginalmente abordadas se encuentra la enfermedad de la marchitez y pudrición de la raíz en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) (Santos-Juárez, 2010). Esta enfermedad está asociada principalmente al oomiceto *Phytophthora drechsleri*, y los estudios que reportan esta interacción *Euphorbia pulcherrima-Phytophthora drechsleri* son muy escasos. Se ha descrito que los síntomas que presenta son también asociados a otras especies como *P. nicotianae* var. *Parasítica* (Yoshimura et al, 1985; Daughtrey, 1995). Los estudios relacionados con esta enfermedad se limitan a la búsqueda del agente causal, una descripción de los síntomas externos y macroscópicos, y se enfocan principalmente a la búsqueda de su control, con el empleo de agroquímicos (Engelhard y Ploetz, 1979; Woodworth y Hausbeck, 2002). Sin embargo, no se conoce nada de los mecanismos de defensa que se inducen en nochebuena o la estrategia de ataque de *P. drechsleri*. Por lo tanto, en este trabajo se realizaron observaciones del desarrollo de

los síntomas de la enfermedad ocasionada por *P. drechsleri*, así como el efecto sobre la respuesta de los mecanismos de defensa ante el patógeno, lo que permitió generar nuevo conocimiento.

A partir de los resultados obtenidos fue posible comparar el proceso de infección *P. drechsleri* y la respuesta de *E. pulcherrima* en una interacción compatible, con lo que se ha descrito en otras interacciones planta-patógeno de otras especies del género *Phytophthora*. Aun cuando no se realizó un seguimiento al proceso de penetración del oomiceto, se puede deducir que la infección de *P. drechsleri* inicia por el contacto con las raíces de las plantas, formando hifas y penetrando en las paredes celulares de las plantas, induciendo las respuestas de defensa y el metabolismo celular (Dodds, 2010; Thines y Kamoun, 2010). Una vez que el patógeno ha ingresado en la planta se manifiestan síntomas típicos de la enfermedad de marchitez y pudrición de raíz ocasionada por *Phytophthora* sp. En las observaciones realizadas en las plantas de nochebuena se apreció que *P. drechsleri* infecta de manera progresiva, es decir que los síntomas no se presentan de manera directa, sino que se generan de manera paulatina causando daños sobre las plantas. Los síntomas se presentaron en la parte aérea y radicular de las plantas. En la parte aérea se presentó principalmente la pérdida de la mayoría de las hojas, así como amarillamiento en algunas y necrosamiento en la base del tallo. Al observar la parte radicular, se apreció en las raíces un oscurecimiento y daño al interior del tallo que se relacionó con la pudrición, lo que probablemente llevaría a la muerte de la planta. El proceso de infección y desarrollo de los síntomas es equiparable a lo que se describe en la infección por *P. capsici* (Gómez et al, 2004; Rodríguez et al, 2009). De acuerdo a lo que se describe para *P. drechsleri*, los síntomas corresponden a lo observado (Engelhard y Ploetz, 1979) y a otros cultivos como son el chile (Medina-Fuentes, 2013), el tomate y la soya (Attard et al, 2008). En este estudio el tiempo de evaluación de las plantas de nochebuena fue de 15 días ya que, en una prueba previa se observó que es en este tiempo donde se observan síntomas evidentes y las respuestas de las plantas son inducidas. Por lo tanto, es importante recalcar que la cepa utilizada bajo las condiciones de evaluación presentó un grado de infección variable, y los síntomas fueron evidentes aun cuando no se observó la muerte de la mayoría de las plantas.

En lo que respecta a las respuestas microscópica y a nivel tisular, no ha sido descrita para la infección de *P. drechsleri* en nochebuena. De acuerdo a la literatura se considera que una vez que el oomiceto se encuentra en el interior del tejido vegetal se establece una interacción compatible, es decir que la infección ha sido exitosa provocando el colapso del tejido de la planta. Al contrario, si el patógeno es reconocido sucede una interacción incompatible y se activa la expresión de mecanismos de defensa (Madriz-Ordeñana, 2002). En este trabajo se seleccionaron algunas pruebas para poder seguir la respuesta de la planta a la infección de *P. drechsleri*. Estas pruebas fueron seleccionadas de acuerdo a los estudios realizados en variedades resistentes o con diferentes grados de resistencia en otras interacciones planta-*Phytophthora*, las respuestas evaluadas en ellos sirvieron como antecedente para ser considerados efectivos contra *P. drechsleri* (Torres, 2010; Ibañez et al, 2010; Castro-Rocha et al, 2012).

De acuerdo a esta información, en este trabajo se seleccionaron dos tipos de respuestas en la planta considerados como los más efectivos en el control de *Phytophthora*, o aquellas respuestas que nos permitirían darle seguimiento a la infección de la planta. En primera instancia se seleccionaron algunos mecanismos de defensa que se inducen de manera temprana a la infección por *Phytophthora*. La primera de ellas contempló a la respuesta de hipersensibilidad o hipersensible (HR) que incluye la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la muerte celular programada (PCD). Esta respuesta permite a la planta contener la infección al provocar la muerte de las células infectadas, y a su vez, desencadenar una cascada de señales que provocará que las células contiguas no infectadas desencadenen su muerte programada. A su vez, estimulará que las células cercanas se preparen para un posible ataque del patógeno, ya sea produciendo metabolitos o enzimas con actividad antimicrobiana, fortaleciendo su pared celular o incluso desencadenar una muerte celular acelerada (Sanzón-Gómez y Zavaleta-Mejía, 2011). En segundo lugar se consideró el fortalecimiento de la pared celular, con la producción de calosa y lignina, ambos polímeros están relacionados con el endurecimiento de la pared celular y por lo tanto evitar la entrada del haustorio fúngico.

En segunda instancia se evaluaron los mecanismos de defensa vegetal que se relacionan con la inducción de resistencia local y sistémica (Edreva, 2005; Borad y Sriram, 2008).

Estas respuestas consideraron la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), evaluándose la actividad de quitinasas y β 1,3- glucanasas, dos de las principales proteínas PR relacionadas con el control de *Phytophthora* por su efecto antimicrobiano. En esta misma etapa se consideró a las peroxidadas, estas enzimas están relacionadas en la resistencia local y sistémica. Se consideran como proteínas PR cuando están implicadas en una respuesta sistémica, sin embargo, su respuesta también se relaciona con una respuesta local temprana. La actividad de las peroxidadas no se relaciona con un efecto directo contra el patógeno, en cambio se relaciona con el control del daño causado por la respuesta hipersensible, como es la sobreproducción de ROS. Otra respuesta relacionada con la resistencia es la producción de fitoalexinas (gliceolina, pisantina, faseolina, medicarpina, etc) (García y Pérez, 2003), moléculas con actividad antimicrobiana directa contra el patógeno, que en la mayoría de las evaluaciones se relaciona con la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la interacción planta-patógeno (Allardice, 2011). Esta información no está disponible para la interacción *Euphorbia pulcherrima* – *Phytophthora drechsleri*.

Uno de los principales problemas al momento de evaluar los mecanismos de defensa inducidos de manera temprana, es que se evalúan respuestas que no producen síntomas visibles. Por este motivo, se empleó una técnica que consistió en aplicar de manera directa en secciones de raíces de las plantas de nochebuena el inóculo, lográndose identificar la respuesta de la células por la infección de *Phytophthora drechsleri*.

Considerando que la interacción entre *E. pulcherrima* y *P. drechsleri* es una interacción compatible y por lo tanto se desarrolla la enfermedad, la respuesta de defensa inducida se considera que no será efectiva contra el oomiceto. Por lo tanto, se hace necesario conocer cuáles son los mecanismos de defensa vegetal que se inducen contra el patógeno *P. drechsleri*. En este trabajo se observó que *P. drechsleri* después de penetrar la planta, el oomiceto es reconocido por la planta dentro de las primeras 24h, ya que se indujo una producción de ROS y la muerte celular programada, lo que trajo como consecuencia la respuesta hipersensible (HR). Esta respuesta es considerada como la más efectiva contra *Phytophthora* (Castro-Rocha et al, 2012) además se observó un fortalecimiento de la pared

celular con la producción de calosa y lignina. A partir de esta respuesta se observó que la planta detecta de manera efectiva a *Phytophthora*, sin embargo, se reporta que las respuestas de defensa inducidas localmente se desarrollan dentro de un grupo limitado de células, en la periferia del sitio de infección, de esta forma se restringe el crecimiento y desarrollo del patógeno invasor, parecería que esto sucede en la infección de *P. drechsleri* (La-O et al, 2011). Sin embargo, la inducción de esta respuesta se va reduciendo a las 48h después de la infección, tanto la HR como el fortalecimiento de la pared celular. En este punto (48h), se observó que se presenta una respuesta interesante con respecto a las plantas que no están infectadas y es el aumento considerable en la actividad de las peroxidasas (POX) de casi de un 400%. Este aumento en la actividad de POX podría explicar la disminución de la HR y fortalecimiento de la pared celular a las 48h después de la infección. Uno de los principales mecanismos de patogénesis de los oomicetos incluyendo *Phytophthora*, es la producción de efectores fúngicos que van a perturbar la respuesta de defensa de la planta (Qutob et al, 2006; Hein et al, 2009). Cuando se habla de un efecto adverso en la respuesta de defensa vegetal, casi siempre se contempla la inhibición de una enzima, transducción de señales o destoxicación de metabolitos, sin embargo, en este caso pareciera ser que el efecto negativo sobre la respuesta vegetal está dada por la inducción de la actividad de peroxidasas. Como era de esperarse, si se considera que la HR es efectiva contra *P. drechsleri*, y que esta respuesta depende en gran medida de la producción de ROS, que se relaciona con una explosión oxidativa (oxidative burst), además de funcionar como moléculas señal en la diseminación de la respuesta de defensa (Torres, 2010; Karuppanapandian et al, 2011). Al aumentar las enzimas con actividad antioxidante que controlen la sobreproducción de ROS, implicaría que no se desencadene la resistencia local y sistémica (Sanzón-Gómez y Zavaleta-Mejía, 2011). Esto fue observado por la falta de respuestas de resistencia como fueron la producción de proteínas PR (β 1,3- glucanasas y quitinasas) y fitoalexinas. La acumulación de proteínas PR, β -1,3 glucanasas, quitinasas y fitoalexinas son activadas contra diferentes microorganismos patogénicos, incluidas las especies de género *Phytophthora* sobre todo en las variedades resistentes, algo que no fue observado en la interacción *E. pulcherrima* – *P. drechsleri* (Stassen y Ackerveken, 2011; Madriz-Ordeñana, 2002; Lundstedt y Valdés, 2013; Kim y Hwang, 1994; Jung y Hwang, 2000; Castro-Rocha et al, 2012).

A partir de los resultados obtenidos es interesante la observación de la interacción *P. drechsleri*-*E. pulcherrima*, la cual permite elucidar el posible mecanismo por el cual *P. drechsleri* infecta a nochebuena. Aun cuando no se puede constatar de manera directa este mecanismo nos indica cual es el camino a seguir para elucidar completamente el proceso de infección. La búsqueda de este efector fúngico con una posible actividad inductora de POX, sería interesante como método de control para otros patógenos vegetales, al provocar el efecto de “priming” o “encendido” en las plantas.

Por otra parte, el método utilizado permitió reducir en gran medida el trabajo metodológico en el seguimiento de la penetración y respuesta de la planta al patógeno al detectar de manera más rápida y fácil el sitio de infección. En las observaciones al microscopio de las raíces de las plantas de nochebuena, utilizando la tinción doble con azul de tripano y el flourocromo Uvitex 2B, permitió localizar al hongo con mayor facilidad. En la observación de las raíces inoculadas con *Phytophthora drechsleri* se observó micelio dentro de las células y del sistema vascular, es decir, que el proceso de infección se inicia dentro del tejido de las raíces (Velásquez et al, 2001).

2.5 CONCLUSIONES

- Se logró la descripción detallada de los síntomas de la enfermedad de marchitez y pudrición de raíz asociada a *Phytophthora drechsleri* y la respuesta de la planta en la interacción, además de una escala de severidad de la enfermedad que podrá ser utilizada en evaluaciones del desarrollo de la enfermedad.
- Se desarrolló un método para facilitar la evaluación de la infección y de las respuestas tempranas de la planta a la infección con *P. drechsleri*, así como el efecto sobre la respuesta de los mecanismos de defensa ante el patógeno, lo que permitió generar nuevo conocimiento.
- Se describieron las respuestas de la planta a la infección con *P. drechsleri*, a nivel de respuestas inducidas de manera temprana así como las relacionadas con la resistencia, que permitieron obtener un panorama comparativo con otros modelos de interacción planta patógeno y los mecanismos que utiliza *P. drechsleri* para perturbar los mecanismos de defensa de *E. pulcherrima*.
- Se observó que los mecanismos de defensa de respuesta temprana son inducidos por el patógeno *P. drechsleri*.
- En los mecanismos de defensa relacionados con la resistencia las β 1,3- glucanasas, quitinasas y fitoalexinas no presentaron actividad.
- Por el contrario, la actividad de POX aumentó considerablemente disminuyendo así la respuesta hipersensible y fortalecimiento de la pared celular.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

Allardyce JA. 2011. Defence mechanisms of a resistant monocot model to *Phytophthora cinnamomi*. Thesis of Doctor. University Deakin. pp:219.

Attard A, Gourgues M, Galiana E, Panabières F, Ponchet M and Keller H. 2008. Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. nicotianae* Breda de Haan). *Journal of Plant Physiology* 165:83-94.

Castro-Rocha A, Fernández-Pavía SP y Osuna-Ávila P. 2011. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:49-65.

Chen XR, Xin-Le W, Zheng-Guang Z, Yuan-Chao W and Xiao-Bo Z. 2008. Differences in the induction of the oxidative burst in compatible and incompatible interactions of soybean and *Phytophthora sojae*. *Plant Pathology* 73:16-24.

Cruz-Ortega J. 2012. Interacción del quitosano con microorganismos de control biológico y el efecto en su actividad protectora contra *Phytophthora capsici*. Tesis de Licenciatura de Ingeniería. Universidad Tecnológica de Costa, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. p:113.

Dodds PN and Rathjen JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11(8):539-48.

Engelhard AW and Ploetz RC. 1979. *Phytophthora* crown and stem rot, an important new disease of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*). *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 92:348-350.

Ezziyyani M, Requen ME y Candela-Castillo ME. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología* 27:133-135.

Galiana E, Rivière MP, Pagnotta S, Baudouin E, Panabières F, Gounon P and Boudier L. 2005. Plant-induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *Cellular Microbiology* 7(9):1365-1378.

Gayoso C, Pomar F, Merino F and Bernal MA. 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 102:1-13.

Gómez-Renaud VM, Torres-Pacheco I, Bárcena-Romero AR, Cervantes-Landaverde JJ, Olvera-Luna A, Quijas-Martínez J y Rosales-Cueto LL. 2004. Efecto de la aplicación de peróxido de

hidrógeno para la inducción de resistencia en chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) contra la enfermedad de marchitez del chile ocasionada por *Phytophthora capsici* 1-5.

Ibáñez AJ, Scharte J, Bones P, Pirkel A, Meldau S, Baldwin IT, Hillenkamp F, Weis E and Dreisewerd K. 2010. Rapid metabolic profiling of *Nicotiana tabacum* defence responses against *Phytophthora nicotianae* using direct infrared laser desorption ionization mass spectrometry and principal component analysis. *Plant Methods* (6):6-14

Jung HW and Hwang BK. 2000. Pepper gene encoding a basic β -1,3-glucanase is differentially expressed in pepper tissues upon pathogen infection and ethylene and methyl jasmonate treatment. *Plant Science* 156:23-34.

Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K and Kim W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 6:709-725.

Kawano T. 2003. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports* (21):829-837.

Kim S and Kim Y. 2009. Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. *Plant Pathology Journal* 25:113-120.

Kim YJ and Hwang BK. 1994. Differential accumulation of β -1, 3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45:195-209.

Koç E and Üstün AS. 2011. Influence of *Phytophthora capsici* L. inoculation on disease severity, necrosis length, peroxidase and catalase activity, and phenolic content of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Turkish Journal of Biology* 36:357-371.

Korgan S, Wolski EA, Cicore P, Suarez P, Capezio S, Huarte MA and Andreu BA. 2010. *Solanum tarijense* reaction to *Phytophthora infestans* and the role of plant defence molecules. *Plant Breeding* 130:231-236.

Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13 (4): 329-37.

La-O-Hechavarría M, Zardón-Navarro MA, Arencibia-Rodríguez A, Rodríguez-Lema E, Acevedo-Rojas R and Mesa-López JM. 2011. Técnicas para el estudio de la interacción caña de azúcar-*Sporisorium scitamineum*. *Agronomía Mesoamericana* 22(1):157-165.

Latorre BA, Wilcox WF and Banadosi MP. 1997. Crown and root rots of table grapes caused by *Phytophthora* spp. in Chile. *Vitis* 36(4):195-197.

Lee IM. 2000. Plant Health Progress - Plant Health Reviews. En: C:\Users\Hp\Documents\Floricultura\Articulos tesis\PoinsettiaHistory.mht (Consultado el 25/04/2014).

Lozoya-Saldaña H, Coyote-Palma MH, Ferrera-Cerrato R and Lara-Hernández ME. 2006. Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Agrociencia* 40: 491-499.

Lundstedt J y Valdés R. 2013. Mecanismos de defensa de las plantas e inducción de resistencia. *Departamento Técnico ASP Chile S.A. Boletín técnico* 11:1-4.

Madriz-Ordeñana K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* 63: 22-32.

Malik CP and Singh MB. 1980. Cuál es el capítulo del libro In: Plant Enzymology and Histoenzymology. *Kalyani Publishers New Delhi* p.53.

Medina-Fuentes S. 2013. Evaluación de la combinación de quitosano, quitina y *Trichoderma* sp. en el control de *Phytophthora capsici* L. en chile serrano (*Capsicum annuum*). Tesis para obtener el grado de ingeniero en procesos biotecnológicos. Universidad Tecnológica de Costa, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. p.102.

Molano JA, Durán A and Cabib E. 1977. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated/chin. *Analytical Biochemistry* 83:648-656.

Molot PM, Mas P, Conus M, Ferriere H and Ricci P. 1981. Relations between capsidiol concentration, speed of fungal invasion and level of induced resistance in cultivars of pepper (*Capsicum annuum*) susceptible or resistant to *Phytophthora capsici*. *Physiological Plant Pathology* 18:379-389.

Oelke L, Bosland P and Steiner R. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128:213-218.

Ogundiwin EA, Berke TF, Massoudi M, Black LL, Huestis G, Choi D, Lee S and Prince JP. 2005. Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 48:698-711

Olson HA. 2010. Identification and characterization of species of *Phytophthora* on ornamental crops in North Carolina commercial greenhouses. Tesis para obtener el grado de Doctorado pp: 122.

Ozgonen H, Yardimci and Culal-Kilic H. 2009. Induction of phenolic compounds and pathogenesis-related proteins by mycorrhizal fungal inoculations against *Phytophthora capsici* Leonian in pepper. *Journal of Biological Sciences* 12(17):1181-1187.

Patto MC and Niks RE. 2001. Leaf wax layer may prevent appressorium differentiation but does not influence orientation of the leaf fungus *Puccinia hordei* on *Hordeum chilense* leaves. *European Journal of Plant Pathology* 107: 795-797.

Pérez PR, Garcia-Acha and Durán A. 1983. Effect of papulacandin B on the cell wall and growth of *Geotrichum lactis*. *Journal of General Microbiology* 129:245-250.

Putter J. 1974. Capítulo In: Methods of Enzymatic Analysis 2 (Ed Bergmeyer). *Academic Press New York* p:685.

Rodríguez-Pedroso AT, Ramírez-Arrebato M A, Rivero-González D, Bosquez- Molina E, Barrera-Necha LL y Bautista-Baños S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(3):307-317.

Roncero C and Durán A. 1985. Effect of calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of Chitine polymerization. *Journal of Bacteriology* 163:1180-1185.

Roustaei A, Sadat-Noori A and Etebarian HR. 2004. Study on interaction of salinity and cucurbit wilt disease (*Phytophthora drechsleri* tucker) in some cucumber cultivars. *Improvement Journal* 20(1): 101-115.

Santos-Juárez P. 2010. Estrategia para el control de *Phytophthora capsici* Leo. y *Fusarium solani* Mart. En el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). Tesis de Maestro en Ciencias. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. p. 51.

Sanzón-Gómez D y Zavaleta-Mejía E. 2011. Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:154-164.

Sanzón-Gómez D. 2010. Comparación de los cambios estructurales en células de chile CM 334 en una interacción compatible y una incompatible. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México. p.42.

Schorneck S. Van Damme M. Bozkurt, TO. Cano LM, Smoker M. Thines M, Gaulin E, Kamoun S and Huitema E. 2010. Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(17): 421- 426.

Silvar C, Merino F and Díaz J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 165:1120-1124.

Stassen JHM and Van den Ackerveken G. 2011. How do oomycete effectors interfere with plant life?. *Plant Biology* 14:407-414.

Thines M and Kamoun S. 2010. Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 13:427-433.

Torres MA. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* (138):414-429.

Velásquez V, Medina R y Luna RJ. 2001. Sintomatología y Géneros de Patógenos Asociados con las Pudriciones de la Raíz del Chile (*Capsicum annuum* L.).En el Norte-Centro de México. *Fitopatología* 19(2):175-181.

Wang Y, Bouwmeester K, Van De Mortel JE, Shan W and Govers F. 2013. A novel Arabidopsis-oomycete pathosystem: differential interactions with *Phytophthora capsici* reveal a role for camalexin, indole glucosinolates and salicylic acid in defence. *Plant Cell and Environment* 36: 1192-1203.

Woodworth J and Hausbeck MK. 2002. Comparison of cultivar susceptibility to *Phytophthora* root rots of poinsettia. *Plant Pathology* 18:6.

Yoshimura MA. 1985. Etiology and control of poinsettia blight caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and *P. drechsleri*. *Plant Disease* 69:511-513.

CAPITULO III
EFFECTO EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA VEGETAL DE LA
APLICACIÓN DEL QUITOSANO Y *Trichoderma harzianum* EN PLANTULAS DE
NOCHEBUENA INFECTADAS CON *Phytophthora drechsleri*

3.1 INTRODUCCION

El cultivo de nochebuena en México es un cultivo que se produce en cantidades importantes en época navideña y durante esta época tiene un aporte económico importante para el país (SAGARPA, 2013). Una de las enfermedades que afectan a este cultivo es la marchitez y pudrición de raíz asociada a *Phytophthora* sp. Las especies relacionadas a esta enfermedad son principalmente *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* y *P. drechsleri* (Yoshimura et al, 1985; Daughtrey, 1995), aunque también otras especies pueden reproducir síntomas equivalentes (Orlikowski y Ptaszek, 2013). La mayoría de los estudios relacionados con esta enfermedad están relacionados con el control de estos oomicetos empleando diferentes fungicidas y antibióticos (Lamour et al, 2003; Woodworth y Hausbeck, 2006).

El control del género *Phytophthora* se ha realizado principalmente a través del uso de agroquímicos, considerados como la medida más efectiva y rápida, para la mayoría de las enfermedades. Sin embargo, dependiendo de la especie de *Phytophthora* a controlar, se ha reportado que este tipo de control tiene una efectividad baja, además de su elevado costo, y en muchas ocasiones, su efectividad se ha visto limitada a un nivel experimental (Chen, 2006; Rinaudo, 2006). Aunado a esto, cada vez se muestran mayores evidencias que el uso de los agroquímicos, en gran medida desproporcionado, puede llegar a provocar graves daños al medio ambiente y a la salud humana. Por este motivo se hace necesario el desarrollo de nuevas opciones de bajo impacto ambiental que permita erradicar el uso de los agroquímicos, o generar opciones que permita su rotación y combinación en circunstancias controladas. Entre estas opciones se considera al control biológico como aquella que presenta mayores ventajas en comparación a los agroquímicos.

El control biológico del género *Phytophthora* se ha realizado principalmente a través de los microorganismos antagonistas (López-Herrera et al, 1999; Akgül y Mirik, 2008). Entre estos microorganismos, destaca de manera importante las diferentes especies del género *Trichoderma*. Estas especies presentan diversas ventajas como su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, sin llegar a ser patogénicos, su ubicuidad y facilidad para ser aisladas, además de un rápido crecimiento al ser cultivadas en un gran número de sustratos, finalmente por el desarrollo de mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y oomicetos (Papavizas et al, 1982). Entre estas especies, *Trichoderma harzianum*, un hongo antagonista presente en la mayoría de los suelos, ha sido de las más destacadas. Su crecimiento se ve favorecido por la presencia de raíces de plantas, a las cuales coloniza rápidamente. Algunas cepas, son capaces de colonizar y crecer en las raíces a medida que éstas se desarrollan. Los mecanismos de acción de *Trichoderma* pueden ser variados, pudiéndose clasificar en los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (competencia por espacio y nutrientes, el microparasitismo, la antibiosis, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores; Lorenzo, 2001), y los que actúan de manera indirecta por medio de la inducción de los mecanismos de defensa vegetal y resistencia (Chet et al, 1997, Sid Ahmed et al, 2000, Sid Ahmed et al, 2003). La inducción de estos mecanismos de defensa ha mostrado un efecto protector contra diversos hongos fitopatógenos en muchos cultivos, incluyendo la protección contra el oomiceto *Phytophthora* (Elad y Baker, 1985; Elad y Chet, 1987; Chet e Ibar, 1994; Belanger et al, 1995; Serrano y Galindo, 2007).

La mayoría de los estudios relacionados con el control de *Phytophthora* con *Trichoderma* se relaciona con los diferentes mecanismos de acción directa (Vinale et al, 2008). Sin embargo, la inducción de los mecanismos de defensa por *Trichoderma* ha sido descrita por diferentes autores, aunque aún permanece marginalmente abordado (Nawrocka y Malolepsza, 2013).

Las diferentes especies de *Trichoderma* colonizan las raíces de las plantas, tanto en la parte externa como internamente, y al igual que en ocurre en otras interacciones biológicas se desencadenan señales químicas (Mukherjee et al, 2012). Así también se ha observado que en la interacción planta-*Trichoderma* se libera una gran cantidad de “elicitors” o

inductores de defensa por las hifas de *Trichoderma* induciendo diferentes tipos de señales transmitidas dentro de la planta entre los que se incluyen moléculas como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) o especies reactivas de oxígeno (ROS), que disparan la expresión de proteínas de defensa (Jayalakshmi et al, 2009; Sriram et al, 2009). Como resultado de esta activación de genes, la planta produce enzimas envueltas en la supresión directa del patógeno y aumenta las barreras bioquímicas y estructurales en la planta. Dependiendo de la especie de *Trichoderma*, la reacción de defensa activada por el hongo puede oscilar entre dos tipos de resistencia sistémica: la resistencia sistémica inducida (ISR) o la resistencia sistema adquirida (SAR). Sin embargo, los mecanismos de defensa y vías de señalización implicadas en estos mecanismos de resistencia, aún no ha sido clarificado completamente (Nawrocka y Malolepsza, 2013). Con respecto al control de *Phytophthora* por la inducción de defensa por *Trichoderma*, existen pocos reportes, uno de ellos es el realizado por Sriram y colaboradores (2009) que evaluaron el potencial de diferentes cepas de *T. harzianum* para inducir una resistencia sistémica contra *Phytophthora capsici* en plántulas de chile. Los efectos que observaron fueron una inducción de actividad de glucanasas y un aumento en el contenido de compuestos fenólicos. Se evaluaron algunos posibles inductores que fueron considerados como prometedores en la inducción de una resistencia sistémica inducida (ISR). Por otra parte, Moran-Diez y colaboradores (2009), realizaron la evaluación de los genes expresados diferencialmente en el sistema *Trichoderma* spp.-plántulas de tomate-patógeno. A partir de esto fue posible la identificación de un gen relacionado con la endopoligalacturonasa (endoPG) de *Trichoderma harzianum*, que se incrementa ante la presencia de *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum*. Este gen fue relacionado con la colonización de raíces de *T. harzianum* y la posterior inducción de los mecanismos de defensa, utilizando estudios con mutantes de este gen, que presentaron una disminución de la colonización de raíces de *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, aún falta mucha información que esclarecer las interacciones entre *Trichoderma* y la planta a la que está asociada.

El uso de microorganismos ya sea parasitarios, depredadores o antagonistas ha sido la principal premisa del control biológico. Sin embargo, actualmente se han generado estudios de la interacción planta-patógeno, que han permitido elucidar los mecanismos de

patogénesis de una gran cantidad de fitopatógenos, así como los mecanismos de defensa vegetal que utiliza la planta para contrarrestar a los patógenos. Con este conocimiento, el control biológico se ha visto fortalecido con nuevos compuestos y moléculas que son derivados de los fitopatógenos, microorganismos de control biológico, o incluso moléculas señal de la propia planta. Entre estas moléculas destacan los polímeros como la quitina y su derivado el quitosano, que en la actualidad por sus propiedades como inductores de mecanismos de defensa vegetal, además de su inocuidad para la salud humana y el medio ambiente, han surgido como fuertes candidatos para sustituir de manera efectiva productos químicos tóxicos y contaminantes. Los inductores de mecanismos de defensa vegetal que presentan un efecto protector en las plantas equivalentes a “vacunas”, al provocar un efecto de “encendido” o “priming” en la planta, que la prepara de manera efectiva contra el ataque de plagas y enfermedades utilizando sus propios mecanismos de defensa. En este sentido podemos encontrar derivados de microorganismos o plantas incluyendo metabolitos de bajo peso molecular, péptidos, proteínas y oligosacáridos, así como derivados químicos que presentan una toxicidad baja o nula (Mejía-Teniente et al, 2010; Thakur y Sohal, 2013). El uso del quitosano y sus derivados ha sido una alternativa al promover la inducción de mecanismos de defensa vegetal contra diferentes fitopatógenos, incluyendo *Phytophthora* sp., sensibilizándolas para responder más rápidamente a su ataque. El quitosano también tiene otra propiedad como un agente antimicrobiano, al inhibir el crecimiento de hongos, bacterias y virus fitopatógenos. Entre los mecanismos de defensa que el quitosano activa, se encuentran la síntesis de lignina y calosa, la inducción de la fenilalanina amonio liasa (PAL), biosíntesis de fitoalexinas, producción de inhibidores de proteasas y proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) como son: quitinasas, glucanasas y peroxidases (POD; Laréz-Velásquez, 2008; Rodríguez-Pedroso, 2009).

El uso del quitosano y *T. harzianum* en el control de *Phytophthora* ha sido descrito en algunos trabajos con resultados contrastantes, considerando que su efectividad va en función de su concentración, grado de polimerización y efecto en la planta (Cruz-Ortega, 2012; Medina-Fuentes, 2013). Partiendo de estos conocimientos, se considera que el uso de quitosano y *T. harzianum* para el control de *Phytophthora drechsleri* asociado a la pudrición de raíz de la nochebuena podría llegar a ser una opción al manejo convencional

con agroquímicos. Aunado a esto, se considera importante elucidar los mecanismos implicados en este control, principalmente lo que respecta a la inducción de la defensa vegetal, un conocimiento que no ha sido ampliamente abordado. Por este motivo, en este capítulo se evaluaron los efectos en los mecanismos de defensa vegetal contra *Phytophthora* de la aplicación individual y previa del quitosano y de *T. harzianum* en plántulas de nochebuena infectadas con *Phytophthora drechsleri*.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas enraizadas de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) de la variedad Freedom Red de aproximadamente dos meses de edad. Las condiciones de cultivo se describieron previamente (**Apartado 2.2.1**).

3.2.2 Material biológico

Se utilizó la cepa patogénica de *Phytophthora drechsleri* (PHD) aislada de plantas con síntomas de enfermedad de nochebuena (**Apartado 2.2.2**). Este aislamiento fue mantenido como cultivo “padre” en tubos con medio de cultivo V8 clarificado.

También se utilizó una cepa comercial de *Trichoderma harzianum* (T-22), aislada a partir del producto PHC T-22®. Este aislamiento fue mantenido como cultivo “padre” en tubos con medio de cultivo agar V8.

3.2.2.1 Obtención de inóculos fúngicos

Para la obtención del inóculo del patógeno *Phytophthora drechsleri* (PDH), el oomiceto se creció sobre agar V-8 clarificado, se indujo la producción de esporangios y zoosporas. Se preparó una suspensión de zoosporas con una concentración final de 1×10^5 zoosporas/mL (**Apartado 2.2.3.1**).

Para la obtención del inóculo del microorganismo de control biológico *T. harzianum* (TH), el hongo fue crecido en medio agar V8, después de 10 días de crecimiento se recolectaron las esporas agregando agua estéril y por medio de un barrido con pincel. A la suspensión de esporas resultante se le realizó el conteo de esporas en cámara Neubauer y se ajustó a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL.

3.2.3 Solución de quitosano al 0.01%

Se utilizó quitosano de la Marca Sigma Aldrich (chitosan from shrimp shells, practical grade). Se preparó una solución stock de quitosano al 1% (10g/L) disuelto en ácido acético al 1% con un pH de 5.75 previamente ajustado y esterilizado en autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 minutos. A partir de esta solución stock se preparó una solución con una concentración final de 0.01% de quitosano empleando ácido acético al 1% (pH 5.75) como disolvente.

3.2.4 Evaluación del grado de protección contra *Phytophthora drechsleri* en plántulas de nochebuena con la aplicación de quitosano y *Trichoderma harzianum*

Se evaluó el grado de protección contra la infección de *Phytophthora drechsleri* (PHD) en nochebuena con la inoculación de *Trichoderma harzianum* (TH) o quitosano (QT). Las plántulas enraizadas de nochebuena fueron colocadas en macetas en sustrato estéril (6:2:1 peat-moss, arena y vermiculita) y colocadas bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento a temperatura constante de 28°C y un fotoperiodo de 16H luz/8H oscuridad. Después de 15 días del trasplante, las plántulas fueron nuevamente trasplantadas a sustrato estéril e inoculadas con 5 mL de la suspensión de zoosporas de *P. drechsleri* (PHD). Posterior a la inoculación, las plántulas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones en cámaras de crecimiento durante quince días. Al testigo (☉) se le agregaron 5 mL de agua estéril en lugar de la suspensión de zoosporas. A las plántulas que recibieron tratamientos con *T. harzianum* (TH) se les realizaron dos inoculaciones con 5 mL de la suspensión de esporas de *T. harzianum*, la primera inoculación se realizó tres días después del primer trasplante y la segunda inoculación se realizó catorce días después del primer trasplante. A las plántulas que recibieron tratamientos con quitosano (QT), se les realizó una sola aplicación de 5 mL de la solución de quitosano al 0.01% a la base de la planta, al día 11 después del primer trasplante. Se tomaron lecturas de sintomatología y registro fotográfico el día del trasplante (D0) y los días 1 (D1), 10 (D10) y 15 (D15) después de la inoculación con PHD. Se realizaron 20 repeticiones por tratamiento. Se evaluó el grado de severidad de la enfermedad descrita en el **Capítulo II, Figura 2.1**.

3.2.5 Evaluación de los mecanismos de defensa vegetal relacionados con el grado de protección contra *Phytophthora drechsleri* en nochebuena con la aplicación de quitosano y *Trichoderma harzianum*

3.2.5.1 Evaluación de mecanismos de defensa relacionados con la resistencia contra *Phytophthora drechsleri*.

Se utilizaron las condiciones de la evaluación del grado de protección contra *P. drechsleri* (PHD) en plántulas de nochebuena con la aplicación de quitosano y *T. harzianum* (**Apartado 3.2.4**). Las lecturas se realizaron el día del trasplante (D0) y los días 1 (D1), 10 (D10) y 15 (D15) después de la inoculación con PHD. Se tomaron 5 plántulas por cada tratamiento para realizar extractos de raíz para cada una de las evaluaciones relacionadas con la resistencia a *Phytophthora*. Los mecanismos de defensa vegetal evaluados fueron aquellos inducidos por quitosano y *Trichoderma* como la producción de componentes fenólicos totales, la actividad de las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) con actividad de quitinasas, β -1,3-glucanasa y la actividad de la peroxidasa (Sanzón-Gómez, 2010; Chen et al, 2008). Cada una de estas evaluaciones se describe de manera detallada en el **Apartado 2.2.4.2**.

- Evaluación de compuestos fenólicos totales.
- Determinación de la actividad de la 1,3- β -glucanasa (Ozgonen *et al*, 2009).
- Determinación de actividad de quitinasas (Molano *et al*, 1977; Pérez *et al*, 1983 y Roncero *et al*, 1985).
- Determinación de actividad de peroxidasa (PO) (Putter, 1974 y Malik *et al*, 1980).

3.2.5.2 Evaluación de mecanismos de defensa tempranos en raíces de nochebuena

Para esta evaluación se utilizaron plántulas de nochebuena previamente aclimatadas bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento. Las condiciones de aplicación de los tratamientos con *T. harzianum* (TH) y quitosano (QT), fueron las mismas que en la evaluación del grado de protección contra *Phytophthora drechsleri* (**Apartado 3.2.4**), con la diferencia que estas plántulas no fueron trasplantadas en sustrato estéril, en su lugar estas

plántulas fueron desinfectadas superficialmente y colocadas en cámaras húmedas, sobre papel toalla estéril humedecido. La inoculación del patógeno fue de manera directa aplicando una gota de aproximadamente 5 μL en secciones de la raíz. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y se colocaron en cuartos de cultivo a 25°C a fotoperiodo 16H luz/8H oscuridad. Se tomaron muestras de las secciones inoculadas a las 24 y 48 horas, y evaluando los mecanismos de defensa vegetal que se inducen de manera temprana en la interacción planta-*Phytophthora* (Sanzón-Gómez, 2010; Chen et al, 2008). Los mecanismos evaluados fueron: la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), respuesta hipersensible (HR) y en la fortificación de la pared se observó la producción de calosa y lignina. Cada una de estas evaluaciones se describe de manera detallada en el **Apartado 2.2.4.1:**

- Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Allardice, 2011).
- Evaluación de la Respuesta Hipersensible (Allardice, 2011).
- Producción de calosa (Allardice, 2011).
- Producción de lignina (Allardice, 2011).

3.2.5.3 Observación histológica de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena

De las raíces inoculadas con la suspensión de esporas de *P. drechsleri*, se tomaron segmentos de raíz con síntomas de enfermedad, se colocaron en solución fijadora FAA a 4°C. Estos segmentos fueron teñidos con lactoglicerol-azul de tripano al 0.5% por 30 min. Al terminar el proceso de tinción se realizaron lavado con lactoglicerol para eliminar el exceso de colorante y se realizó una segunda tinción con Uvitex 2B al 1% por aproximadamente 30 min. Posteriormente se realizaron las observaciones al microscopio equipado con epifluorescencia y filtros adecuados para el Uvitex 2B (Patto y Niks, 2001).

3.2.6 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental en bloques completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y cuando hubo diferencias estadísticas significativas, se realizaron pruebas de separación de medias con Tukey $p \leq 0.05$ ambos análisis se realizaron con el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Evaluación del grado de protección de la aplicación de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en plántulas de nochebuena

Se dio seguimiento al efecto protector de *Trichoderma harzianum* (TH) y la aplicación del quitosano (QT) en plantas infectadas con *Phytophthora drechsleri* (PHD). Por otra parte, se ha reportado que este polímero además de su efecto como protector presenta actividad antimicrobiana contra algunas cepas de *Phytophthora* (Lárez-Velásquez, 2008).

Efecto del quitosano.- El efecto protector del quitosano es evidente a nivel foliar en las plántulas después de 24h de la inoculación con PHD (**Fig. 3.1**). Las plantas presentaron signos de marchitez y hojas con pérdida de turgencia. Sin embargo, no se observó un daño a nivel de la raíz o en el tejido vascular, aunque si la presencia de un oscurecimiento de las raíces en comparación con el testigo (Ø) y PHD (**Fig. 3.2**). En los resultados observados a los 10 días después de la inoculación de PHD, se mostró que las plántulas presentaron un efecto protector menor a nivel foliar, donde se encontraron plántulas sin síntomas evidentes de marchitez, en contraste con las no inoculadas con PHD (**Fig. 3.1**). El efecto en las raíces y tejido vascular a los 10 días después de la inoculación con PHD, es equivalente al daño observado a las 24h después de su inoculación en las plantas infectadas con PHD (**Fig. 3.2**). Esto debido a que el daño observado en el tejido vascular no fue extenso. Las raíces presentaron oscurecimiento, aunque no se observó una pérdida de éstas. Finalmente, a los 15 días después de la inoculación con PHD, las plántulas presentaron síntomas de enfermedad a nivel foliar aunque a menor proporción que con solo PHD (**Fig. 3.1**). Con respecto a los síntomas observados en raíces y tejido vascular, se observó que habían plántulas que presentaban síntomas avanzados de enfermedad, pero también plántulas que los síntomas eran ligeros. El daño observado fue equivalente al observado a los 10 días después de la inoculación con PHD. Se observó daño en tejido vascular con presencia de necrosis y formación de tejido lignificado, que se relacionó con pudrición de raíz. La raíz presentó un oscurecimiento marcado y se empieza a observar una disminución en la cantidad de raíces. De manera general, el quitosano presenta una protección contra la

infección de PHD, al disminuir los síntomas de la enfermedad, aun cuando esta protección se relacionó con el retraso de los síntomas de la enfermedad (**Fig. 3.2**).

Efecto de Trichoderma.-La inoculación con *Trichoderma harzianum* (TH) tuvo un efecto a nivel foliar después de las 24h de inocular PHD (**Fig. 3.1**). Las plantas presentaron signos de déficit hídrico en las hojas, aunque estos síntomas fueron menos severos a los observados en QT. Sin embargo, no se observó un daño a nivel de la raíz o en el tejido vascular en contraste a PHD e incluso que QT (**Fig. 3.2**). El efecto observado a los 10 días después de la inoculación de PHD, mostró que las plántulas presentaron un daño importante a nivel foliar. Se observaron síntomas marcados de marchitez y la pérdida de hojas, siendo mucho mayor que incluso en PHD (**Fig. 3.1**). Sin embargo, de nueva cuenta no se observó daño en el tejido vascular y las raíces no presentaron un oscurecimiento marcado, en contraste a lo que se observó en las plántulas inoculadas con PHD y QT (**Fig. 3.2**). Finalmente, a los 15 días después de la inoculación con PHD, las plántulas presentaron una recuperación marcada a nivel foliar. La presencia de marchitez fue menor y el aspecto de las plantas presentó una mejoría con respecto a PHD y QT (**Fig. 3.1**). Con respecto a las raíces y tejido vascular, no se observaron síntomas de enfermedad, las raíces presentan un ligero oscurecimiento y el daño en el tejido vascular cuando se presentó, fue ligero, equivalente a los síntomas que se observaron a las 24h después de inocular PHD. De manera general, la inoculación con *T. harzianum* presentó una protección contra la infección de PHD, al disminuir de manera significativa los síntomas de la enfermedad a nivel de raíz y tejido vascular (**Fig. 3.2**). Sin embargo, a nivel foliar se observó una respuesta negativa por parte de las plántulas, que podría estar relacionado con el grado de la respuesta en la planta (**Fig. 3.1**). Esta respuesta podría indicar que la planta responde a la infección de PHD, esta respuesta en primera instancia se observó cómo negativa, aunque después la planta se recuperó de manera efectiva, al controlarse el proceso de infección de PHD. De acuerdo a la escala de patogenicidad las plantas inoculadas con *T. harzianum* presentaron un grado de 2 (**Fig. 3.2**).

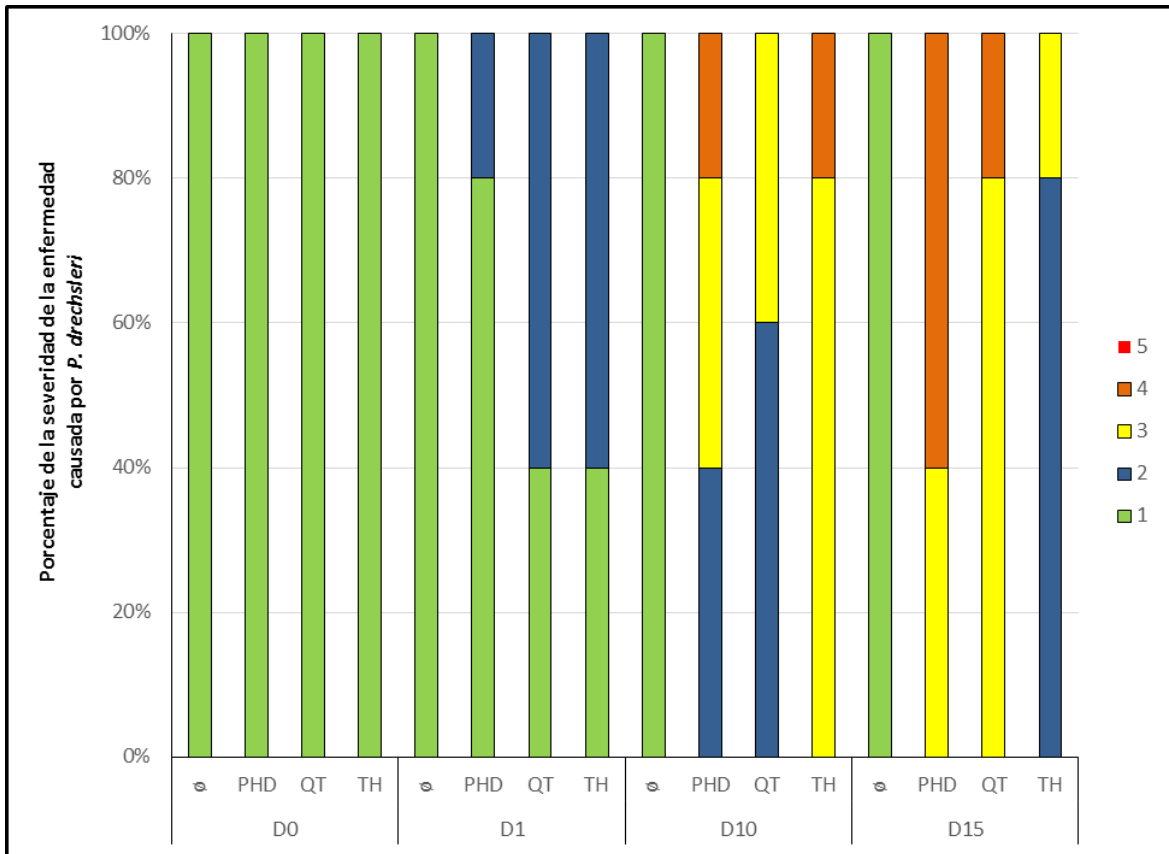


Figura 3.1. Efecto del quitosano y *Trichoderma harzianum* en el progreso de la enfermedad provocada por la infección de *Phytophthora drechsleri* en plántulas de nochebuena. Ø: Testigo, plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD**: plantas inoculadas con *P. drechsleri* a concentración de 1×10^5 zoosporas/ml. **QT**: plantas con la aplicación de quitosano al 0.1%. **TH**: plantas inoculadas con el hongo *Trichoderma harzianum* a concentración de 1×10^6 esporas/ml. **D0**: Día del trasplante y previo a la inoculación del patógeno. **D1**: Día 1 después de la inoculación de PHD; **D10**: Día 10 después de la inoculación de PHD; **D15**: Día 15 después de la inoculación de PHD. **1** (■): Planta sana; **2** (■): Planta con síntomas ligeros de enfermedad; **3** (■): Planta con síntomas evidentes de enfermedad; **4** (■): Planta con síntomas severos de enfermedad; **5** (■): Plantas con síntomas terminales de enfermedad o planta muerta.

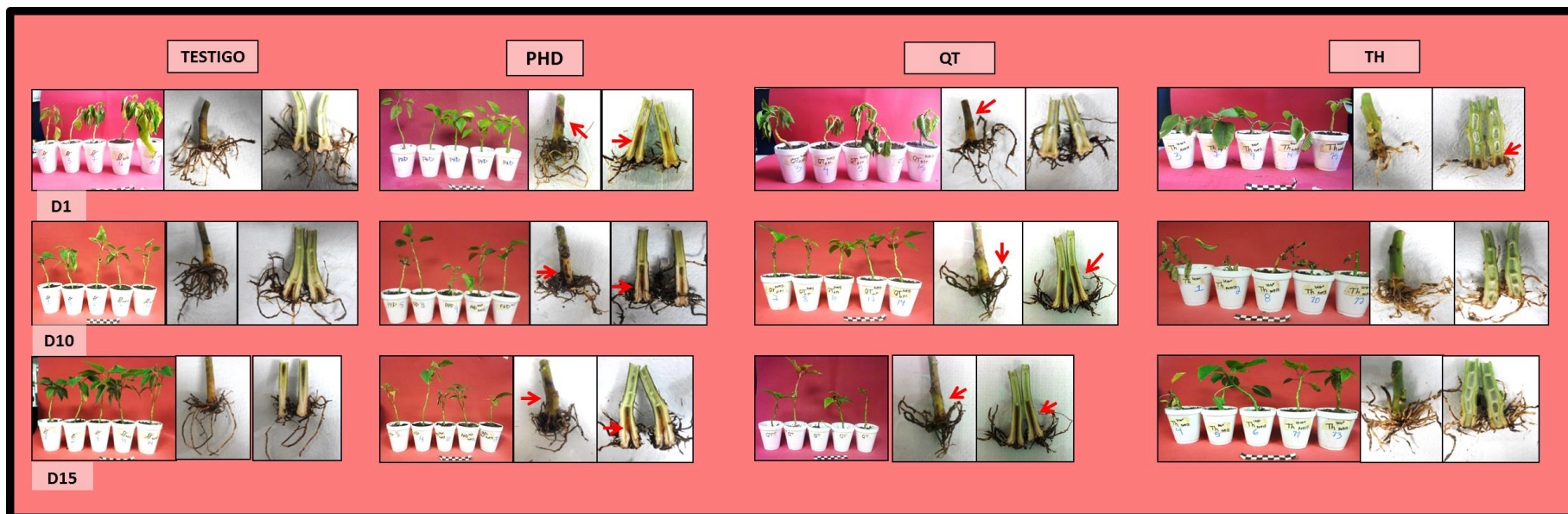


Figura 3.2. Efecto protector por la aplicación de quitosano y *Trichoderma harzianum* en plantas de nochebuena inoculadas con el patógeno. Se observaron los síntomas en las plantas de nochebuena ante la infección de *Phytophthora drechsleri*, en la planta completa. Donde **TESTIGO**: Plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD**: plantas inoculadas con la cepa patogénica *P. drechsleri* con una concentración de 1×10^5 zoosporas/ml. **QT**: plantas con la aplicación de quitosano al 0.1%. **TH**: plantas inoculadas con *Trichoderma harzianum* a concentración de 1×10^6 esporas/ml. **D1**: Día 1 después de la inoculación de PHD; **D10**: Día 10 después de la inoculación de PHD; **D15**: Día 15 después de la inoculación de PHD. Las flechas indican el daño por la infección de *Phytophthora drechsleri*.

3.3.2 Evaluación de mecanismos de defensa tempranos inducidos por la aplicación de quitosano y *Trichoderma harzianum* en raíces de nochebuena

Se seleccionaron algunos mecanismos de defensa que se inducen de manera temprana en interacciones incompatibles de diferentes especies del género *Phytophthora*. Estos mecanismos incluyeron aquellos relacionados con la inducción de la respuesta hipersensible (HR), como son la muerte celular (PCD) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), considerado como una de las principales estrategias de la planta para detener la infección de *Phytophthora* en su etapa biotrófica (Candole et al, 2012). Además se consideró evaluar el fortalecimiento de la pared celular, un mecanismo relacionado con evitar la penetración del patógeno a la célula (Madriz-Ordeñana, 2002). El fortalecimiento relacionado con la producción de calosa y lignina fueron los seleccionados (Mejía-Teniente et al, 2010). La respuesta por la inoculación de *T. harzianum* (TH) y quitosano (QT) fueron diferentes entre sí (**Fig. 3.3** y **3.4**). Se observó que los mecanismos relacionados con la HR son inducidos en mayor medida por el quitosano (QT) al observarse una mayor producción de ROS y PCD después de las 24h de inoculado PHD. La respuesta observada para la producción de ROS con la aplicación de QT fue que a las 24h se observó un aumento considerable en la producción de ROS que disminuyó a las 48h, aunque esta respuesta es aún mayor que en las plantas infectadas con PHD. En este mismo sentido, se observó que la PCD tiene el mismo comportamiento con la producción de ROS, por lo cual puede relacionarse el aumento de la producción de ROS con la inducción de PDC en las plántulas inoculadas con QT (**Fig. 3.3**).

En lo que respecta al fortalecimiento de la pared celular, el quitosano (QT) indujo la formación de calosa y lignina, aunque fue en menor grado que *Trichoderma* (TH), pero mayor que con PHD (**Fig. 3.4**). El quitosano indujo la producción de calosa y lignina, en mayor medida que PHD.

Por otra parte, con la inoculación de *Trichoderma harzianum* (TH), se observó una inducción de la producción de ROS y PCD, aunque esta respuesta fue menor con respecto a la observada en QT (**Fig. 3.3**). La respuesta observada con la aplicación de TH a las 24h fue un ligero aumento en la producción de ROS que fue aumentando a las 48h, hasta ser equivalente a lo observado en la respuesta inducida por el QT. En este mismo sentido, se

observó que la PCD tiene el mismo comportamiento con la producción de ROS, con un ligero aumento a las 24h que se incrementa considerablemente a las 48h (**Fig. 3.3**).

En lo que respecta al fortalecimiento de la pared celular, *Trichoderma* (TH) indujo la formación de calosa y lignina, de manera importante (**Fig. 3.4**). Se observó un aumento importante en la producción de calosa a las 24h después de la inoculación de PHD, observándose una disminución a las 48h. En cuanto a la producción de lignina, *Trichoderma* (TH) indujo su acumulación de manera importante a partir de las 24h y aumentando a las 48h (**Fig. 3.4**).

A partir de estos resultados se observó que la respuesta inducida por el quitosano (QT) es mucho más rápida que la inducida por *Trichoderma* (TH), principalmente a nivel de la respuesta hipersensible (HR). Sin embargo, es importante destacar que *Trichoderma* (TH) indujo un fortalecimiento de la pared celular mayor que lo observado en el quitosano (QT) (**Fig. 3.3 y 3.4**).

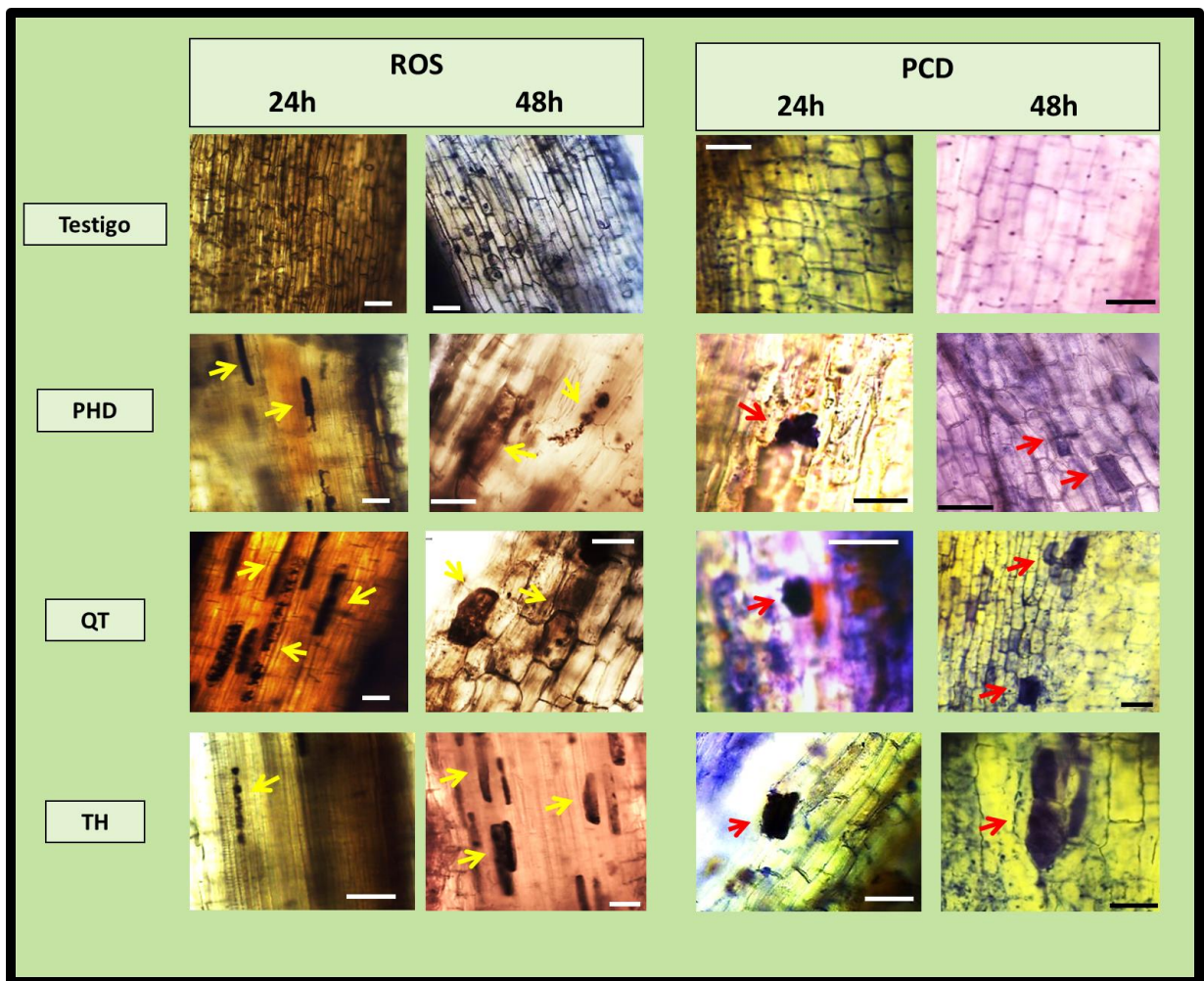


Figura 3.3. Mecanismos de defensa relacionados con la respuesta hipersensible inducidos tempranamente por la aplicación de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena. Se tomaron segmentos de raíces de nochebuena 24 y 48 horas después de la inoculación con *Phytophthora drechsleri* y se observaron al microscopio. **TESTIGO:** Plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD:** Plántulas inoculadas con *P. drechsleri*. **QT:** Plántulas inoculadas con quitosano; **TH:** Plántulas inoculadas con *Trichoderma harzianum*. **ROS:** Acumulación de especies reactivas de oxígeno en raíces de nochebuena; **PCD:** Presencia de muerte celular programada en raíces. La barra equivale a 50 μm . Las flechas indican la presencia de la respuesta de cada una de las evaluaciones.

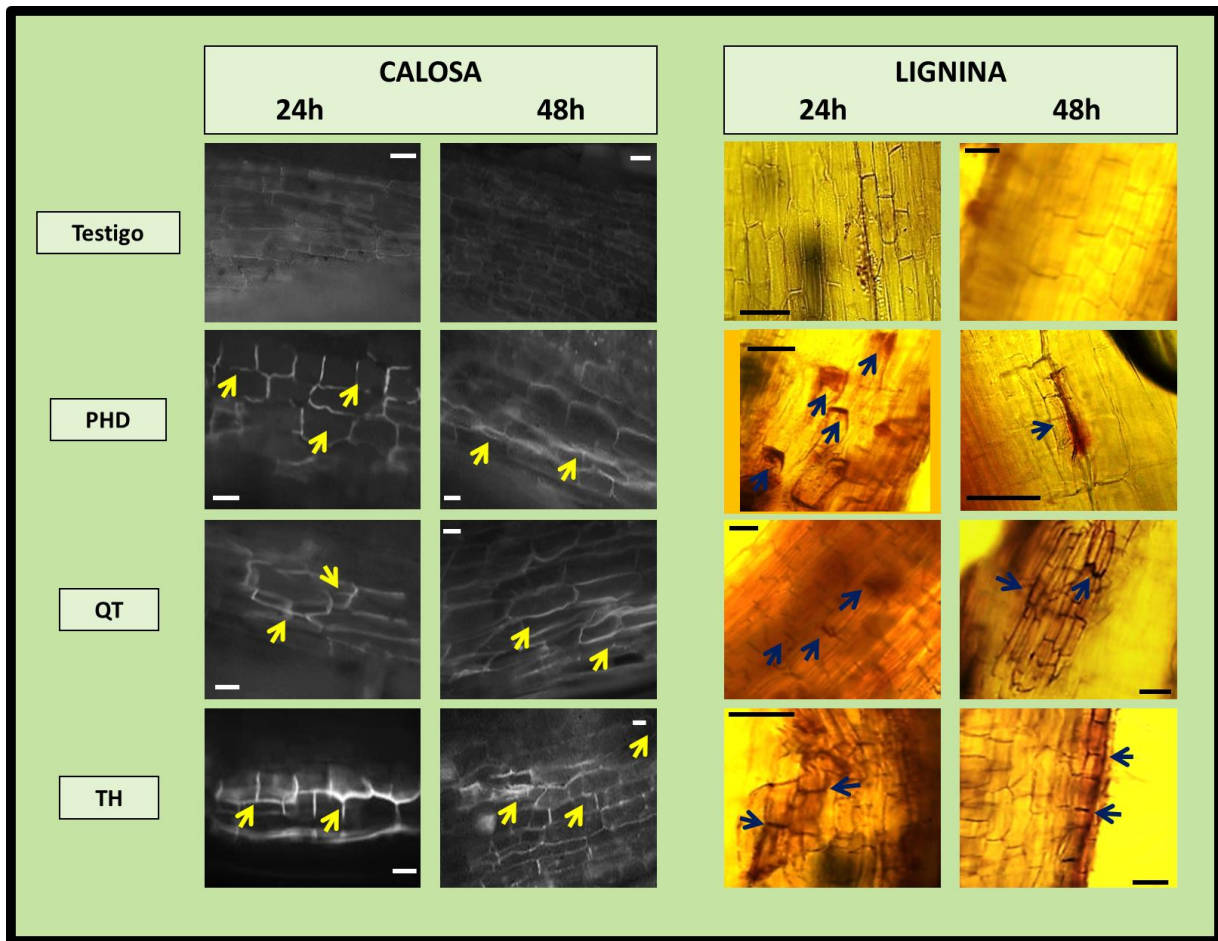


Figura 3.4. Mecanismos de defensa relacionados con el fortalecimiento de la pared celular inducidos por la aplicación de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena. Se tomaron segmentos de raíces de nochebuena 24 y 48 horas después de la inoculación con *Phytophthora drechsleri* y se observaron al microscopio. **TESTIGO:** Plántulas inoculados con agua estéril; **PHD:** Plántulas inoculadas con *P. drechsleri*. **QT:** Plántulas inoculadas con quitosano; **TH:** Plántulas inoculadas con *Trichoderma harzianum*; **CALOSA:** Acumulación de calosa en raíces; **LIGNINA:** Producción de lignina en raíces. La barra equivale a 50 μm . Las flechas indican la presencia de la respuesta de cada una de las evaluaciones.

3.3.3 Evaluación de mecanismos de defensa relacionados con la resistencia contra *Phytophthora drechsleri* inducidos por la aplicación de quitosano y *Trichoderma harzianum*

Se seleccionaron algunos mecanismos de defensa que se relacionan con la resistencia contra diferentes especies del género *Phytophthora*. Estos mecanismos incluyeron la producción de fitoalexinas o fitoanticipinas, que fueron relacionados con la producción de compuestos fenólicos totales (García-Mateos y Pérez-Leal, 2003), así como la actividad de enzimas relacionadas con las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) como son las β 1,3-glucanasas, quitinasas y peroxidadas (Yedidia et al, 2000).

En cuanto a la producción de fitoalexinas previa a la inoculación con el patógeno (D0), se observó que aquellas plántulas que fueron inoculadas con quitosano (QT) y *Trichoderma* (TH), presentaron un nivel de compuestos fenólicos menor a la del testigo y a las inoculadas con *Phytophthora drechsleri* (PHD), sobresaliendo en niveles bajos las plántulas inoculadas con TH (**Fig. 3.5 C, D0**). A las 24h de inoculado el patógeno, las plántulas sin tratamiento (PHD) no presentaron diferencias con respecto al testigo, mientras que las plántulas inoculadas con QT y TH presentaron un aumento importante en la producción de compuestos fenólicos, hasta igualar los niveles observados en el testigo (**Fig. 3.5 C, D1**). A los 10 días después de la inoculación con el patógeno, las plantas enfermas (PHD) y las inoculadas con quitosano (QT) mantuvieron los niveles observados al día 1 (D1), mientras que TH si presentó una disminución significativa con respecto a D1. Finalmente en el día 15 después (D15) de la inoculación con PHD, las diferencias observadas fueron mínimas destacando las plántulas inoculadas con QT, que fueron significativamente diferentes a las plántulas infectadas (PHD).

Con respecto a la actividad de proteínas PR, la actividad relacionada con las β 1,3-glucanasas ha sido relacionado con una respuesta efectiva de resistencia contra diferentes especies del género *Phytophthora*. En este caso, se observó que la inoculación de quitosano (QT) y *Trichoderma* (TH) provocaba una disminución significativa de la actividad de estas enzimas previo a la inoculación con *P. drechsleri* (PHD) (**Fig. 3.5 A, D0**). Sin embargo, a las 24h después de la inoculación del patógeno (D1), se observó una respuesta importante

en las plántulas inoculadas con QT y TH, hasta igualar los niveles encontrados en los testigos. A los 10 días después de la inoculación con el patógeno, se observó que las plantas enfermas presentaron una disminución significativa en la actividad de β 1,3-glucanasas al igual que las inoculadas con TH, no se observó variación en el testigo y QT (**Fig. 3.5 A, D10**). Finalmente en el día 15 después de la inoculación con PHD (D15), los niveles de actividad observados son prácticamente iguales para las plantas testigo, infectadas (PHD) y TH, mientras que QT presentó un nivel mayor que las anteriores (**Fig. 3.5 A, D15**).

Otra de las enzimas se relacionan con una efectiva defensa para algunas especies del género *Phytophthora* son aquellas que presentan una actividad de quitinasas. Con respecto a esta actividad se observó que la inoculación de quitosano (QT) y *Trichoderma* (TH) provocaba una disminución significativa de la actividad de estas enzimas previo a la inoculación con *P. drechsleri* (PHD) (**Fig. 3.5 C, D0**). Sin embargo, a las 24h después de la inoculación del patógeno (D1), se observó una respuesta importante en las plántulas inoculadas con QT y TH. En el caso de las plántulas inoculadas con QT, la respuesta observada fue equivalente al testigo y las plántulas infectadas (PHD), mientras que las plántulas inoculadas con TH, esta respuesta fue mucho mayor (**Fig. 3.5 D, D1**). A los 10 días después de la inoculación con el patógeno, se observó que las plántulas testigo, infectadas (PHD) e inoculadas con QT no presentaron variación significativa, en contraste TH presentó una disminución significativa el día 10 después de la inoculación con el patógeno (**Fig. 3.5 D, D10**). Finalmente en el día 15 después de la inoculación con PHD (D15), los niveles de actividad observados son prácticamente iguales para las plantas testigo e infectadas (PHD), mientras que QT y TH presentaron una disminución en cuanto a la actividad de quitinasas (**Fig. 3.5 D, D15**).

Finalmente, en lo que respecta a las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR), se evaluó la actividad de enzimas peroxidadas. La actividad de estas enzimas ha sido relacionada con la resistencia a diferentes ataques de hongos fitopatógenos, sin embargo, su efecto principal está relacionado con un control del daño causado por la respuesta hipersensible (HR), principalmente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este sentido, la contención del daño causado por las ROS, así como la señal relacionada con estas moléculas sería una respuesta indirecta de defensa. Con respecto a

esta actividad se observó que la inoculación de quitosano (QT) y *Trichoderma* (TH) provocó un aumento significativo en la actividad de peroxidasas, siendo mayor en las plántulas inoculadas con TH (**Fig. 3.5 B, D0**). A las 24h después de la inoculación del patógeno (D1), se observó una respuesta importante en las plántulas inoculadas con el patógeno con un aumento considerable en la actividad de peroxidasas, mientras que en las plántulas inoculadas con QT y TH, se observó un efecto contrario con una importante disminución de esta actividad (**Fig. 3.5 B, D1**). A los 10 días después de la inoculación con el patógeno, se observó que las plántulas testigo, infectadas (PHD) y las inoculadas con QT no presentaron variación significativa con una actividad baja, en contraste TH presentó un aumento significativo en esta actividad (**Fig. 3.5 B, D10**). Finalmente en el día 15 después de la inoculación con PHD (D15), los niveles de actividad observados en las plantas infectadas (PHD) y las inoculadas con TH fueron bajas en contraste con las plántulas inoculadas con QT (**Fig. 3.5 B, D15**).

De manera general, los resultados mostraron que la inoculación de quitosano (QT) y *Trichoderma harzianum* (TH) previa a la inoculación con *Phytophthora drechsleri* (PHD), indujeron un nivel de protección contra la infección de PHD. Esta protección fue variable dependiendo del tratamiento, destacando el tratamiento con TH, que mostró una mejor protección a nivel del daño en raíces y tejido vascular. Además, se observó una inducción de los mecanismos de defensa vegetal de manera diferencial dependiendo del tratamiento. Destacando los mecanismos inducidos de manera temprana.

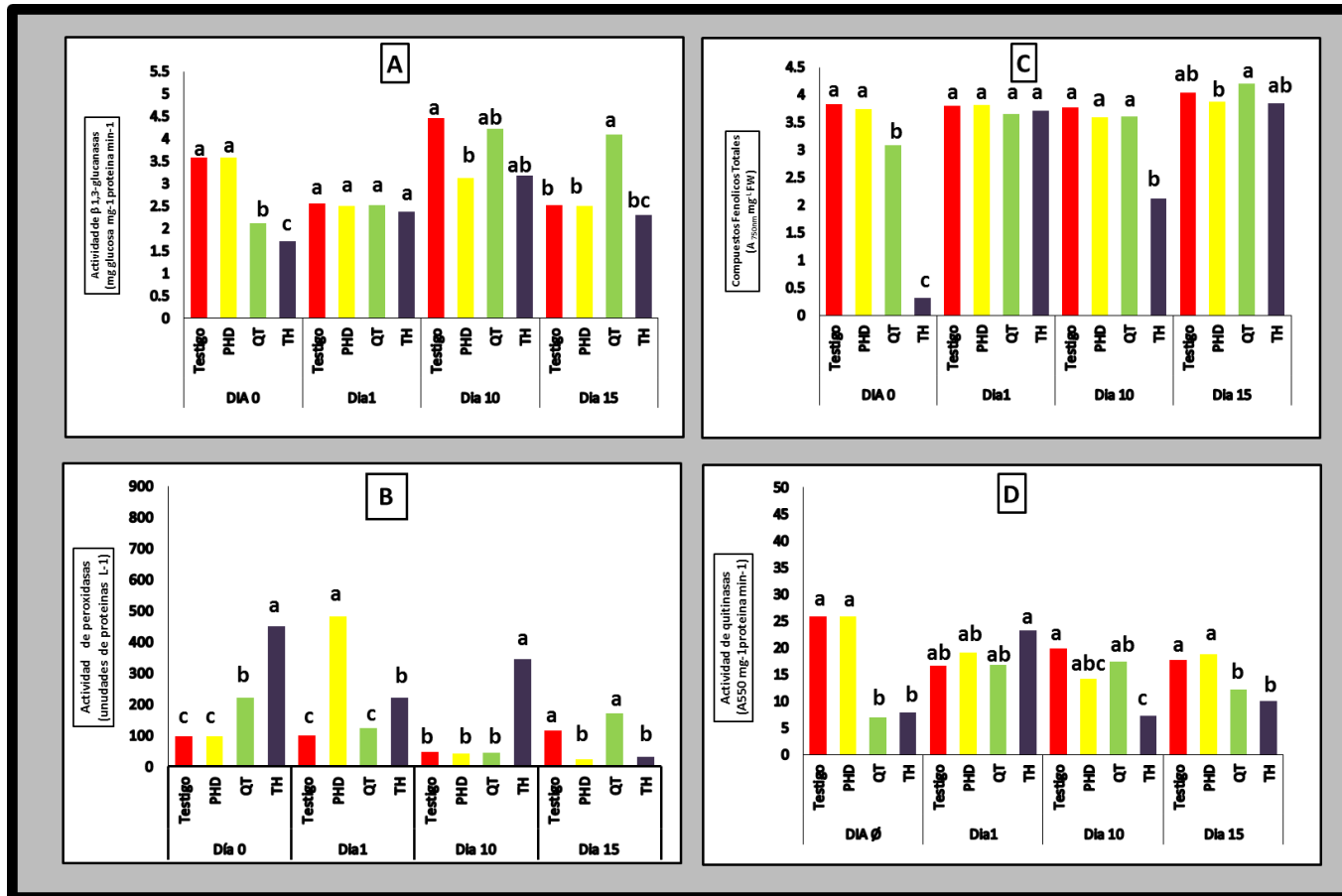


Figura 3.5. Mecanismos de defensa relacionados con la resistencia inducidos por la aplicación de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena. TESTIGO: Plántulas inoculadas con agua estéril; PHD: Plántulas inoculadas con *Phytophthora drechsleri*. : QT: plantas con aplicación de quitosano al 0.1%; TH: plantas inoculadas con *Trichoderma harzianum* con una concentración de 1×10^6 . A: Actividad de β 1,3- glucanasas. B: Producción de compuesto fenólicos; C: Actividad de peroxidasas; D: Actividad de quitinasas. Se evaluó una n=5, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Tukey con $P \leq 0.05$.

3.5 DISCUSIÓN

La enfermedad de la marchitez y pudrición de raíz ocasionado por *Phytophthora* sp., causa graves daños en el cultivo generando grandes pérdidas económicas. En consecuencia, para su control se ha hecho uso principalmente de agroquímicos, sin embargo estos ocasionan daños al medio ambiente y salud humana, además de elevar los costos de producción de manera significativa. Debido a esto, se han buscado alternativas de control biológico como es el uso de microorganismos con actividad antagónica y actualmente el uso de inductores de mecanismos de defensa vegetal, permitiendo responder rápidamente al ataque del patógeno. Uno de los principales microorganismos utilizados en el control biológico son las cepas de *Trichoderma* sp., su uso se debe a la facilidad que presenta el hongo para colonizar las raíces de las plantas, además de mostrar una amplia gama de hospedantes. Se ha reportado que algunas cepas de *Trichoderma* presentan un efecto positivo en el control de algunos oomicetos fitopatógenos dentro de los cuales se encuentra *Phytophthora* sp., (Lorenzo, 2001). La aplicación de *Trichoderma*, una vez formulado el producto es fácil, pues puede añadirse directamente empleando cualquier método convencional. Por otra parte, el quitosano es un polímero derivado de la quitina que ha sido ampliamente estudiado, al presentar una gran cantidad de propiedades que han sido explotadas en diferentes industrias (Lárez et al, 2008; Porras et al, 2009) incluyendo la agrícola, en donde ha demostrado un prometedor efecto en la protección de las plantas contra diferentes enfermedades (Lárez et al, 2008). Esta protección va dirigida principalmente, a una inducción de diferentes mecanismos de defensa vegetal que se refleja en la resistencia a la enfermedad (Rodríguez et al, 2007).

A partir de estos conocimientos se planteó, evaluar diferentes productos de control biológico que inducen mecanismos de defensa vegetal en plantas de nochebuena contra *Phytophthora drechsleri*. Se seleccionaron dos productos: un microorganismo antagonista (*Trichoderma harzianum*) y un polímero inductor de mecanismos de defensa vegetal (quitosano).

La principal consideración en esta evaluación fue que se buscó limitar la protección a la inducción de defensa vegetal, para esto se buscó que *T. harzianum* colonizara las raíces de

nochebuena al aplicarse previamente, y el sustrato en el cual se inoculó el hongo fue sustituido por sustrato estéril para evitar que el inóculo aplicado pudiera proteger por antagonismo directo contra la infección contra *P. drechsleri*. En el caso del quitosano se ha reportado un efecto negativo contra hongos y bacterias (Cruz-Ortega 2012), por lo cual se aplicó previamente a la raíz de la planta, para provocar la inducción de defensa, y prevenir que el control sobre el patógeno sea por el efecto antimicrobiano del quitosano (Cruz-Ortega, 2012).

El efecto protector de quitosano y *Trichoderma harzianum* en las plantas de nochebuena contra la infección por *Phytophthora drechsleri*, se determinó a partir de una escala de patogenicidad o severidad de la enfermedad de los productos evaluados. Sin embargo, es importante recalcar que el objetivo principal de este trabajo fue determinar algunos de los mecanismos de defensa que inducen estos productos contra la cepa patogénica de *P. drechsleri*, y no la optimización de la protección de cada producto. A partir de los resultados obtenidos se observó que la aplicación tanto de quitosano como de *T. harzianum* inducen una protección contra la infección de *P. drechsleri* en nochebuena. Sin embargo, el grado de protección inducido por cada producto es diferente entre sí.

En el caso del quitosano, se observó un grado de protección equiparable a un retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad, pero si se presentaron síntomas con el paso del tiempo. Esto fue evidente con el avance del daño en raíces y tejido vascular que era equivalente a las plantas infectadas con *P. drechsleri*, aunque en días más avanzados. En estudios equivalentes en Chile, (Cruz-Ortega 2012; Medina-Fuentes 2013), se observó que al aplicar el quitosano en plántulas de Chile estas presentaron una respuesta negativa, con síntomas similares a la enfermedad. Sin embargo, Amini y colaboradores (2009) mencionan que esto puede explicarse por el efecto del quitosano sobre la protección de la planta, el cual presenta una inducción de defensa en la planta que ha sido tratada y se refleja en una respuesta que incluye hojas cloróticas y algunas señales que se pudieran interpretar como síntomas de enfermedad.

En cuanto a la inducción de respuesta de defensa por parte del quitosano, se observó que se inducía una respuesta hipersensible (HR) de gran intensidad, una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de muerte celular programada (PCD) a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri*, esta respuesta disminuye a las 48h aunque siguió siendo mayor que la respuesta observada en la planta infectada. En cuanto al fortalecimiento de la pared celular, se observó una respuesta esta no es mayor a la observada en las plantas infectadas con *P. drechsleri* en cuanto a la producción de calosa, aunque si en la producción de lignina. En cuanto a la respuesta relacionada con la resistencia, se observó que hay una disminución de los niveles de proteínas PR (β 1,3 glucanasas y quitinasas) con respecto al testigo, previo a la inoculación con *P. drechsleri*, sin embargo, se observó una respuesta importante a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri*, y se mantuvo hasta por 15 días después de la infección. Con respecto a la producción de fitoalexinas, los niveles de compuestos fenólicos es menor al testigo previo a la inoculación con *P. drechsleri*, sin embargo, se observó una respuesta importante a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri* que se mantiene por 15 días después de la infección. Finalmente la actividad de peroxidasas, se encontró alta previo a la inoculación con *P. drechsleri*, sin embargo, se observó una respuesta de disminución importante a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri*. Estos resultados nos muestran que el quitosano induce de manera importante los mecanismos de defensa tempranos, principalmente la HR y también se desencadenan mecanismos de resistencia como son proteínas PR y fitoalexinas. Esta respuesta puede ser equiparable al denominado “priming” en donde la respuesta de defensa se ve acelerada, con la inoculación previa de algún inductor de defensa (Mejía-Teniente et al, 2010; Thakur y Sohal, 2013). Sin embargo, aun cuando la respuesta de defensa y de resistencia es inducida de manera efectiva, parece ser que esto no es suficiente para que se detenga la infección de *P. drechsleri*, ya que los síntomas de las plantas mostraron que la enfermedad aunque fue retrasada, no fue controlada. Esto debido a que las plantas de nochebuena aparentemente presentan una alta sensibilidad al cambio de temperatura y a las condiciones de humedad alta.

En el caso de *Trichoderma harzianum*, se observó un buen grado de protección al reducir de manera considerable los síntomas de la enfermedad. Es a nivel foliar donde se observó

una respuesta de la planta, sin embargo, a nivel de las raíces y tejidos vasculares, los síntomas no estuvieron presentes o se presentaron con menor intensidad. Destacó que a los 15 días después de la inoculación de *P. drechsleri*, no se observan síntomas de enfermedad en raíz y tejido vascular en contraste con el tratamiento con quitosano y de las plantas infectadas con *P. drechsleri*. En estudios equivalentes en Chile (Cruz-Ortega 2012; Medina-Fuentes 2013) se observó que al aplicar *T. harzianum*, la respuesta de protección era muy contrastante, ya que había un sector de plantas que no se enfermaban y no presentaban síntomas y otro sector de plantas que si presentaban síntomas de enfermedad. En este trabajo fue evidente que *T. harzianum* logró colonizar las raíces y controlar de manera adecuada la infección de *P. drechsleri*. Tal como se ha observado en otros trabajos donde diferentes especies de Trichoderma colonizan las raíces de las plantas (Mukherjee et al, 2012).

En cuanto a la inducción de respuesta de defensa por parte de *T. harzianum*, se observó que se inducía una respuesta hipersensible (HR) intensa aunque en menor escala al quitosano, observándose una producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de muerte celular programada (PCD) a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri*, esta respuesta aumentó a las 48h. En cuanto al fortalecimiento de la pared celular, se observó una respuesta importante al presentar una significativa producción de calosa, siendo aún mayor que la producida por el quitosano, lo mismo se detectó con la producción de lignina. En cuanto a la respuesta relacionada con la resistencia, se observó que hay una disminución de los niveles de proteínas PR (β 1,3 glucanasas y quitinasas) con respecto al testigo, previo a la inoculación con *P. drechsleri*, sin embargo, se observó una respuesta importante a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri*, destacando de manera importante la actividad de quitinasas, aunque la respuesta es fluctuante y en varias ocasiones la actividad disminuye con respecto al testigo. En la producción de fitoalexinas, los niveles de compuestos fenólicos fue muy bajo con respecto al testigo previo a la inoculación con *P. drechsleri*, sin embargo, se observó una respuesta importante a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri* y no se mantuvo constante durante el transcurso de la prueba. Finalmente la actividad de peroxidadas, fue la más alta con respecto a los otros tratamientos previo a la inoculación con *P. drechsleri*, sin embargo, se observó una respuesta de

disminución importante a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri*. Estos resultados nos muestran que el quitosano induce de manera importante los mecanismos de defensa tempranos, principalmente la HR y también se desencadenan mecanismos de resistencia como son proteínas PR y fitoalexinas, aunque en algunos casos de menor intensidad y en un intervalo de tiempo mayor que con respecto al quitosano. Se observó una respuesta equiparable al “priming” aunque menos marcada que con el quitosano (Mejía-Teniente et al, 2010; Thakur y Sohal, 2013). La inoculación con *T. harzianum* presentó un buen grado de protección contra la infección de *P. drechsleri* principalmente a nivel de raíces y tejidos, algo que puede estar relacionado con la colonización de *T. harzianum* en las raíces de *E. pulcherrima* (Ezziyyani et al, 2007; Ezziyyani et al, 2004; Sid et al, 2003; Guigón y González, 2004). Además se observó que esta respuesta puede ser mantenida por más tiempo y con mayor efectividad con respecto a lo observado en los tratamientos con quitosano.

En general ambos tratamientos parecen inducir una respuesta de defensa en nochebuena, sin embargo, esta respuesta es diferente entre sí (Andres-Ares et al 2005; Borad y Sriam, 2008). Aun cuando se considera que comparten la misma vía de señalización no parecen compartir los mecanismos de control (Vallad y Goodman, 2004). Las principales diferencias se encontraron en el tiempo de inducción de la respuesta, en el caso del quitosano la respuesta es más rápida e intensa, pero parece ser que tiene una vida media menor a la observada en *Trichoderma*. Por otra parte, aun cuando el quitosano induce la producción de proteínas PR y fitoalexinas, estas no parecen tener un efecto importante a nivel de la protección contra *P. drechsleri*, mientras que si es determinante la disminución de la actividad de peroxidasas que parece estar relacionado con el mecanismo de patogénesis de *P. drechsleri*. Otra diferencia se observó con el fortalecimiento de la pared celular ya que *T. harzianum* indujo una producción de calosa importante con respecto a lo observado en quitosano (Sharp, 2013; Lárez-Velásquez, 2008; Mukherjee et al, 2012).

Estos resultados nos permitieron evaluar los mecanismos de defensa que inducen tanto *T. harzianum* como el quitosano, sin embargo es importante considerar que el objetivo del trabajo era evaluar esta respuesta de inducción tratando de evitar los otros mecanismos de

acción (antagonismos, micoparasitismo, etc). Por lo cual, en la práctica, tanto *T. harzianum* como el quitosano pueden ser mucho más eficientes cuando son aplicados bajo condiciones óptimas y considerando sus propiedades. En el caso del quitosano quizás sea recomendable la aplicación repetida y en el caso de *T. harzianum*, no ser eliminada del sustrato para tratar de aprovechar sus otros mecanismos de control. A partir de estos resultados se establecen las bases para futuros estudios encaminados al control de *P. drechsleri* con *T. harzianum* y el quitosano, además de visualizar los mecanismos implicados en este control.

3.6 CONCLUSIONES

- La aplicación de quitosano bajo las condiciones evaluadas provocó la inducción de diferentes mecanismos de defensa vegetal en nochebuena, además de una protección limitada contra la infección de *P. drechsleri*. Sin embargo, esta protección parece solo retrasar el avance de la enfermedad, sin controlarla.
- La aplicación de *Trichoderma harzianum* bajo las condiciones evaluadas provocó la inducción de diferentes mecanismos de defensa vegetal en nochebuena, además de una protección efectiva contra la infección de *P. drechsleri*. Esta protección se relacionó con la inducción de los mecanismos de defensa por parte de *T. harzianum*.
- Se observó que los mecanismos de defensa vegetal inducidos por quitosano y *T. harzianum* son diferentes entre sí. Siendo más efectiva la respuesta inducida por *T. harzianum*.

3.7 BIBLIOGRAFÍA

- Allardyce JA. 2011. Defence mechanisms of a resistant monocot model to *Phytophthora cinnamomi*. Thesis of Doctor. University Deakin. pp:219.
- 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.
- Andrés-Ares JL, Rivera-Martínez A and Fernández-Paz J. 2005. Resistance of pepper germplasm to *Phytophthora capsici* isolates collected in northwest Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 3(4):429-436.
- Akgül DS y Mirik M. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *Journal of Plant Pathology* 90(1):29-34
- Belanger R, Dufuor N, Caron J and 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.
- Borad V and Sriram S. 2008. Pathogenesis-Related proteins for the plant protection. *Asian Journal of Experimental Sciences* 22(3):189-196.
- Candole BL, Conner PJ, Ji P. 2012. Evaluation of *Phytophthora* root rot-resistant *Capsicum annuum* accessions for resistance to *Phytophthora* foliar blight and *Phytophthora* stem blight. *Agricultural Sciences* 3(5):732-737.
- Chen XR, Xin-Le W, Zheng-Guang Z, Yuan-Chao W and Xiao-Bo Z. 2008. Differences in the induction of the oxidative burst in compatible and incompatible interactions of soybean and *Phytophthora sojae*. *Plant Pathology* 73:16-24.
- Chen, L. 2006. Anti-microbial chitosan composition for textile products. United States Patent Application, 20060008515.
- Chet I and Ibar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48:37-43.
- Chet I, Ibar J and Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (Wicklow DT & Soderstrom B, eds.). New York: *Springer Verlag*: 165-192.
- Chet, I and Baker R. 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 70:994-998.

Cruz-Ortega J. 2012. Interacción del quitosano con microorganismos de control biológico y el efecto en su actividad protectora contra *Phytophthora capsici*. Tesis para obtener el grado de Ingeniero. Universidad Tecnológica de Costa, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. p. 113.

Elad Y and Baker R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75:1053-1058.

Elad Y and Chet I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77:190-195.

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 annum* L.). *Anales de Biología* 26:35-45.

Ezziyyani M, Requena ME, Egea-Gilabert C and Candela ME. 2007. Biological control of *Phytophthora* Root Rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Phytopathology* 155:342-349.

García-Mateos R y Pérez-Leal R. 2003. Fitoalexinas: mecanismos de defensa de las plantas. Revista Chapingo. *Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* (001?):5-10.

Goodman WG. 1989. Chitin: A magic bullet. *The Food Insects Newsletter* 2(1):6-7.

Guigón-López C y González-González PA. 2004. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonista sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(001):117-124

Lamour KH, Daughtrey ML, Benson DM, Hwang J and Hausbeck MK. 2003. Etiology of *Phytophthora drechsleri* and *P. nicotianae* (= *P. parasitica*) diseases affecting floriculture crops. *Plant Disease* (87):854-858.

Lárez-Velásquez C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola* 8(1):1-22.

López-Herrera CJ, Pérez-Jiménez RM, Llobel A, Monte-Vázquez E y Zea-Bonilla T. 1999. Estudios *in vivo* de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5:261-265.

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 para obtener el título de Master. Universidad Agraria de La Habana.

Madriz-Ordeñana K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* 63:22-32.

Malik CP and Singh MB. 1980. In: Plant enzymology and histoenzymology. *Kalyani Publishers New Delhi* p.53.

Medina-Fuentes S. 2013. Evaluación de la combinación de quitosano, quitina y *Trichoderma* sp. en el control de *Phytophthora capsici* L. en chile serrano (*Capsicum annuum*). Tesis para obtener el grado de Ingeniero. Universidad Tecnológica de Costa, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. p.102.

Mejía-Teniente L, Torres-Pacheco I, González-Chavira MM, Ocampo-Velázquez RV, Herrera-Ruiz G, Chapa-Oliver AM and Guevara-González RG. 2010. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology* 9(54):9155-9162.

Molano JA, Durán A and Cabib E. 1977. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated/chin. *Analytical Biochemistry* 83:648-656.

Morán-Diez E, Hermosa R, Ambrosino P, Cardoza RE, Gutiérrez S, Lorito M and Monte E. 2009. The ThPG1 Endopolygalacturonase Is Required for the *Trichoderma harzianum*-Plant Beneficial Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (22):1021-1031.

Mukherjee M, Mukherjee PK, Horwitz BA, Zachow C, Berg G and Zeilinger S. 2012. Trichoderma-Plant-Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. *Indian Journal of Microbiology* 52(4):522-529.

Nawrocka J and Małolepsza U. 2013. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control* (67):149-156.

Orlikowski LB and Ptaszek M. 2013. First notice of *Phytophthora* crown and root rot of *Euphorbia pulcherrima* in polish greenhouses. *Journal of Plant Protection Research* 53(4): 307-311.

Ozgonen H, Yardimci and Cula-Kilic H. 2009. Induction of phenolic compounds and Pathogenesis-Related Proteins by mycorrhizal fungal inoculations against *Phytophthora capsici* Leonian in pepper. *Journal of Biological Sciences* 12(17):1181-1187.

Papavizas GC, Lewis JA and Abd-Elmoity TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.

Patto MC and Niks RE. 2001. Leaf wax layer may prevent appressorium differentiation but does not influence orientation of the leaf fungus *Puccinia hordei* on *Hordeum chilense* leaves. *European Journal of Plant Pathology* 107:795-797.

Pérez PR, Garcia-Acha and Durán A. 1983. Effect of papulacandin B on the cell wall and growth of *Geotrichum lactis*. *Journal of General Microbiology* 129:245-250.

Porras G, Calvo M, Esquivel M, Sibaja M y Madrigal-Carballo S. 2009. Quitosano n-acilado con cinamaldehído: un potencial bioplaguicida contra agentes patógenos en el campo agrícola. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 10(3):197-210.

Putter J. 1974. In: *Methods of Enzymatic Analysis 2* (Ed Bergmeyer). Academic Press New York p.685.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31:603-632.

Rodríguez AT, Ramírez MA, Cárdenas RA, Hernández AN, Velázquez MG and Bautista S. 2007. Induction of defense response of *Oryza sativa L.* against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89:206-215.

Rodríguez-Pedroso AT, Ramírez-Arrebato M A, Rivero-González D, Bosquez- Molina E, Barrera-Necha LL y Bautista-Baños S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 15(3):307-317.

Roncero C and Durán A. 1985. Effect of calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of chitin polymerization. *Journal Bacteriology* 63:1180-1185.

Sanzón-Gómez D. 2010. Comparación de los cambios estructurales en células de chile CM334 en una interacción compatible y una incompatible. Tesis de doctorado. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. p.37.

Secretaría de Agricultura y Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2013. Productores de nochebuena listos para la temporada navideña. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2010b537.aspx> (consultado el 15/04/2014).

Serrano-Carreón L, Galindo-Fentanes E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia* 1(58):77-88.

Sharp RG. 2013. A Review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to mModify Plant-Microbial Interactions and improve crop yields. *Agronomy* (3):757-793.

Sid-Ahmed A, Ezziyyani M, Pérez-Sánchez C and Candela ME. 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.

Sid-Ahmed A, Pérez-Sánchez C and 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.

Sriram S, Manasa SB and Savitha MJ. 2009. Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. *Journal Biological Control* 23(4):449-456.

Thakur M and Sohal BS. 2013. Role of elicitors in Inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. *ISRN Biochemistry* pp.10.

Vinalea F, Sivasithamparamb K, Ghisalbertic EL, Marraa R, Wooa SL, Loritoa M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* (40):1-10.

Woodworth J and Hausbeck MK. 2002. Comparison of cultivar susceptibility to *Phytophthora* root rots of poinsettia. *Plant Pathology* (18):6.

Yedidiaa I, Benhamoub N, Kapulnikc Y, Cheta I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry* (38):863-873.

Yoshimura MA. 1985. Etiology and control of poinsettia blight caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and *P. drechsleri*. *Plant disease* 69:511-513.

CAPITULO IV
EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE *Trichoderma harzianum* Y
QUITOSANO SOBRE LOS MECANISMOS DE DEFENSA VEGETAL CONTRA
***Phytophthora drechsleri* EN NOCHEBUENA**

4.1 INTRODUCCIÓN

El control biológico y los productos comerciales derivados de él, han estado incluyéndose de manera paulatina y creciente en el manejo de prácticamente todos los cultivos (Castro-Rocha, 2012). El uso generalizado de estos productos y el aumento del uso de estos productos en las alternativas de control biológico, significan una ventaja importante para ser incluidos en el cada vez más popular Manejo Integrado de Enfermedades. Sin embargo, este mismo aumento en la popularidad de su uso, provoca ciertos efectos adversos que se ven acrecentados por la falta del conocimiento en un manejo adecuado. En contraste con los agroquímicos, los productos de control biológico, presentan naturalezas diversas, así como diferentes mecanismos de acción. Entre estos productos podemos encontrar desde microorganismos vivos, hasta derivados de ellos, incluyendo proteínas y polímeros (MINSA et al, 2010; Serrano-Galindo, 2007). También se emplean productos de naturaleza química, que por las características de uso, dosis y toxicidad, caen dentro de los productos de bajo impacto ambiental, que incluyen a los productos de control biológico. Por estos motivos su uso, almacenamiento, caducidad e interacciones que desarrolla con su empleo combinado, implica un conocimiento nuevo que en la mayoría de las ocasiones, los usuarios no tienen.

La creciente validación de los productos de control biológico para diferentes cultivos ha permitido la inclusión de ellos en el manejo integrado. Sin embargo, la mayoría son evaluados de manera individual, sin considerar su interacción con otros productos similares, ya sean agroquímicos o biológicos, algo que no se ajusta a la realidad, ya que de manera práctica los cultivos no se protegen contra una sola plaga o enfermedad, sino que se aplican diferentes productos contra toda la gama de plagas y enfermedades que pueden afectar al cultivo.

Existen pocos estudios que exploran las interacciones tanto benéficas como negativas al combinar diferentes productos de control biológico (Cruz-Ortega, 2012; Medina-Fuentes, 2013). Algunos reportes han evaluado el uso combinado de algunos productos de control biológico buscando potenciar su efecto protector, entre los que se incluyen inductores de defensa vegetal, microorganismos antagonistas y potenciadores de la actividad antagonista (Chittenden y Singh 2009; López-Mondéja et al, 2012). Estos estudios siguen siendo encaminados a la protección de una sola plaga o enfermedad, pero presentan un gran potencial para conocer las interacciones que pueden darse entre estos productos.

En la práctica, el uso combinado de productos de control de plagas y enfermedades en campo es muy común, tal es la premisa del Manejo Integrado de Plagas y enfermedades (MIPE) (MINSA et al, 2010). En el MIPE se busca privilegiar el uso de un manejo de bajo impacto ambiental, por lo cual se prefiere el uso de productos biológicos sobre los agroquímicos para el control de plagas y enfermedades. En este sentido, se ha desarrollado investigación para la búsqueda de las interacciones entre los agroquímicos y los productos de control biológico, que en mayor medida está dado por el uso de los microorganismos antagonistas (Khan y Shahzad, 2007; Chaparro et al, 2011). Sin embargo, en el sentido de las interacciones entre los productos de control biológico, ha habido pocos reportes al respecto en invernadero o campo (Cano, 2011). Actualmente los microorganismos antagonistas no son los únicos utilizados en el MIPE o el manejo nutricional de los cultivos, también se incluyen inductores de defensa vegetal, que pueden llegar a interaccionar de manera negativa o positiva en el efecto que se dé entre ellos. Aunado a esto, cada cultivo presenta ciertas características propias de la respuesta de defensa vegetal, además de que las vías de defensa inducidas van a ser determinantes en el aumento de la actividad o incluso la falta de ella. Por estos motivos, el estudio de las interacciones entre los productos de control biológico se convierte en una necesidad cada vez más apremiante.

El uso de los inductores de defensa vegetal es una opción real en el control de plagas y enfermedades. Sin embargo, el uso de estos productos implica un conocimiento mayor que el necesario cuando se usa el tratamiento convencional de agroquímicos o productos biológicos que están diseñados para actuar directamente contra el patógeno. Aun cuando su

validación a nivel de campo sigue las pautas que se usan en la mayoría de los productos agrícolas, una planeación basada en su mecanismo de acción permitiría una mejor validación y uso. En primer lugar, es necesario conocer la respuesta de la planta al patógeno y que mecanismos de defensa están presentes en la planta, así como la estrategia del patógeno para poder suprimir esta respuesta o contrarrestarla. En segundo lugar, se considera la principal ventaja de esta estrategia al controlar al patógeno de manera indirecta, haciendo uso de la respuesta de la planta para este control. En este punto incide la vía de señalización que esté implicada en inducción de la defensa vegetal, ya sea por medio de la vía del ácido salicílico o la vía del ácido jasmónico (Madriz-Ordeñana, 2002). Esto se convierte en primordial, al ser vías de señalización antagónicas, lo que implica que el aumento de una de estas moléculas señal, provoca una disminución en la otra (Lunstedt y Valdés, 2013). Esto podría significar que en determinado momento pueda ser contraproducente el empleo de dos o más de estos productos de inducción (Medina-Fuentes, 2013).

Un aspecto que en muchas ocasiones no se considera cuando se emplean microorganismos benéficos y de control biológico, es que su efecto no se limita a un efecto antagónico directo contra el patógeno, además, muchos de ellos establecen una interacción con la planta que enciende mecanismos de defensa vegetal (Castro-Rocha et al, 2012). En este sentido, el uso combinado de microorganismos benéficos o de control biológico e inductores de defensa vegetal, se considera como una estrategia muy efectiva para el control de enfermedades, aunque hace falta realizar estudios para determinar si existe una interacción positiva o negativa.

Por otra parte, el cultivo de nochebuena en México es un cultivo con un alto potencial de ser un cultivo extensivo e intensivo en nuestro país, como ya lo es en los Estados Unidos de América, lo que también se vería reflejado en el aumento de los problemas fitosanitarios, incluyendo la marchitez y pudrición de raíz que está asociada principalmente el oomiceto *Phytophthora drechsleri*. Para este cultivo, el conocimiento que se tiene de sus mecanismos de defensa vegetal, así como de los procesos de patogénesis que se relacionan con las enfermedades que le afectan, es prácticamente nulo. Por estos motivos, se hace necesario el

desarrollo de investigación que dé a conocer este conocimiento, lo que también permitiría que otros patosistemas puedan ser abordados de manera más sencilla.

Una alternativa para el control de *Phytophthora* es el uso de microorganismos con efectos de control biológico como *Trichoderma*, que también presenta un efecto inductor de defensa vegetal. Por otra parte, también se han usado productos inductores de mecanismos de defensa vegetal como el quitosano, que las sensibiliza para responder rápidamente al ataque de patógenos al estimular mecanismos de defensa específicos. Sin embargo, el conocimiento de su interacción, desde el punto de vista de su inducción de los mecanismos de defensa vegetal, ha sido marginalmente explorado. De acuerdo a lo reportado en la bibliografía se considera que tanto el quitosano (El-Hadrami et al, 2010) como el efecto de inducción de defensa por *Trichoderma* están relacionados con la vía de señalización por ácido jasmónico (Mukherjee et al, 2012), por lo cual, se considera que su interacción puede llegar a ser positiva, y potenciar la respuesta de los mecanismos de defensa vegetal contra *P. drechsleri* en nochebuena, en contraste a su aplicación por separado. En este trabajo se evaluó el efecto de la combinación de *T. harzianum* y el quitosano en los mecanismos de defensa vegetal relacionados con la resistencia contra *P. drechsleri* en nochebuena.

4.1 METODOLOGÍA

4.2.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas enraizadas de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) de la var. Freedom Red de aproximadamente dos meses de edad. Las condiciones de cultivo se describieron previamente (**Apartado 2.2.1**).

4.2.2 Material biológico

Se utilizó la cepa virulenta de *Phytophthora drechsleri* (PHD) aislada de plantas con síntomas de enfermedad de nochebuena (**Apartado 2.2.2**) y fue mantenido como cultivo “padre” en tubos con medio de cultivo V8 clarificado. Se utilizó una cepa comercial de *Trichoderma harzianum* (T-22), aislada a partir del producto PHC T-22® y fue mantenido como cultivo “padre” en tubos con medio de cultivo agar V8.

4.2.2.1 Obtención de inóculos fúngicos

Para la obtención del inóculo del patógeno *Phytophthora drechsleri* (PDH), el oomiceto se creció sobre agar V-8 clarificado, se indujo la producción de conidiosesporangios y zoosporas. Se preparó una suspensión de zoosporas con una concentración final de 1×10^5 zoosporas/mL (**Apartado 2.2.3.1**).

Para la obtención del inóculo del microorganismo de control biológico *T. harzianum* (TH), el hongo fue crecido en medio agar V8, después de 10 días de crecimiento se recolectaron las esporas agregando agua estéril y de un barrido con pincel. A la suspensión de esporas resultante se le realizó el conteo de esporas en cámara Neubauer y se ajustó a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL.

4.2.3 Solución de quitosano al 0.01%

Se utilizó quitosano de la Marca Sigma Aldrich (chitosan from shrimp shells, practical grade). Se preparó una solución stock de quitosano al 1% (10g/L) disuelto en ácido acético al 1% con un pH de 5.75 previamente ajustado y esterilizado en autoclave a una

temperatura de 121°C durante 20 minutos. A partir de esta solución stock se preparó una solución con una concentración final de 0.01% de quitosano empleando ácido acético al 1% (pH 5.75) como disolvente.

4.2.4 Evaluación del grado de protección contra *Phytophthora drechsleri* en plántulas de nochebuena con la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum*

Se evaluó el grado de protección contra la infección de *Phytophthora drechsleri* (PHD) en nochebuena por la inoculación combinada de *Trichoderma harzianum* (TH) y quitosano (QT), en comparación a su aplicación individual. Las plántulas enraizadas de nochebuena fueron colocadas en macetas en sustrato estéril (6:2:1 peat-moss, arena y vermiculita) y colocadas bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento a temperatura constante (28°C, fotoperiodo de 16H luz/8H oscuridad). Después de 15 días del trasplante, las plántulas fueron nuevamente trasplantadas a sustrato estéril e inoculadas con 5 mL de la suspensión de zoosporas de *P. drechsleri* (PHD). Posterior a la inoculación, las plántulas fueron mantenidas bajo las mismas condiciones en cámaras de crecimiento durante 15 días. Al testigo (☉) se le agregaron 5 mL de agua estéril en lugar de la suspensión de zoosporas. Las plántulas que recibieron tratamientos con la combinación de *T. harzianum* y quitosano (TH+QT) fueron inoculadas tres veces con 5 mL del tratamiento correspondiente. La primera inoculación se realizó tres días después del primer trasplante con la suspensión de *Trichoderma*, la segunda aplicación fue al día 8 después del primer trasplante con la solución de quitosano al 0.01% y la tercera inoculación se realizó trece días después del primer trasplante con la suspensión de esporas de *Trichoderma*. Las plántulas que recibieron tratamientos con *T. harzianum* (TH) fueron inoculadas dos veces con 5 mL de la suspensión de esporas de *T. harzianum*. La primera inoculación se realizó tres días después del primer trasplante y la segunda inoculación se realizó trece días después del primer trasplante. Las plantas que recibieron tratamientos con quitosano (QT), fueron inoculadas con 5 mL de la solución de quitosano ocho días después del primer trasplante. Transcurrido el tiempo las plantas fueron trasplantadas nuevamente a sustrato estéril e inoculadas con la cepa patogénica *P. drechsleri*. Se tomaron lecturas de la sintomatología y registro fotográfico el día del trasplante (D0) y los días 1 (D1), 10 (D10) y 15 (D15)

después de la inoculación con PHD. Se realizaron 20 repeticiones por tratamiento. Se evaluó el grado de severidad de la enfermedad de a la escala descrita en el **Capítulo II, Figura 2.1.**

4.2.5 Evaluación de los mecanismos de defensa vegetal relacionados con el grado de protección contra *Phytophthora drechsleri* en nochebuena con la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum*

4.2.5.1 Evaluación de mecanismos de defensa relacionados con la resistencia contra *Phytophthora drechsleri*.

Se utilizaron las condiciones de la evaluación del grado de protección contra *P. drechsleri* (PHD) en plántulas de nochebuena con la aplicación de quitosano y *T. harzianum* (**Apartado 4.2.4**). Las lecturas se realizaron el día del trasplante (D0) y los días 1 (D1), 10 (D10) y 15 (D15) después de la inoculación con PHD. Se tomaron 5 plantas por cada tratamiento para realizar extractos de raíz para cada una de las evaluaciones relacionadas con la resistencia a *Phytophthora*. Los mecanismos de defensa vegetal evaluados fueron la producción de componentes fenólicos totales, la actividad de las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) con actividad de quitinasas, β -1,3-glucanasa y la actividad de las peroxidasas (Sanzón-Gómez, 2010; Chen et al, 2008; Gomez, 2010). Cada una de estas evaluaciones se describe de manera detallada en el **Apartado 2.2.4.2.**

4.2.5.2 Evaluación de mecanismos de defensa tempranos en raíces de nochebuena

Para esta evaluación se utilizaron plántulas de nochebuena previamente aclimatadas bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento. Las condiciones de aplicación de los tratamientos con *T. harzianum* (TH) y quitosano (QT), fueron las mismas que en la evaluación del grado de protección contra *Phytophthora drechsleri* (**Apartado 3.2.4**), con la diferencia que estas plantas no fueron trasplantadas en sustrato estéril, en su lugar estas plántulas fueron desinfectadas superficialmente y colocadas en cámaras húmedas, sobre papel toalla estéril humedecido. La inoculación del patógeno fue de manera directa aplicando una gota de aproximadamente 5 μ L en secciones de la raíz. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y se colocaron en cuartos de cultivo a 25°C con un fotoperiodo

de 16H luz/8H oscuridad. Se tomaron muestras de las secciones inoculadas a las 24 y 48 horas, y evaluando los mecanismos de defensa vegetal que se inducen de manera temprana en la interacción planta-*Phytophthora*. Los mecanismos evaluados fueron de dos tipos: primero los relacionados con la respuesta hipersensible (HR) como son la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y muerte celular programada (PCD), y segundo los relacionados con la fortificación de la pared como son la producción calosa y lignina. Cada una de estas evaluaciones se describe de manera detallada en el **Apartado 2.2.4.1**.

4.2.5.3 Observación histológica de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena

De las raíces inoculadas con la suspensión de esporas de *P. drechsleri*, se tomaron segmentos de raíz con síntomas de enfermedad, se colocaron en solución fijadora FAA a 4°C. Estos segmentos fueron teñidos con lactoglicerol-azul de tripano al 0.5% por 30 min. Al terminar el proceso de tinción se realizaron lavados con lactoglicerol para eliminar el exceso de colorante y se realizó una segunda tinción con Uvitex 2B al 1% por aproximadamente 30 min. Posteriormente se realizaron las observaciones al microscopio equipado con epifluorescencia y filtros adecuados para el Uvitex 2B (Patto y Niks, 2001).

4.2.6 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental en bloques completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y cuando hubo diferencias estadísticas significativas, se realizaron pruebas de separación de medias con Tukey $p \leq 0.05$ ambos análisis se realizaron con el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Evaluación del efecto protector de la combinación de quitosano y *Trichoderma harzianum* contra la infección de *Phytophthora drechsleri* en nochebuena

Para realizar la evaluación del efecto protector de quitosano y *Trichoderma harzianum* (TH+QT) fue necesario considerar su aplicación en intervalos de tiempos separados. Esto debido a que se ha reportado que la aplicación combinada en una misma solución puede provocar una disminución en la actividad protectora de *T. harzianum*, atribuible al efecto antimicrobiano del quitosano (Cruz-Ortega, 2013). Por este motivo, se decidió que se aplicara *T. harzianum* en primera instancia, para permitir que este se estableciera en las raíces de las plantas de nochebuena, posteriormente ocho días después de la inoculación con *T. harzianum* se aplicó la solución de quitosano para la inducción de la defensa vegetal. Finalmente, se realizó una segunda aplicación de *T. harzianum* días previos al trasplante, para tratar de contrarrestar el posible efecto antimicrobiano del quitosano, esta segunda inoculación garantizará la presencia de *T. harzianum* en las plantas de nochebuena. Otro punto importante a considerar en este estudio, fueron los diferentes mecanismos de control que puede tener *T. harzianum* contra *Phytophthora*. La mayoría de los estudios relacionados con *Trichoderma* se centran en su efecto antagonista directo, sin considerar los mecanismos de inducción de defensa vegetal, sin embargo se ha observado que *Trichoderma* puede inducir ISR o SAR. Por ese motivo, en este estudio se buscó privilegiar el efecto de inducción de defensa vegetal sobre su posible antagonismo directo. Por lo tanto, la aplicación previa de *Trichoderma* se realizó con la finalidad de que se estableciera la colonización de la raíz de las plantas de nochebuena. Por otra parte, previo a la inoculación con el patógeno, el sustrato en el cual se realizó la aplicación de *Trichoderma*, fue sustituido por sustrato estéril, con lo cual se buscó eliminar el inóculo de *Trichoderma* que no colonizó las raíces. Esta misma premisa se siguió con la aplicación de quitosano, se consideró que con la sustitución con sustrato estéril en el trasplante, los residuos de quitosano no interferirían con un efecto inhibitorio contra *P. drechsleri*. Estas consideraciones permitieron delimitar el efecto de inducción de mecanismos de defensa vegetal tanto de *Trichoderma* y quitosano.

La severidad de la enfermedad con la aplicación combinada de *T. harzianum* y quitosano (TH+QT) no disminuyó con respecto a las plantas infectadas con *P. drechsleri* (PHD), al contrario presentó un aumento en la severidad de la enfermedad al presentar síntomas en menor tiempo con respecto a PHD (**Fig. 4.1**).

La combinación TH+QT provocó un efecto negativo evidente a nivel foliar en las plantas después de 24h de la inoculación con *P. drechsleri* (**Fig 4.2**). Las plantas presentaron signos de marchitez y hojas decaídas un efecto más marcado que en los otros tratamientos (TH y QT). Además se observó un efecto a nivel de la raíz o en el tejido vascular, equivalente al ocasionado por PHD, adicionalmente se observó la presencia de un oscurecimiento de las raíces. El efecto observado a los 10 días después de la inoculación de PHD, mostró que las plantas presentaron un daño marcado a nivel foliar, con síntomas severos de marchitez, que incluyen defoliación, siendo mayor que en cualquiera de los tratamientos y de las plántulas infectadas con *P. drechsleri* (**Fig 4.2**). El efecto en las raíces y en el tejido vascular a los 10 días después de la inoculación con PHD, se manifestó como un daño severo, con tejido necrosado, siendo mayor que en cualquiera de los tratamientos y de las plantas infectadas con *P. drechsleri*. Las raíces presentaron oscurecimiento y pérdida de ellas. Finalmente, a los 15 días después de la inoculación con PHD, las plántulas presentaron síntomas de enfermedad a nivel foliar aunque a menor proporción que a los D10, pero evidentemente mayor a las plántulas inoculadas con PHD en cualquier otro tratamiento (**Fig 4.2**). Con respecto a los síntomas observados en raíces y tejido vascular, se observó que había plántulas que presentaban síntomas avanzados de enfermedad, pero también plántulas en las que los síntomas eran ligeros. Se observó daño en tejido vascular con presencia de necrosis y formación de tejido lignificado, que se relacionó con pudrición de raíz. La raíz presentó un oscurecimiento marcado y se empezó a observar una disminución en la cantidad de raíces. De manera general, la combinación del quitosano y *T. harzianum* (QT+TH) no presentó una protección contra la infección de *P. drechsleri* en contraste a lo que se observó con la aplicación individual del quitosano (QT) y *T. harzianum* (TH) (**Fig. 4.2**). La respuesta de las plántulas a la combinación QT+TH fue contrario a lo esperado. Se esperaba que con la combinación la protección se potenciara sin embargo, los resultados mostraron que no existió protección y los síntomas observados se presentaron con mayor rapidez con respecto a las plántulas infectadas con PHD. Esto

provocó que se considerara un efecto negativo la aplicación de QT+TH, la cual se puede deber a un antagonismo en las vías de señalización.

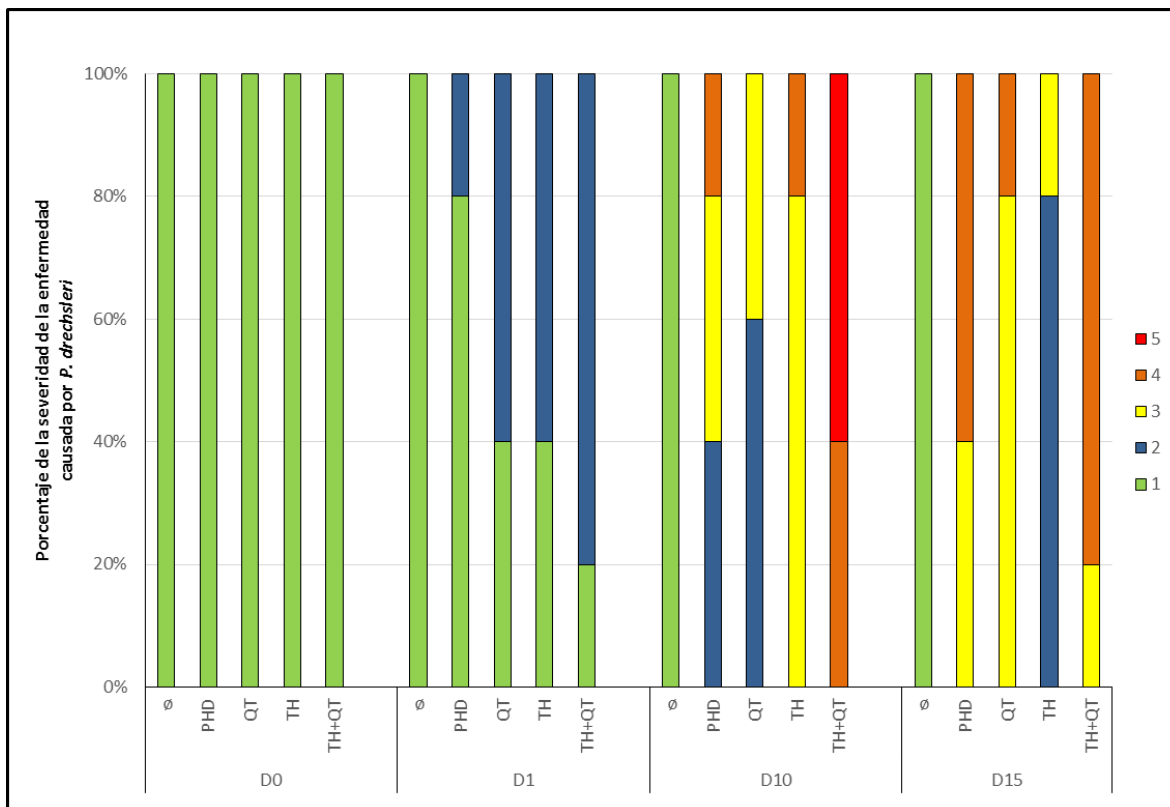


Figura 4.1. Efecto de la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* en el progreso de la enfermedad provocada por la infección de *Phytophthora drechsleri* en plántulas de nochebuena. Ø: Testigo, plántulas inoculadas con agua esteril; PHD: plantas inoculadas con *P. drechsleri* con una concentración de 1×10^5 zoosporas/ml. QT: plantas con la aplicación de quitosano al 0.1%. TH: plantas inoculadas con el hongo *Trichoderma harzianum* con una concentración de 1×10^6 esporas/ml. QT+TH: plantas con la aplicación de quitosano al 0.1% y *T. harzianum*. DØ: Día del trasplante y previo a la inoculación de PHD. D1: Día 1 después de la inoculación de PHD; D10: Día 10 después de la inoculación de PHD; D15: Día 15 después de la inoculación de PHD. 1 (■): Planta sana; 2 (■): Planta con síntomas ligeros de enfermedad; 3 (■): Planta con síntomas evidentes de enfermedad; 4 (■): Planta con síntomas severos de enfermedad; 5 (■): Plantas con síntomas terminales de enfermedad o planta muerta.

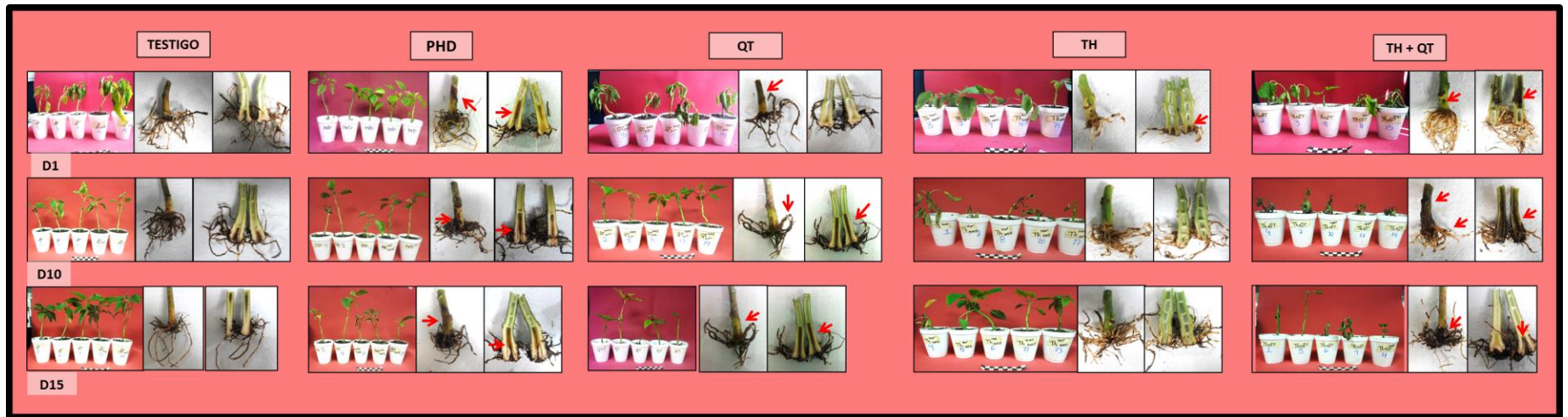


Figura 4.2. Efecto de la protección por la combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* en plantas de nochebuena infectadas por *Phytophthora drechsleri*. Se observaron los síntomas en las plantas de nochebuena ante la infección de *Phytophthora drechsleri*, en la planta completa. **TESTIGO:** Plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD:** plantas inoculadas con la cepa patogénica *Phytophthora drechsleri* a concentración de 1×10^5 zoosporas/ml. **QT:** plantas con la aplicación de quitosano al 0.1%. **TH:** plantas inoculadas con el hongo *Trichoderma harzianum* con una concentración de 1×10^6 esporas/ml. **QT+TH:** plantas con la aplicación de quitosano al 0.1% y *T. harzianum*. **D1:** Día 1 después de la inoculación de PHD; **D10:** Día 10 después de la inoculación de PHD; **D15:** Día 15 después de la inoculación de PHD. Las flechas indican el daño por la infección de *Phytophthora drechsleri*.

4.3.2 Evaluación de los mecanismos de defensa vegetal tempranos en raíces de nochebuena inducidos por la combinación de quitosano y *Trichoderma harzianum*

Para evaluar los mecanismos de defensa tempranos que se inducen en las plantas de nochebuena al aplicar la combinación de quitosano y *Trichoderma harzianum* (QT+TH), se inocularon raíces directamente con zoosporas del patógeno *Phytophthora drechsleri* y a partir de ellas se realizaron tinciones para observar al microscopio la respuesta de la planta. Los mecanismos de defensa vegetal tempranos evaluados fueron los relacionados con el fortalecimiento de la pared celular como son la producción y acumulación de calosa y lignina; y aquellos relacionados con la respuesta hipersensible (HR) como son la presencia de muerte celular programada (PCD) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

En la respuesta por la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* (QT+TH) se observó una inducción de la producción de ROS y PCD, equivalente a la observada en QT (**Fig. 4.3**). La respuesta observada con la aplicación de la combinación QT+TH fue que a las 24h se observó un aumento en la producción de ROS que fue incrementándose a las 48h (**Fig. 4.3 ROS**). En este mismo sentido, se observó que la PCD tiene el mismo comportamiento con la producción de ROS, con un aumento a las 24h que se incrementa considerablemente a las 48h (**Fig. 4.3 PCD**). La respuesta observada por la PCD es mayor con respecto a lo observado en los demás tratamientos.

Por lo que respecta al fortalecimiento de la pared celular, de la combinación QT+TH indujo la formación de calosa y lignina, de manera importante (**Fig. 4.4**). Se observó un aumento importante en la producción de calosa a las 24h después de la inoculación de PHD, manteniéndose a las 48h (**Fig. 4.4 CALOSA**). La respuesta que se observó por la aplicación del tratamiento fue mayor que el observado por la aplicación de QT, pero de menor intensidad que el inducido por TH. En cuanto a la producción de lignina, la combinación QT+TH indujo su acumulación de manera importante a partir de las 24h y

aumentó a las 48h, un comportamiento equivalente a lo observado con la aplicación de QT (Fig. 4.4 LIGNINA).

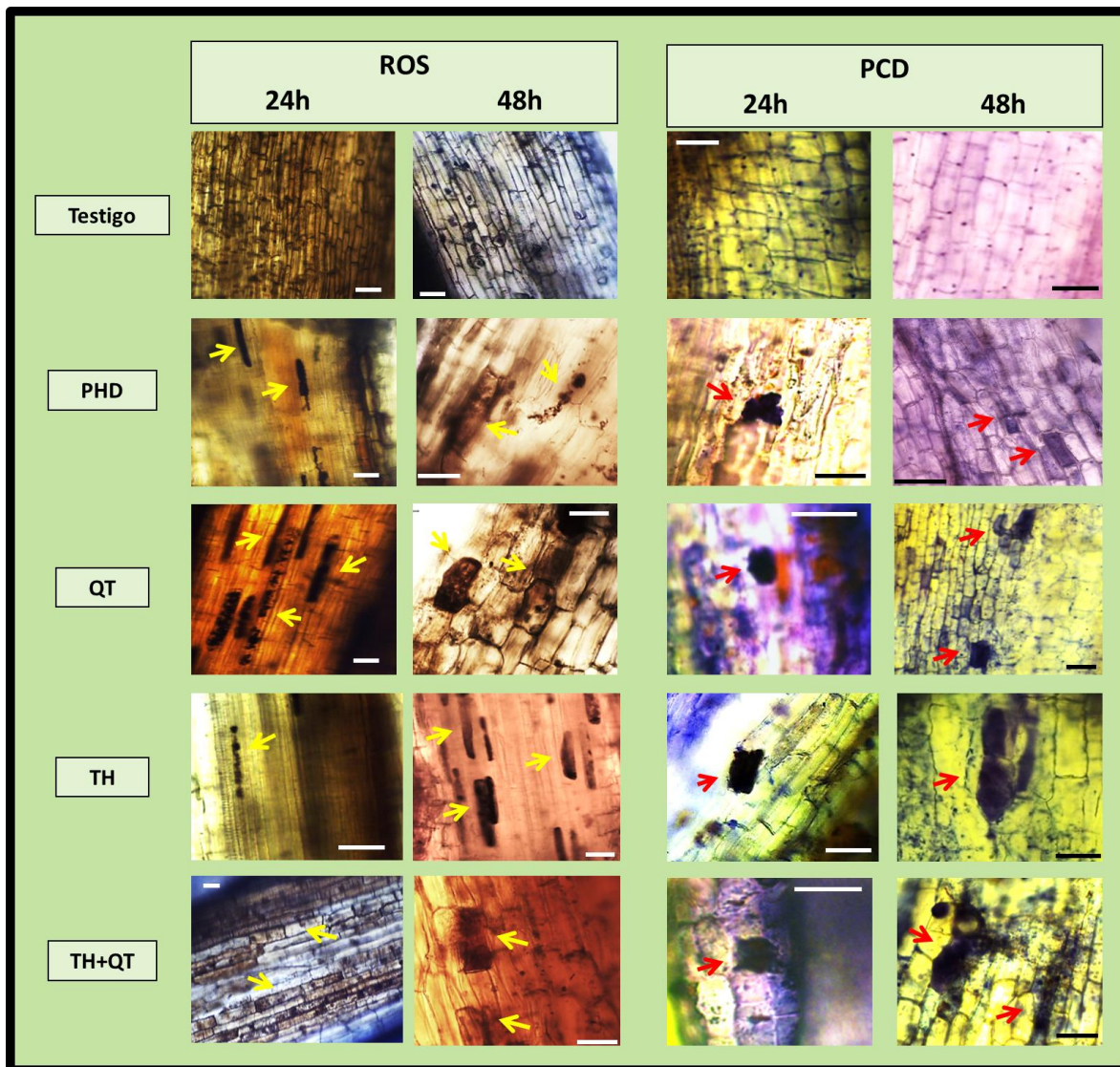


Figura 4.3. Mecanismos de defensa relacionados con la respuesta hipersensible inducidos tempranamente por la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena. Se tomaron segmentos de raíces de nochebuena 24 y 48 horas después de la inoculación con *Phytophthora drechsleri* y se observaron al microscopio. **D0**: Día del trasplante y previo a la inoculación de PHD; **D1**: Día 1 después de la inoculación de PHD; **D10**: Día 10 después de la inoculación de PHD; **D15**: Día 15 después de la inoculación de PHD. **TESTIGO**: Plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD**: Plántulas inoculadas con *P. drechsleri*; **QT**: Plántulas inoculadas con quitosano; **TH**: Plántulas inoculadas con *Trichoderma harzianum*; **TH+QT**, plantas inoculadas con *Trichoderma harzianum* con una concentración de 1×10^6 y quitosano al 0.1%. **ROS**: Acumulación de especies reactivas de oxígeno en raíces de nochebuena; **PCD**: Presencia de muerte celular programada en raíces. La barra equivale a 50 μ m. Las flechas indican la presencia de la respuesta de cada una de las evaluaciones.

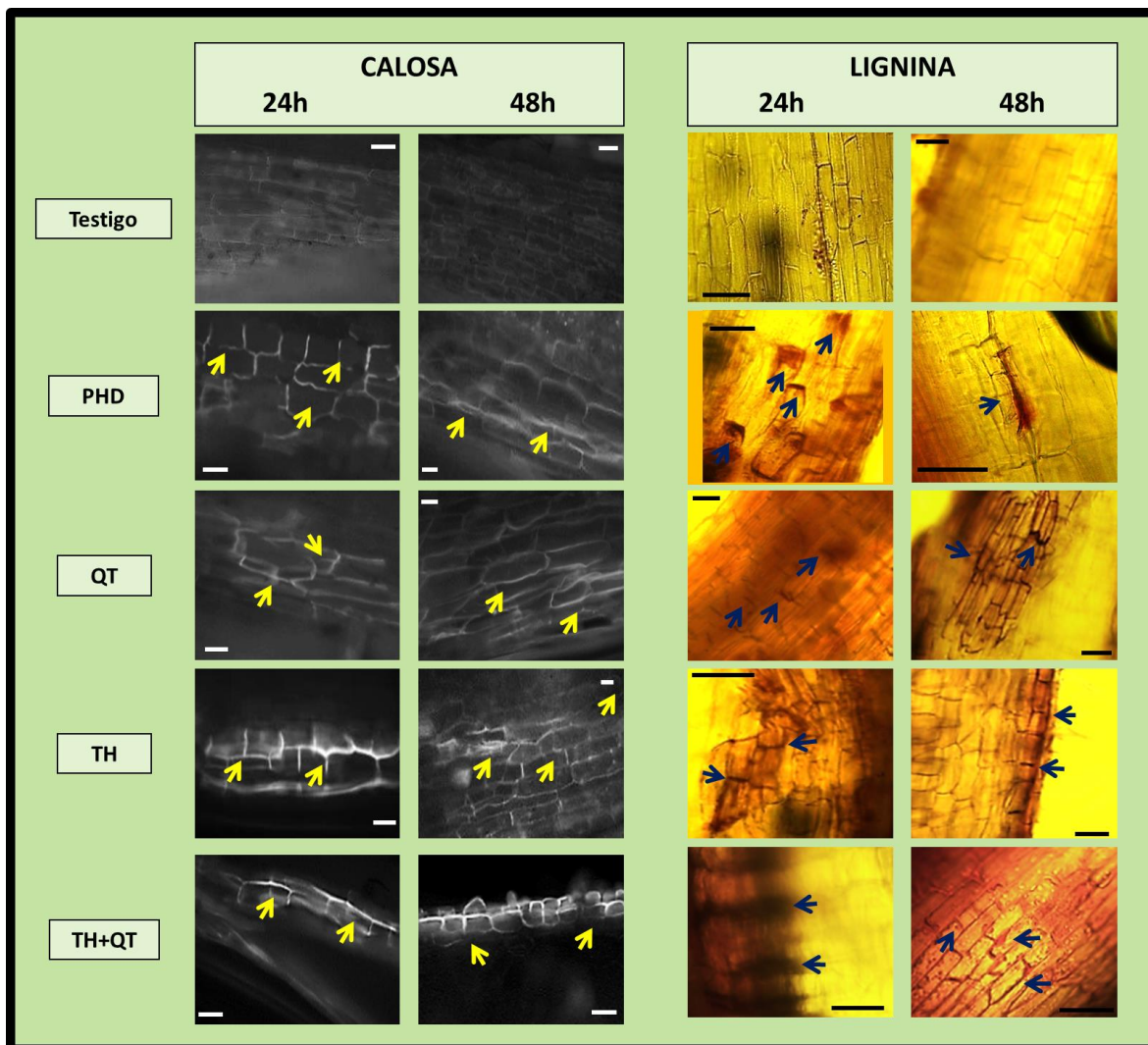


Figura 4.4. Mecanismos de defensa relacionados con el fortalecimiento de la pared celular inducidos por la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena. Se tomaron segmentos de raíces de nochebuena 24 y 48 horas después de la inoculación con *Phytophthora drechsleri* y se observaron al microscopio. **D0:** Día del trasplante y previo a la inoculación de PHD. **D1:** Día 1 después de la inoculación de PHD; **D10:** Día 10 después de la inoculación de PHD; **D15:** Día 15 después de la inoculación de PHD. **TESTIGO:** Plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD:** Plántulas inoculadas con *P. drechsleri*. **QT:** Plántulas inoculadas con quitosano; **TH:** Plántulas inoculadas con *Trichoderma harzianum*; **TH+QT:** Plántulas inoculadas con *Trichoderma harzianum* a concentración de 1×10^6 y quitosano al 0.1%. **CALOSA:** Acumulación de calosa en raíces. **LIGNINA:** Producción de lignina en raíces. La barra equivale a 50 μm . Las flechas indican la presencia de la respuesta de cada una de las evaluaciones.

A partir de estos resultados se observó que la respuesta inducida por la combinación QT+TH es más rápida que la de los demás tratamientos, y su intensidad es en algunos casos

equivalentes a la mayor respuesta de los tratamientos individuales. Por lo tanto, se consideró que los mecanismos de defensa vegetal tempranos en raíces de nochebuena son inducidos de manera importante por la combinación de quitosano y *Trichoderma harzianum*.

4.3.3 Evaluación de los mecanismos de defensa vegetal de resistencia inducidos por la combinación de quitosano y *Trichoderma harzianum* en plantas de nochebuena

Se seleccionaron algunos mecanismos de defensa que se relacionan con la resistencia contra diferentes especies del género *Phytophthora*. Estos mecanismos incluyeron la producción de fitoalexinas o fitoanticipinas, que fueron vinculados con la producción de compuestos fenólicos totales (Tao et al, 2011). Así como la actividad de enzimas involucradas con las proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) como son las β 1,3-glucanasas, quitinasas y peroxidasas (Rodríguez et al, 2006; Madriz-Ordeñana, 2002).

Con respecto a la actividad de proteínas PR, la actividad relacionada con las β 1,3-glucanasas ha sido correlacionado con una respuesta efectiva de resistencia contra diferentes especies del género *Phytophthora*. En este caso, se observó que la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma* (QT+TH) provocaba una disminución significativa de la actividad de estas enzimas previo a la inoculación con *P. drechsleri* (PHD), esta respuesta fue idéntica a la observada con la aplicación individual de QT y TH (**Fig. 4.5**). A las 24h después de la inoculación del patógeno (D1), no se presentó una respuesta en QT+TH, en contraste con la aplicación de QT y TH en donde se observó una respuesta importante, hasta igualar los niveles encontrados en los testigos. A los 10 días después de la inoculación con el patógeno, se observó que las plantas enfermas presentaron una disminución significativa en la actividad de β 1,3-glucanasas al igual que las inoculadas con TH, no se observó variación en el testigo, QT y QT+TH (**Fig. 4.5 A, D10**). Finalmente en el día 15 después de la inoculación con PHD (D15), la combinación QT+TH se mantuvo en niveles menores al testigo, mientras que los demás tratamientos se comportaron de manera semejante al testigo, infectado (PHD) y TH, mientras que QT presentó un nivel mayor que las anteriores (**Fig. 4.5 A, D15**). De manera general, la combinación QT+TH no

indujo una respuesta en la actividad de las β 1,3-glucanasas en contraste a la aplicación individual de QT y TH.

Otra de las enzimas que se relacionan con una efectiva defensa para algunas especies del género *Phytophthora* son aquellas que presentan una actividad de quitinasas (Baranski et al, 2008). Con respecto a esta actividad se observó que la combinación QT+TH, al igual que QT y TH provocaban una disminución significativa de la actividad de estas enzimas previo a la inoculación con *P. drechsleri* (PHD) (**Fig. 4.5 B, D0**). A las 24h después de la inoculación del patógeno (D1), la combinación de QT+TH no indujo una respuesta en la actividad de las quitinasas en contraste a lo observado con QT y TH. En el caso de las plántulas inoculadas con QT, la respuesta observada fue equivalente al testigo y las plántulas infectadas (PHD), mientras que en las plántulas inoculadas con TH, esta respuesta fue mucho mayor (**Fig. 4.5 B, D1**). A los 10 días después de la inoculación con el patógeno, se observó que la combinación QT+TH indujo una respuesta ligera en la actividad de las quitinasas aunque aún permaneció por debajo de los niveles del testigo, este comportamiento es diferente a lo observado en la aplicación individual de QT y TH que si inducen cambios en los niveles de actividad (**Fig. 4.5 B, D10**). Finalmente en el día 15 después de la inoculación con PHD (D15), la combinación QT+TH de nueva cuenta presentó los niveles de actividad más bajos con respecto a los demás tratamientos (**Fig. 4.5 B, D15**). De manera general, se observó que la combinación de QT+TH, no aumentó los niveles de actividad de quitinasas en contraste con lo observado en la aplicación individual de QT y TH, y esta inducción se presenta de manera tardía y con una intensidad menor.

Finalmente, en lo que respecta a las actividades relacionadas con proteínas PR, se evaluó la actividad de enzimas peroxidadas. La actividad de estas enzimas ha sido relacionada con la resistencia a diferentes ataques de hongos fitopatógenos, sin embargo, su efecto principal está relacionado con un control del daño causado por la respuesta hipersensible (HR), principalmente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este sentido, la contención del daño causado por las ROS, así como la señal relacionada con estas moléculas sería una respuesta indirecta de defensa (Karuppanapandian et al, 2011). Con respecto a esta actividad se observó que la aplicación de la combinación QT+TH provoca

un aumento considerable en la actividad de las peroxidases, en contraste a las plántulas testigo, con una actividad intermedia entre la aplicación individual de QT y TH (**Fig. 4.6 A, D0**). 24h después de la inoculación del patógeno (D1), se observó que con la aplicación de la combinación QT+TH esta actividad no disminuyó y es equivalente a la observada en las plántulas infectadas con *P. drechsleri* (PHD), una respuesta contrastante en cuanto a su aplicación por separado de TH y QT (**Fig. 4.6 A, D1**). Diez días después de la inoculación con el patógeno, la combinación QT+TH presentó una disminución en la actividad de peroxidases, equivalente a lo observado en las plántulas testigo, infectadas (PHD) e inoculadas con QT, en contraste TH presentó un aumento significativo en esta actividad (**Fig. 4.6 A, D10**). Finalmente en el día 15 después de la inoculación con PHD (D15), los niveles de actividad observados en las plantas infectadas (PHD) y las inoculadas con la combinación QT+TH y TH fueron bajas en contraste con las plántulas inoculadas con QT (**Fig. 4.6 A, D15**). De manera general, con la aplicación combinada de QT+TH no se observó una respuesta equivalente a lo observado con QT y TH por separado.

En cuanto a la producción de fitoalexinas previa a la inoculación con el patógeno (D0), se observó que aquellas plántulas que fueron inoculadas con la combinación QT+TH, y la aplicación individual de QT y TH, presentaron un nivel de compuestos fenólicos menor a la del testigo y a las que serían inoculadas con *Phytophthora drechsleri* (PHD) (**Fig. 4.6 B**). A las 24h de inoculado el patógeno, las plántulas inoculadas con la combinación QT+TH presentaron niveles menores a los demás tratamientos en contraste a la respuesta observada con la aplicación individual de QT y TH (**Fig.4.6 B, D1**). Diez días después de la inoculación con el patógeno, las plántulas inoculadas con la combinación QT+TH de nueva cuenta presentaron una disminución importante y significativa en la cantidad de compuestos fenólicos, con valores inferiores a los demás tratamientos (**Fig.4.6 B, D10**). Finalmente en el día 15 después de la inoculación con PHD (D15), se continuó con la tendencia observada en días anteriores con los niveles de compuestos fenólicos por debajo de los niveles observados en los demás tratamientos (**Fig.4.6 B, D15**). De manera general, la aplicación combinada de QT+TH provocó que los niveles de compuestos fenólicos

permanecieran por debajo de los niveles del testigo, sin presentar respuestas significativas en contraste a lo que se observó con la aplicación individual de QT y TH.

Finalmente se evaluó la inducción de resistencia sistémica por la inoculación por separado de QT y TH, y en combinación (QT+TH) (**Fig. 4.7**). Para esto se midieron la actividad de quitinasas y peroxidasas en hojas de plántulas de nochebuena inoculadas con cada tratamiento en el día 15 después de la inoculación con PHD (D15) con respecto a los niveles obtenidos previamente a la inoculación con PHD (D0). En cuanto a los niveles de la actividad de quitinasas en D0 se observó un comportamiento equivalente a lo detectado en las raíces (**Fig. 4.5 B**) con niveles menores de actividad en los tres tratamientos (**Fig. 4.7 A**). Mientras que al día D15 los valores en hojas tanto en QT como TH son equivalentes a los observados en el testigo y PHD, en contraste a los observados en la combinación QT+TH en donde se obtuvo un nivel significativamente mayor al de los demás tratamientos (**Fig. 4.7 A, D15**). Con respecto a la actividad de peroxidasas, no se observaron cambios entre tratamientos y testigos al presentar niveles en hojas sin diferencias significativas al D0 y D15 (**Fig. 4.7 B**). A partir de estos resultados obtenidos, se puede establecer que la respuesta sistémica se puede encontrar presente como se observó en los niveles de actividad de quitinasas, aun cuando no se presentaron diferencias en la actividad de peroxidasas. Esta respuesta sistémica quizás tenga una duración menor a los 15 días y esté relacionado a una respuesta más rápida de los mecanismos de defensa inducidos de manera temprana, y los cuales responden al ataque de un patógeno. Por lo cual será importante considerar esta evaluación en estudios posteriores.

De manera general, la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* (QT+TH) en plantas de nochebuena parece tener un efecto negativo en cuanto a la inducción de mecanismos de resistencia local y sistémica como son las proteínas PR (β 1,3-glucanasas y quitinasas) y fitoalexinas, al no presentarse un aumento en los niveles de actividad y cantidad, en contraste a lo observado con la aplicación individual de QT y TH. Estos resultados son contrarios a lo esperado, considerando que se los vías de señalización de ambos inductores son las mismas.

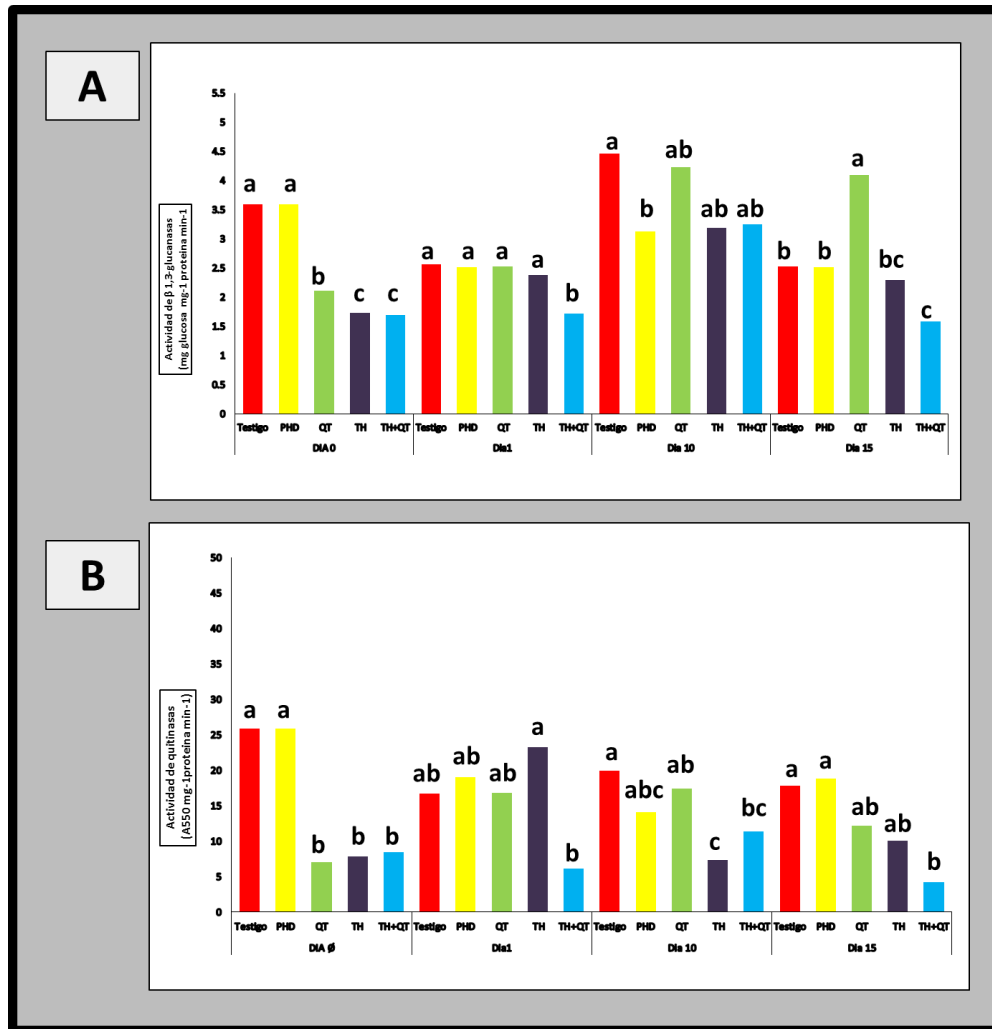


Figura 4.5. Producción de proteínas PR inducidas por la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena. D0: Día del trasplante y previo a la inoculación de PHD; **D1:** Día 1 después de la inoculación de PHD; **D10:** Día 10 después de la inoculación de PHD; **D15:** Día 15 después de la inoculación de PHD. **TESTIGO:** Plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD:** Plántulas inoculadas con *P. drechsleri*; **QT:** Plántulas con aplicación de quitosano al 0.1%; **TH:** Plántulas inoculadas con *Trichoderma harzianum* con una concentración de 1×10^6 ; **TH+QT:** Plántulas inoculadas con *Trichoderma harzianum* con una concentración de 1×10^6 y quitosano al 0.1%. **A:** Actividad de quitinasas. **B:** Actividad de β 1,3- glucanasa. Se evaluó una $n=5$, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Tukey con $P \leq 0.05$.

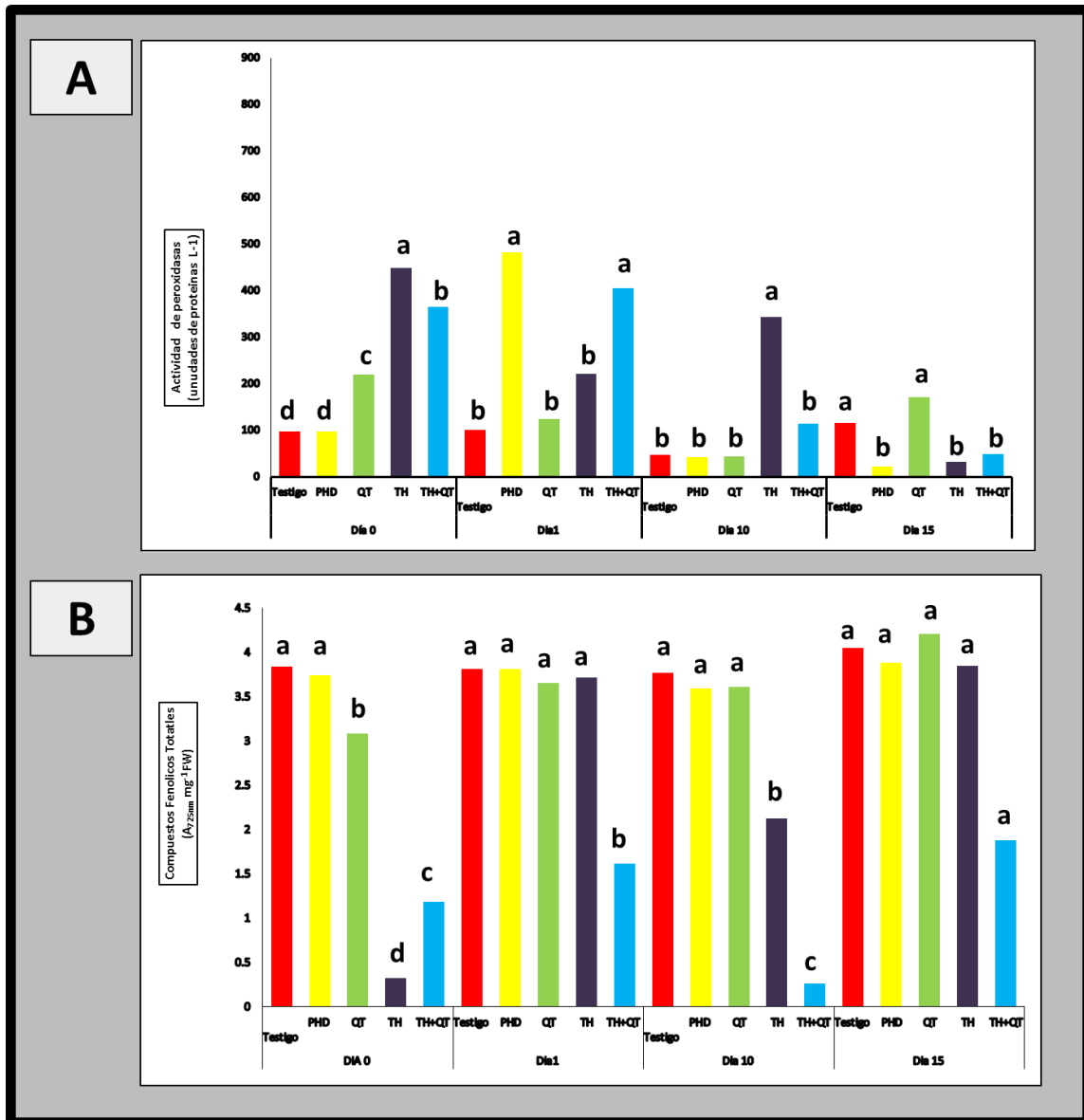


Figura 4.6. Producción de enzimas con actividad de peroxidasas y fitoalexinas inducida por la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en raíces de nochebuena. D0: Día del trasplante y previo a la inoculación de PHD; **D1:** Día 1 después de la inoculación de PHD; **D10:** Día 10 después de la inoculación de PHD; **D15:** Día 15 después de la inoculación de PHD. **TESTIGO:** Plántulas inoculadas con agua estéril; **PHD:** Plántulas inoculadas con *P. drechsleri*. ; **QT:** Plántulas con aplicación de quitosano al 0.1%; **TH:** Plántulas inoculadas con *Trichoderma harzianum* con una concentración de 1×10^6 . **TH+QT:** Plántulas inoculadas con *Trichoderma harzianum* con una concentración de 1×10^6 y quitosano al 0.1%. **A:** Actividad de peroxidasas. **B:** Producción de compuesto fenólicos. Se evaluó una $n=5$, los cuales fueron calculados a partir de un análisis no paramétrico Tukey con $P \leq 0.05$.

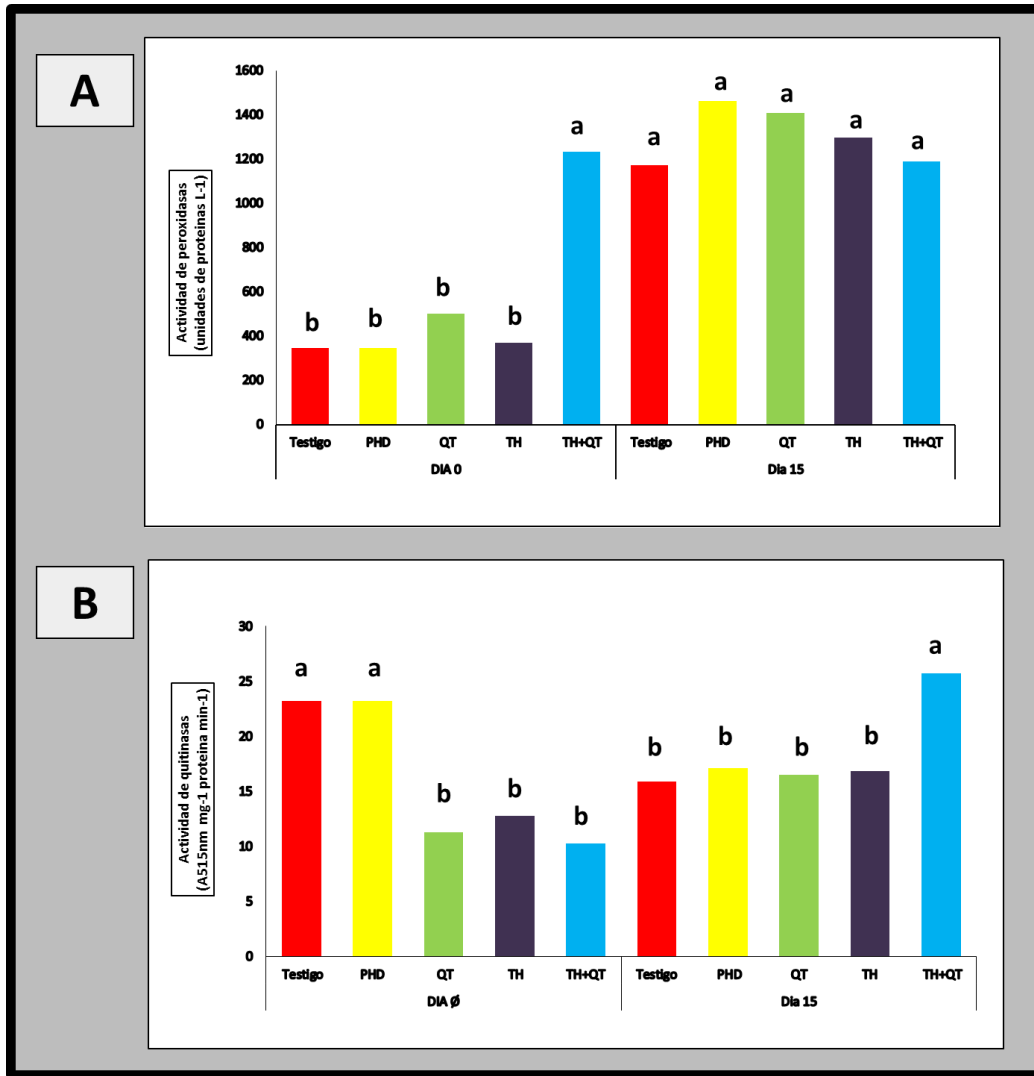


Figura 4.7. Evaluación de la inducción de resistencia sistémica por la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en hojas de nochebuena. A: Evaluación de la actividad de quitinasas en hojas de nochebuena. **B:** Evaluación de la actividad de peroxidasas en hojas de nochebuena. **D0:** Día del trasplante y previo a la inoculación de PHD. **D1:** Día 1 después de la inoculación de PHD; **D10:** Día 10 después de la inoculación de PHD; **D15:** Día 15 después de la inoculación de PHD. **Testigo:** solo agua estéril; **PHD:** plantas inoculadas con *P. drechsleri* con una concentración de 1×10^5 ; **QT:** plantas con aplicación de quitosano al 0.1%; **TH:** plantas inoculadas con *T. harzianum* con una concentración de 1×10^6 . **TH+QT:** plantas inoculadas con *T. harzianum* con una concentración de 1×10^6 y quitosano al 0.1%.

4.4 DISCUSIÓN

El uso de productos de control biológico ha ido aumentando considerablemente en la actualidad, al ya ser considerados importantes herramientas en el manejo de cultivo de prácticamente cualquier especie vegetal. Sin embargo, el uso de estos productos involucra un conocimiento que en muchas ocasiones no es transmitido de manera adecuada a los usuarios, lo que en gran medida puede significar un antecedente negativo en cuanto a su efectividad. Aunado a esto, se encuentra el surgimiento de nuevos productos con mecanismos de control novedosos que no se limitan a un efecto antagónico directo o biocida, sino a una actividad indirecta sobre los patógenos a combatir, principalmente induciendo los mecanismos de defensa vegetal que permitirán a la planta protegerse de manera efectiva contra el patógeno (Reglinski et al, 2011). Estas características le confieren al producto muchas ventajas con respecto a los métodos de control tradicionales, sin embargo, también implica un conocimiento mayor en cuanto a la selección del producto dependiendo del patógeno a combatir. Esta información podría ser equiparable al uso de un medicamento dirigido contra una enfermedad determinada, ya no solo se necesita las propiedades físico-químicas del compuesto que podría interferir en el proceso de absorción, además se requiere conocer cuál es el mecanismo de defensa que se desencadena en la planta o si no se presenta alguna interacción negativa con un producto similar. De manera general, la planta presenta dos vías de señalización vinculadas con la respuesta de defensa que provocará una resistencia local y sistémica. Una de estas vías involucra al ácido salicílico (SA) como molécula señal, mientras que otra al ácido jasmónico (JA) y al etileno (Vallad y Goodman, 2004). Lo más importante con respecto a estas vías de señalización, es que presentan un efecto antagónico entre ellas, es decir, cuando se desencadena la vía de señalización relacionada con el SA, las respuestas relacionadas con la señalización por JA y etileno son inhibidas o disminuyen de manera importante, y viceversa (Heil et al, 2002). Esto cobra relevancia cuando se ha reportado que la mayoría de los productos de control biológico que involucra el uso de microorganismos, derivados de ellos o inductores de defensa vegetal (elicitors), en mayor o menor medida inducen una respuesta de defensa en la planta, que puede incluir la resistencia local y sistémica (Cohen et al, 1993). La vía de

señalización por la cual inducen esta respuesta es variada (Thakur y Singh et al, 2013). Por lo tanto, el uso combinado de estos productos al momento ha sido abordado de manera marginal y en muchas ocasiones no se conoce el efecto en la protección de sus combinaciones. Partiendo de esta premisa, en este trabajo se consideró evaluar los efectos de la combinación de un microorganismo antagonista que también ha sido reportado como inductor de mecanismos de defensa o incluso de desencadenar resistencia sistémica como es *Trichoderma harzianum* (Nawrocka y Malolepsza, 2013), con un inductor de defensa vegetal como es el quitosano, que también ha sido reportado como inductor de resistencia sistémica (Vallad y Goodman, 2004).

Se ha reportado que la aplicación de quitosano y *Trichoderma* tiene un efecto protector contra diferentes especies del género *Phytophthora* (Lárez-Velásquez 2008; Sriam et al, 2009; El-Hadrami et al, 2010; Cruz-Ortega, 2012; Medina-Fuentes, 2013). Sin embargo, no se ha elucidado del todo si este efecto protector recae de manera exclusiva en su efecto como inductor de defensa vegetal o es en conjunto con otros mecanismos que también puede presentar (Vinale et al, 2008; El-Hadrami et al, 2010). Se considera que tanto el quitosano como *T. harzianum* inducen vías de señalización relacionadas con el ácido jasmónico que desencadenan una Resistencia Sistema Inducida (ISR) (El-Hadrami et al, 2010; Nawrocka y Malolepsza, 2013). Por este motivo se consideró viable su combinación, considerando que no tendrían un efecto antagónico por la vía de señalización diferente. Otro punto importante en esta evaluación fue que se buscó limitar la protección a la inducción de defensa vegetal, para esto se buscó que *T. harzianum* colonizara las raíces de *E. pulcherrima* al aplicarse previamente, y el sustrato en el cual se inoculó el hongo fue sustituido por sustrato estéril para evitar que el inóculo aplicado pudiera proteger por antagonismo directo. En el caso del quitosano se ha reportado un efecto negativo contra hongos y bacterias (Cruz-Ortega, 2012), por lo cual se aplicó previamente a la raíz de la planta, para provocar la inducción de defensa, y se realizó una segunda aplicación de *Trichoderma* para prevenir que hubiera sido afectado por la actividad antimicrobiana del quitosano (Cruz-Ortega, 2012).

A partir de los resultados obtenidos fue posible observar que la aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* (QT+TH) tuvo un efecto negativo sobre la protección a la infección de *P. drechsleri* en nochebuena bajo las condiciones de evaluación. Se observó que las plantas inoculadas con la combinación QT+TH presentaron síntomas foliares, en raíces y tejido vascular con mayor intensidad y en un intervalo de tiempo menor incluso que en las plantas infectadas con *P. drechsleri*. A nivel de los síntomas de la enfermedad, no se observó una protección por la combinación QT+TH, en contraste con su aplicación individual que sí presentó algún grado de protección. En cuanto a la inducción de los mecanismos de defensa, se consideraba que estos podrían verse potenciados por tener una misma vía de señalización. Sin embargo, los resultados encontrados fueron contrastantes. Por un lado se induce la HR a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri*, con una respuesta equivalente a lo observado con el quitosano, pero esta va disminuyendo su intensidad a las 48h. Se observó un fortalecimiento de la pared celular que se mantiene conforme avanza el tiempo después de la infección. Por lo tanto se consideró que la respuesta de defensa temprana se induce con la combinación QT+TH. Sin embargo, los mecanismos que se relacionan con la resistencia local y sistémica no se inducen con la combinación QT+TH, contrario a lo observado con la aplicación individual del quitosano y *T. harzianum* que presentaron una respuesta de resistencia. Es importante recalcar que la respuesta que se presenta previa a la inoculación con *P. drechsleri*, es la misma para la combinación QT+TH y la aplicación individual de quitosano y *T. harzianum*, es decir, los niveles de proteínas PR (quitinasas, peroxidasas y β 1,3-glucanasas) y fitoalexinas son similares al D0. Sin embargo, después de la inoculación con *P. drechsleri*, la combinación QT+TH, no presentó una respuesta en contraste a lo que se observó en la aplicación individual del QT y TH. Parece ser que la respuesta es retrasada de manera importante en la mayoría de los casos. El dato sobresaliente en cuanto a estas respuestas, se da con la actividad de peroxidasas en los tratamientos en donde se observó que parten de un nivel alto de actividad de peroxidasas, pero en los tratamientos con TH y QT, la actividad disminuye de manera importante a las 24h después de la inoculación con *P. drechsleri*, en la combinación QT+TH los niveles se mantienen altos. Esto provocó que la actividad de las peroxidasas fuera equivalente a la observada en las plantas infectadas, en donde se consideró que esta respuesta se relaciona con la excreción de un efector fúngico por parte

de *P. drechsleri* que indujo la actividad de peroxidasa para evitar la respuesta de resistencia local que se relaciona con la producción de ROS como moléculas señal (Torres, 2010). Un estudio relacionado realizado por Mura y colaboradores (2007) en una planta perteneciente a la familia de la nochebuena *Euphorbia characias*, se evaluaron dos enzimas relacionadas en la defensa de la planta la catalasa y antiqutin que participan directamente en la respuesta de la defensa de las plantas, mediada por el estallido oxidativo y que se cree que también actúan como mensajeros para la inducción de resistencia sistémica de la planta. Las evaluaciones se realizaron en el látex y hojas jóvenes de las plantas, los resultados mostraron que en el látex se encuentra la presencia de la catalasa y la antiqutin, mostrando la probabilidad de que *E. characias* utilice como mecanismos de defensa estas dos enzimas ante un estrés biótico o abiótico. Por lo tanto, podría considerarse que las enzimas con actividad de peroxidasas tienen un papel importante en la protección de las plantas del género *Euphorbia*.

Por otro lado, se observó que la combinación QT+TH indujo una respuesta temprana contra *P. drechsleri*, pero esta respuesta no se mantuvo o propagó para inducir la respuesta de resistencia que si se observó en la aplicación individual del quitosano y *T. harzianum*. Estas observaciones resultan inesperadas, ya que se consideró que al no ser de rutas de señalización antagónicas, la respuesta observada sería de un potenciamiento de los mecanismos de defensa vegetal.

En un estudio en donde se evaluaron diferentes combinaciones de *T. harzianum* y quitosano para determinar su protección en plántulas de chile se observó que producen una disminución en el grado de protección, así como un aumento de la incidencia y severidad de la enfermedad de marchitez y pudrición de tallo provocada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile (Cruz-Ortega, 2012; Medina-Fuentes, 2013). Sin embargo, en el reporte de Cruz-Ortega (2012), se observó que la inhibición por quitosano depende de la concentración utilizada. Para los hongos de control biológico destacó la concentración de 0.1% en la cual se observó el menor efecto sobre los hongos, incluso se presentó un efecto benéfico en condiciones *in vitro*. Y en esta misma concentración se observó que en los oomicetos *P. capsici* y *P. drechsleri* hay un efecto de inhibición del crecimiento. Por lo

tanto, esta concentración se utilizó para realizar este estudio, ya que mostró en condiciones *in vitro* ser adecuada para la interacción con el microorganismo de control biológico *T. harzianum*. Sin embargo, se mostró que la combinación de *T. harzianum* y quitosano en plantas de nochebuena hubo en efecto negativo en la protección, similar al del quitosano aplicado por separado. Otro estudio similar que explora la combinación de inductores de defensa vegetal y microorganismos antagonistas, los encontramos en el realizado por Philion y colaboradores (2011) en donde utilizan un microorganismo antagonista (*Pantoea vagans*) y el Actigard (BTH, Acibenzolar-S-methyl) como inductor de defensa vegetal en la protección contra *Erwinia amylovora*. Ellos observaron que la combinación de ambos productos presentó una protección menor a la aplicación de manera individual de cada producto, lo que es posible relacionar con los resultados encontrados en este trabajo, aunque de nueva cuenta no se revisan los mecanismos de defensa involucrados en el control de la enfermedad.

La mayoría de los estudios de combinaciones de productos han sido limitados a la evaluación de la protección de la planta sin ahondar en los mecanismos involucrados en esta protección o la falta de esta (Cruz-Ortega, 2012, Medina-Fuentes, 2013). Por lo tanto, es difícil encontrar una explicación a los resultados obtenidos. Una posible explicación podría encontrarse en cuanto a la correcta vía de señalización por la cual induce resistencia *T. harzianum*. En una revisión de literatura enfocada a la protección de diferentes especies del género *Trichoderma* por la inducción de defensa vegetal (Nawrocka y Malolepsza, 2013), discuten que esta protección ha sido descrita en algunos casos como Resistencia Sistémica Inducida (ISR) y en otras ocasiones se considera como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), esto cobra relevancia cuando, como se describe previamente, son vías de señalización antagónicas. ¿Esto podría estar pasando en la combinación QT+TH? Será importante considerar algunas pruebas que nos permitan en un futuro elucidar si la respuesta inducida por *T. harzianum* sigue la vía del SA o del JA, con los datos disponibles en este trabajo no es posible concluir si esta es la hipótesis correcta.

Otra posible explicación podría estar dada por las condiciones nutricionales de la planta. Se ha especulado que el que se desencadene una respuesta de defensa en la planta provoca un

consumo mayor de recursos y nutrientes, lo que provoca deficiencias a nivel de algunos microelementos provocando una mayor predisposición a la infección (Heil y Baldwin, 2002; Freeman y Beattie, 2008). En el caso de la nochebuena, se observó que es necesario una adecuada suplementación de nutrientes, que al faltar provocan síntomas de estrés en la planta, haciéndola más susceptible a los cambios de temperatura y a factores abióticos. Sin embargo, de nueva cuenta no hay información suficiente para poder concluir que la respuesta observada en la aplicación de la combinación QT+TH se debió a una nutrición deficiente.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten conocer cómo se desencadenan la respuesta de *Euphorbia pulcherrima* bajo el ataque de un oomiceto como es *Phytophthora drechsleri*. Adicionalmente con el uso de los diferentes inductores de defensa vegetal, fue posible conocer de manera más detallada las características de la interacción compatible e incompatible *E. pulcherrima* – *P. drechsleri*. Sin embargo, también nos generan más preguntas y en este momento no se cuenta con la información necesaria para explicar la respuesta de la planta a la combinación QT+TH, aunque sienta las bases para estudios más exhaustivos que nos permitan conocer la naturaleza de las interacciones entre los inductores de defensa vegetal.

4.5 CONCLUSIONES

- La aplicación combinada de quitosano y *Trichoderma harzianum* a la raíz de la planta de nochebuena no induce una protección contra la infección de *Phytophthora drechsleri*, y provoca que los síntomas de la infección se presenten en un intervalo de tiempo menor.
- La aplicación combinada de quitosano y *T. harzianum* a la raíz de la planta de nochebuena induce mecanismos de defensa tempranos como la respuesta hipersensible y fortalecimiento de la pared celular pero no los mecanismos de defensa relacionados con la resistencia.
- La aplicación combinada de quitosano y *T. harzianum* a la raíz de la planta de nochebuena no provocó el potenciamiento de la respuesta de defensa en contraste con la aplicación individual de quitosano y de *T. harzianum*.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

- Allardyce JA. 2011. Defence mechanisms of a resistant monocot model to *Phytophthora cinnamomi*. Thesis of Doctor. University Deakin. pp:219.
- Baranski R, Klocke E and Nothnagel T. 2008. Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* enhances resistance of transgenic carrot to fungal pathogens. *Phytopathology* (156):513-521.
- Cano MA. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & y Divulgación Científica* 14(2):15-31.
- Castro-Rocha A, Fernández-Pavía SP y Osuna-Ávila P. 2011. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:49-65.
- Chaparro AP, Hoyos-Carvajal A and Orduz S. 2011. Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. *Agricultural Sciences* 2(3):301-307.
- Chen XR, Xin-Le W, Zheng-Guang Z, Yuan-Chao W and Xiao-Bo Z. 2008. Differences in the induction of the oxidative burst in compatible and incompatible interactions of soybean and *Phytophthora sojae*. *Plant Pathology* 73:16-24.
- Chittenden C and Singh T. 2009. In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. *Biological Control*. 50:262-266
- Cohen Y, Gisi U and Niderman T. 1993. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* 83(10):1054-1062.
- Cruz-Ortega J. 2012. Interacción del quitosano con microorganismos de control biológico y el efecto en su actividad protectora contra *Phytophthora capsici*. Tesis para obtener el grado de Ingeniero. Universidad Tecnológica de Costa, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. p.113.
- El-Hadrami A, Adam LR, El-Hadrami I and Daayf F. 2010. Chitosan in plant protection. *Marine Drugs* 8:968-987.
- Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K and Kim W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 6:709-725.
- Khan MO and Shahzad S. 2007. Screening of *Trichoderma* species for tolerance to fungicides. *Pakistan Journal of Botany* 39(3):945-951.
- Lárez-Velásquez C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola* 8(1):1-22.
- López-Mondéjar R, Blaya J, Obiol M, Ros M and Pascual JA. 2012. Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: In vitro and greenhouse nursery experiments. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103(1):1-8.

Lundstedt J y Valdés R. 2013. Mecanismos de defensa de las plantas e inducción de resistencia. *Departamento Técnico ASP Chile S.A. Boletín técnico N°11*. pp:1-4.

Madriz-Ordeñana K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* 63:22-32.

Medina-Fuentes S. 2013. Evaluación de la combinación de quitosano, quitina y *Trichoderma* sp. en el control de *Phytophthora capsici* L. en chile serrano (*Capsicum annuum*). Tesis para obtener el grado de Ingeniero. Universidad Tecnológica de Costa, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. p.102.

MINSA, MIDA, MEDUCA y JICA. 2010. Guía del Manejo Integrado de Plagas (MIP) para técnicos y productores Version 1. Proyecto para el mejoramiento del consumo y la disponibilidad de alimentos en comunidades de la provincia de Veraguas. 57p. disponible en: http://www.jica.go.jp/project/panama/0603268/materials/pdf/04_manual/manual_01.pdf. Consultado el 25/04/2014.

Molano JA, Durán A and Cabib E. 1977. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated/chin. *Analytical Biochemistry* 83:648-656.

Mukherjee M, Mukherjee PK, Horwitz BA, Zachow C, Berg G and Zeilinger S. 2012. Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. *Indian Journal Microbiol* 52(4):522-529.

Mura A, Pintus F, Medda R, Floris G, Rinaldi AC and Padiglia A. 2007. Catalase and antiquitin from *Euphorbia characias*: two proteins involved in plant defense?. *Biochemistry* 72(5):501-508.

Nawrocka J and Małolepsza U. 2013. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control* 67:149-156.

Patto MC and Niks RE. 2001. Leaf wax layer may prevent appressorium differentiation but does not influence orientation of the leaf fungus *Puccinia hordei* on *Hordeum chilense* leaves. *European of Journal of Plant Pathology* 107: 795-797.

Reglinski T, Wurms K and Elmer P. 2011. Short report on commercially available elicitors, natural products and microbes for evaluation against *Pseudomonas syringae* pv. Actinidiae. *The New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited*. p. 23.

Rodríguez AT, Ramírez MA, Falcón A, Utria E y Bautista S. 2006. Estimulación de algunas enzimas en plantas de arroz (*Oryza sativa*, L.) tratadas con un hidrolizado de quitosana. *Cultivos Tropicales* 27(2):87-91.

Sanzón-Gómez D. 2010. Comparación de los cambios estructurales en células de chile CM334 en una interacción compatible y una incompatible. Tesis de doctorado. Montecillo, Texcoco, edo. de México. 37p.

Serrano-Carreón L, Galindo-Fentanes E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia* 1(58):77-88.

Sriram S, Manasa SB and Savitha MJ. 2009. Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. *Journal Biological Control* 23(4):449-456.

Thakur M and Sohal BS. 2013. Role of Elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. *ISRN Biochemistry*. pp: 10.

Torres MA. 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* (138):414-429.

Vinalea F, Sivasithamparamb K, Ghisalbertic EL, Marraa R, Wooa SL, Loritoa M. 2008. Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1-10.

CAPITULO V DISCUSIÓN GENERAL

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se pudo proponer un modelo preliminar de la interacción *Euphorbia pulcherrima* – *Phytophthora drechsleri*, tanto en interacciones compatibles como incompatibles relacionadas con la protección por la inducción de mecanismos de defensa vegetal.

5.1 INFECCIÓN DE *Phytophthora drechsleri* EN *Euphorbia pulcherrima*

El oomiceto *Phytophthora drechsleri* (**PHD**) ingresó a la planta (*Euphorbia pulcherrima*) a partir de sus zoosporas infectivas (**Fig. 5.1**). Después de esto, se observó una respuesta temprana de la planta que se relacionó con la Respuesta Hipersensible (HR). A las 24 horas después de la inoculación con PHD se observó un aumento en la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (**ROS**) y la inducción de muerte celular programada (**PCD**). Además, se observó un fortalecimiento de la pared celular por la acumulación de calosa (**CALO**) y lignina (**LIGN**), señales que en conjunto, nos indicaron que la planta detectó el ingreso del oomiceto. Sin embargo, esta activación fue disminuyendo después de 48h de la inoculación del oomiceto. Uno de los aspectos más destacables de esta interacción compatible se observó con el aumento significativo de la actividad enzimática de las peroxidasas (**POX**), que se reflejó como una disminución significativa de la acumulación de las ROS y PCD. Por otra parte, no se observaron señales de la inducción de resistencia local o sistémica, al no presentarse la inducción de la producción de proteínas PR (glucanasas y quitinasas) y de fitoalexinas con respecto a las plantas sanas. Estas observaciones permiten inferir que PHD podría producir un efector fúngico que induce la actividad de las peroxidasas, lo que a su vez provocó la inhibición de las ROS, que se reportan como moléculas con un papel importante en la transmisión de la señal de resistencia local y sistémica. Al ser depuradas por la alta actividad de las POX, la señal responsable de la inducción de la resistencia local no se llevó a cabo. Aunado a esto, se observaron respuestas localizadas en los sitios en donde el oomiceto fue detectado, pero estas respuestas fueron aisladas y no correspondieron a una respuesta de defensa efectiva. En

cuanto a los síntomas de la infección se observó una alta presencia de PCD pero aisladas una de otra, lo que se relaciona con la necrosis progresiva en el tejido vascular de la planta.

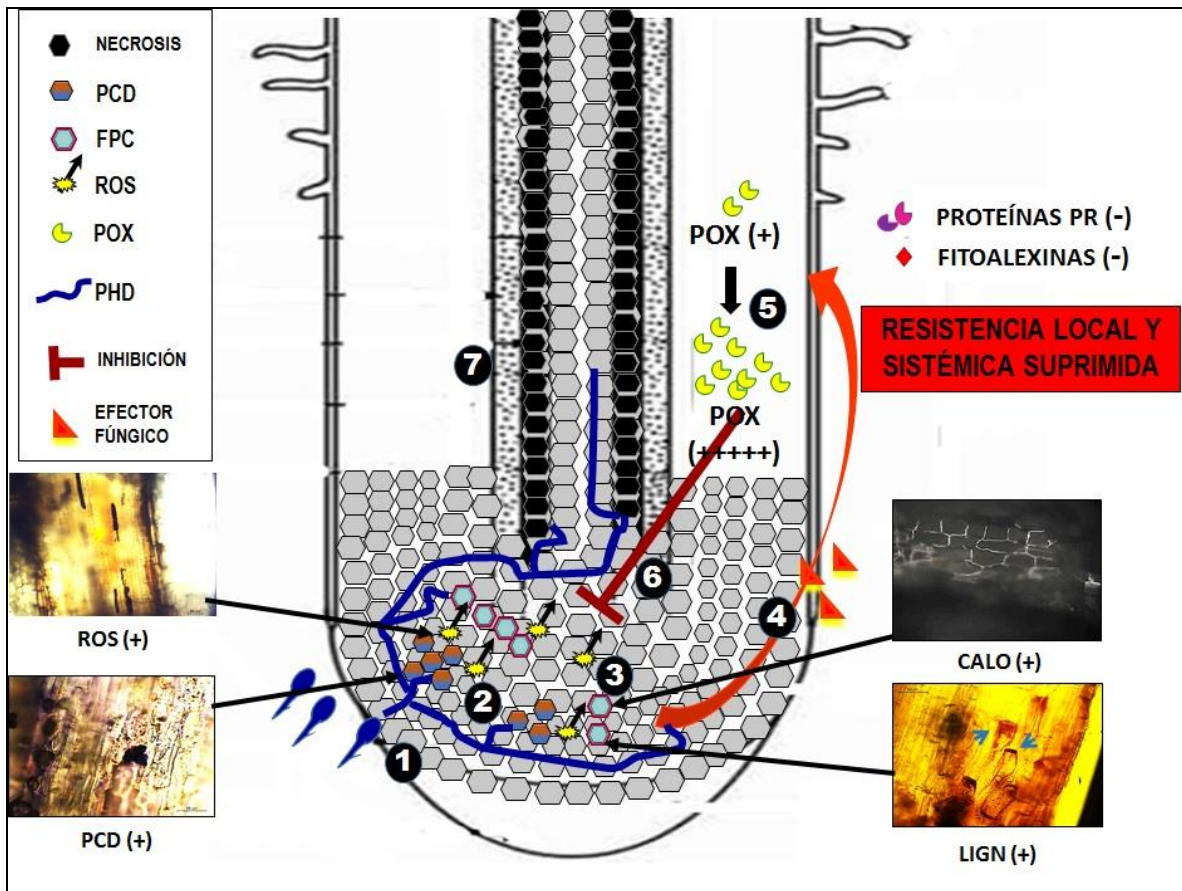


Figura 5.1 Modelo propuesto para la infección de *Phytophthora drechsleri* en *Euphorbia pulcherrima*.

1: Penetración del oomiceto (PHD) a la raíz y posterior colonización de las células vegetales; **2:** Detección del oomiceto y desencadenamiento de la Respuesta Hipersensible (PCD); **3:** Fortalecimiento de la pared celular (FPC) con la acumulación de calosa (CALO) y lignina (LIGN) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); **4:** Producción de efectores fúngicos por parte del oomiceto; **5:** Inducción de la actividad de peroxidasas (POX) por medio del efector fúngico; **6:** Inhibición de las moléculas señaladoras (ROS) por acción de las peroxidasas lo que provoca la supresión de la resistencia local y sistémica; **7:** Colonización por parte del oomiceto e inducción de necrosis en el tejido vascular.

La interacción establecida aunque compatible parece indicar que no es selectiva del hospedero (non-host), ya que los síntomas observados no permiten diferenciar una etapa biotrófica característica de las interacciones selectivas de hospedero de los oomicetos. La

respuesta observada corresponde a un proceso infeccioso muy agresivo en donde el patógeno no logró pasar desapercibido con la desactivación de la respuesta de defensa de la planta, lo que a su vez le permitiría establecer una etapa biotrófica de la enfermedad. Lo interesante de los resultados obtenidos es la posibilidad de que PHD produzca un efector fúngico diferente a los que hasta el momento se reportan. La mayoría de los efectores reportados para *Phytophthora* y los oomicetos en general se relacionan con la inhibición de enzimas de defensa incluyendo a las peroxidases. En este estudio los resultados obtenidos nos permiten inferir una posible activación de enzimas relacionadas con el control de daño celular, aunque en este caso con la finalidad de inhibir las moléculas señalizadoras de la respuesta de resistencia. A partir de estos resultados se generaron las bases para estudios que permitan comprobar o desechar esta hipótesis en un oomiceto poco estudiado como es *Phytophthora drechsleri*.

5.2 INDUCCIÓN DE PROTECCIÓN DEL QUITOSANO EN *Euphorbia pulcherrima* CONTRA LA INFECCIÓN DE *Phytophthora drechsleri*

El quitosano es un polímero que induce la defensa vegetal y se ha relacionado con la protección contra hongos y oomicetos fitopatógenos. Esta protección se ha reportado contra la infección de *Phytophthora capsici* en *Capsicum annuum*. A partir de esto se consideró que esta actividad también podría ser equivalente para la interacción *Euphorbia pulcherrima* – *Phytophthora drechsleri*.

Cuando se aplicó previamente el quitosano (QT) a la infección con *Phytophthora drechsleri* (PHD) (**Fig. 5.2**), se observó que la respuesta hipersensible (HR) fue de mayor magnitud que la observada en una interacción compatible (**Fig. 5.1**). Se observó una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a su vez la inducción de muerte celular programada (PCD). En cuanto al fortalecimiento de la pared celular la acumulación de calosa (CALO) y lignina (LIGN) fue mayor que con respecto a las plantas infectadas con PHD. Con respecto al principal indicador de patogénesis en las plantas infectadas, que fue el aumento considerable de la actividad de peroxidases (POX), se observó que inicialmente se partió de un nivel de actividad mayor que con respecto a la planta sana, y a las 24h después de la inoculación del oomiceto, la actividad de POX disminuyó de manera

importante hasta un nivel equivalente a la planta sana. Esto implicó, que contrario a lo observado en la planta infectada, se presentó una transferencia de la señal de resistencia por las ROS, y a su vez, la inducción de resistencia local y sistémica. Esto pudo comprobarse con la inducción de la actividad de proteínas PR y de fitoalexinas que fueron mayores en comparación a las plantas sanas e infectadas con PHD.

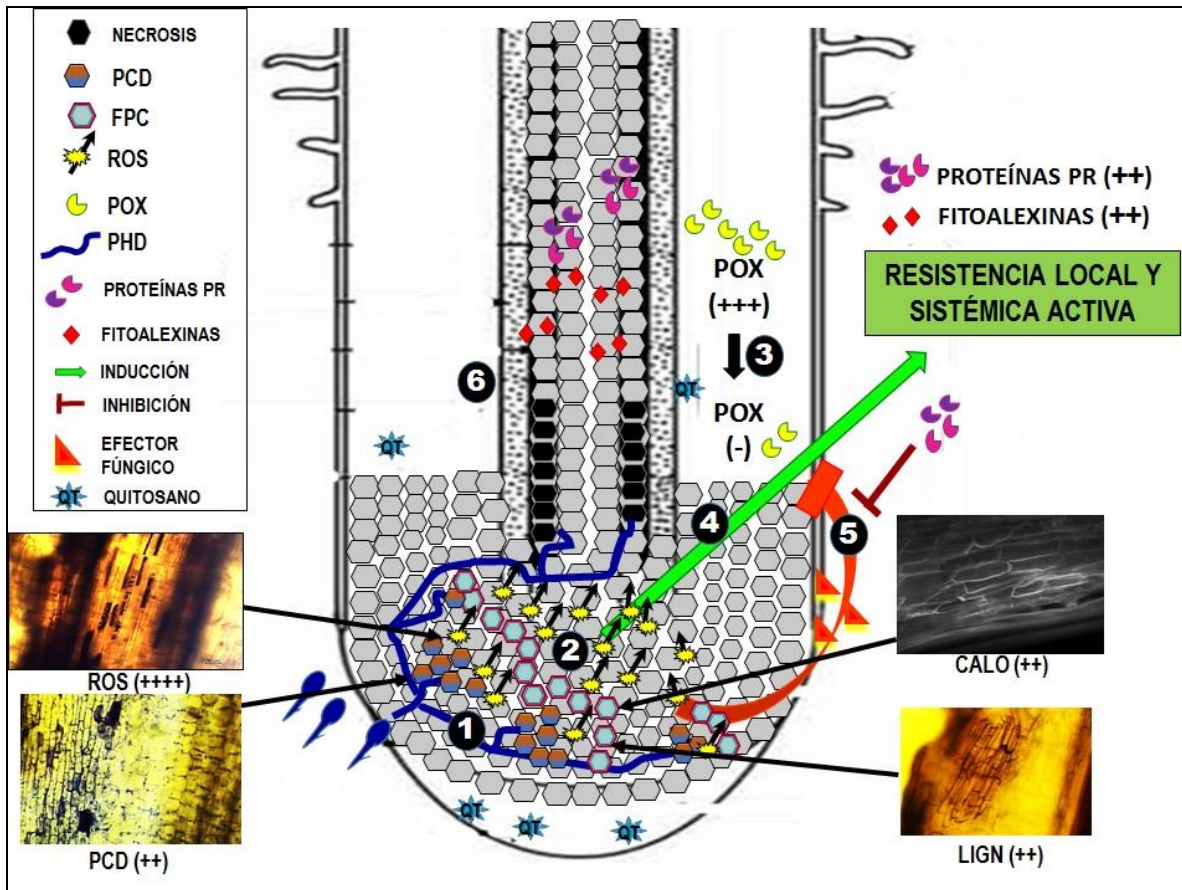


Figura 5.2 Modelo propuesto de la protección contra *Phytophthora drechsleri* inducida por quitosano en *Euphorbia pulcherrima*.

1: Detección del oomiceto (PHD), desencadenamiento de la Respuesta Hipersensible (PCD) y Fortalecimiento de la pared celular (FPC); **2:** Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como moléculas señalizadoras; **3:** Disminución de la actividad de peroxidasas (POX); **4:** Inducción de la respuesta de resistencia local y sistémica, con un aumento en la producción de proteínas PR y fitoalexinas; **5:** Inactivación del efector fúngico con proteínas PR no conocidas; **6:** Inducción de defensa de resistencia que presenta un tiempo de efectividad corto, al presentarse necrosis en tejido vascular pero en menor proporción que en una interacción compatible.

Con la aplicación del quitosano, se observó una protección contra la infección de PHD, por la disminución significativa de la presencia de necrosis del tejido vascular. Sin embargo, esto no implicó la erradicación de la enfermedad, ya que los síntomas son retrasados y equivalentes a las primeras etapas de la infección después de 10 días después de la inoculación con PHD. Esto puede deberse a que el quitosano fue inoculado en una sola ocasión, y su efecto de protección disminuye conforme transcurre el tiempo y sería necesario una re-inoculación después de la primera aplicación.

5.3 INDUCCIÓN DE PROTECCION POR *Trichoderma harzianum* EN *Euphorbia pulcherrima* CONTRA LA INFECCION DE *Phytophthora drechsleri*

La inoculación previa de cepas de *Trichoderma* ha sido reportada ampliamente como un método efectivo para proteger a diferentes cultivos contra la infección de hongos y oomicetos fitopatógenos. Sin embargo, en la mayoría de estos estudios no se discrimina si la protección está dada por alguno de los mecanismos de antagonismo directo o por la inducción de defensa vegetal. En este trabajo se buscó que la actividad predominante para el control sea por la inducción de defensa vegetal.

Cuando se aplicó previamente *Trichoderma harzianum* (TH) a la infección con *Phytophthora drechsleri* (PHD) (Fig. 5.3), se observó que la respuesta hipersensible (HR) fue de mayor magnitud que en las plantas infectadas (Fig. 5.1) pero de menor intensidad que con la inoculación de quitosano (Fig. 5.2). Se observó una menor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que en el quitosano (QT), aunque una mayor presencia de muerte celular programada (PCD). El fortalecimiento de la pared celular por la acumulación de calosa (CALO) fue mayor que con respecto al quitosano, aunque la acumulación de lignina (LIGN) fue equivalente en ambos. Con respecto al principal indicador de patogénesis en la plantas infectadas, que fue el aumento considerable de la actividad de peroxidasas (POX), se observó que inicialmente se partió de un nivel de actividad mayor que con respecto a la planta sana, y a las 24h después de la inoculación del oomiceto, la actividad de POX disminuyó de manera importante hasta un nivel equivalente a la planta sana, considerando que los niveles de POX eran incluso mayores a los

observados en QT. Esto implicó, que al igual que con la adición de QT, se observó una transferencia de la señal por las ROS y a su vez la inducción de resistencia local y sistémica. En este caso la inducción de proteínas PR fue equivalente al nivel observado con la aplicación del QT, mientras que se indujo una mayor cantidad de fitoalexinas.

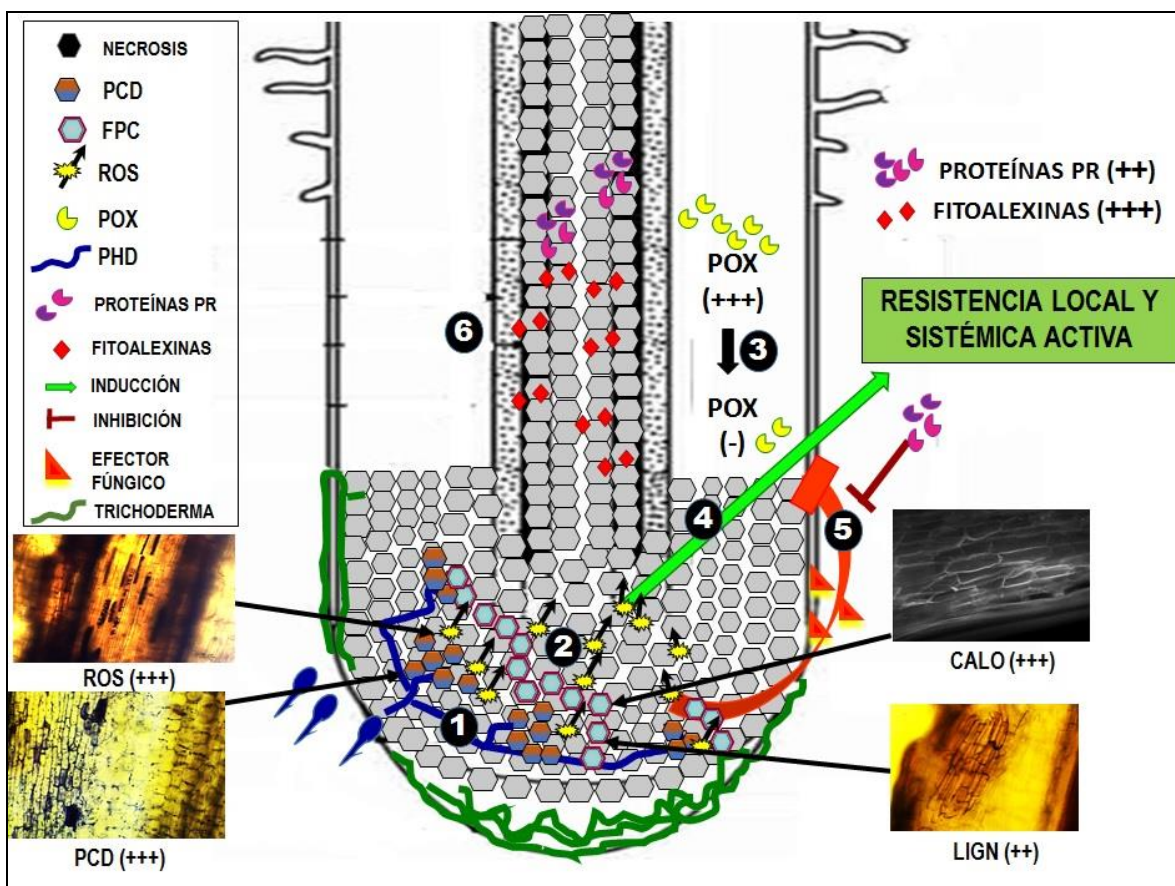


Figura 5.3 Modelo propuesto de la protección contra *Phytophthora drechsleri* inducida por *Trichoderma harzianum* en *Euphorbia pulcherrima*.

1: Detección del oomiceto (PHD), desencadenamiento de la Respuesta Hipersensible (PCD) y Fortalecimiento de la pared celular (FPC); **2:** Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como moléculas señaladoras; **3:** Disminución de la actividad de peroxidasas (POX); **4:** Inducción de la respuesta de resistencia local y sistémica, con un aumento en la producción de proteínas PR y fitoalexinas; **5:** Inactivación del efector fúngico con proteínas PR no conocidas; **6:** Inducción de defensa de resistencia efectiva, no se observan síntomas evidentes de necrosis vascular.

La inoculación de *T. harzianum* reduce significativamente la presencia de los síntomas de la enfermedad y en este caso, al contrario a lo observado con el quitosano, la protección se mantiene por mucho más tiempo, sin la necesidad de una inoculación posterior a la

infección. Esto puede deberse a que TH coloniza la raíz de nochebuena y la activación de los mecanismos de defensa puede ser constante.

5.4 INTERACCIÓN DE QUITOSANO Y *Trichoderma harzianum* EN LA INFECCION DE *Phytophthora drechsleri* EN *Euphorbia pulcherrima*

La combinación de diferentes métodos de control de enfermedades es una práctica común en la agricultura ya sea para aumentar la actividad de ambos o por ser empleados en un manejo integrado del cultivo. Sin embargo, con el surgimiento de los inductores de defensa vegetal y las vías de señalización implicadas en la inducción de la protección que pueden llegar a ser antagónicas, la posibilidad que presenten una interacción negativa va en aumento. Partiendo de esta premisa, en este trabajo se evaluó la interacción entre *Trichoderma harzianum* (TH) y el quitosano (QT) como inductores de defensa vegetal. Ambos inducen mecanismos de protección en nochebuena cuando son aplicados de manera aislada. Además, se consideró que ambos están relacionados con la misma vía de señalización (ácido jasmónico) e inducción de resistencia sistémica (ISR). Por lo tanto se esperaba que la respuesta observada fuera potenciada.

Cuando se aplicó previamente *Trichoderma harzianum* y quitosano (TH+QT) a la infección con *Phytophthora drechsleri* (PHD), se observó que, de maneja general, las respuestas tempranas se incrementaron de manera significativa en comparación a la aplicación aislada de TH y QT, y en algunos casos, la respuesta observada fue equivalente o incluso mayor (Fig. 5.4). La respuesta hipersensible (HR) fue de mayor magnitud que en las plantas infectadas (Fig. 5.1) pero de menor intensidad que con la inoculación aislada de QT (Fig. 5.2) o TH (Fig. 5.3). Se observó una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y presencia de muerte celular programada (PCD) que en TH y QT. El mismo comportamiento se observó en el fortalecimiento de la pared celular, con la acumulación de calosa (CALO) y de lignina (LIGN). Con respecto al principal indicador de patogénesis en la plantas infectadas, que fue el aumento considerable de la actividad de peroxidasas (POX), se observó que inicialmente se partió de un nivel de actividad mayor que con respecto a la planta sana aunque equivalente a TH, pero esta actividad no disminuyó a las 24h después de la inoculación del oomiceto, como se observó con TH y

QT, al contrario se mantiene elevada y no disminuye hasta las etapas avanzadas de la enfermedad. Esto implicó que de manera equivalente a lo observado con las plantas infectadas con PHD, la transferencia de la señal por ROS se inhibiera, y a su vez la respuesta de resistencia local y sistémica no fuera activada. Esto fue comprobado con la ausencia de producción de proteínas PR y fitoalexinas en las etapas tempranas de la enfermedad.

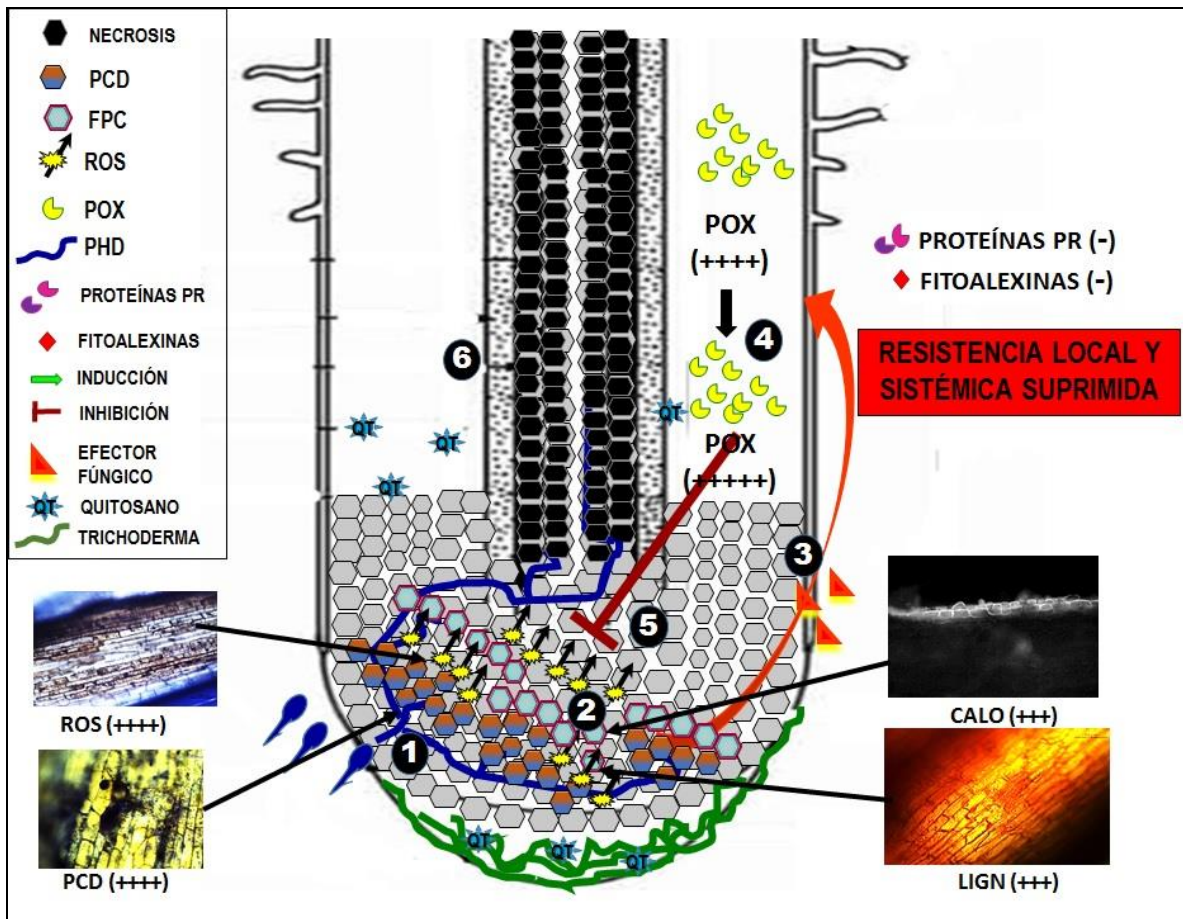


Figura 5.4 Modelo propuesto de la interacción de quitosano y *Trichoderma harzianum* en la infección de *Phytophthora drechsleri* en *Euphorbia pulcherrima*.

1: Detección del oomiceto (PHD), desencadenamiento de una Respuesta Hipersensible (PCD) y fortalecimiento de la pared celular (FPC) importante; **2:** Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como moléculas señalizadoras; **3:** Producción de efectores fúngicos por parte del oomiceto; **4:** Inducción de la actividad de peroxidasa (POX) por medio del efector fúngico, la actividad ya se encuentra elevada antes de la inoculación del oomiceto; **5:** Inhibición de las moléculas señalizadoras (ROS) por acción de las peroxidasa lo que provoca la supresión de la resistencia local y sistémica; **6:** colonización por parte del oomiceto e inducción de necrosis en el tejido vascular, la respuesta es mayor que en el proceso de infección de PHD.

La inoculación combinada de *T. harzianum* y quitosano (TH+QT) provocó un aumento considerable en los síntomas de la enfermedad reduciendo el tiempo en que se presentaron los síntomas severos de la enfermedad e incluso muerte de la planta. Esto puede deberse a que la HR se indujo de manera significativa aunque de manera aislada, como se observó en las plantas infectadas con PHD. La PCD inducida fue de una mayor intensidad y extensión, lo que aceleró la presencia de la necrosis del tejido vascular. Esta respuesta plantea varias interrogantes que a partir de los evaluaciones realizadas no pueden concluirse. Estas interrogantes incluyen: Si la respuesta de defensa realmente se ve potenciada ¿Qué inhibe la transferencia de la señal de ROS? ¿El efector fúngico o la respuesta inducida por TH+QT?

¿Las vías de señalización inducidas por el quitosano y *T. harzianum* son las mismas?

A partir de este trabajo se pudo generar información importante con respecto a la interacción *Euphorbia pulcherrima* – *Phytophthora drechsleri*, que incluye el proceso de infección, así como los mecanismos de defensa efectivos contra esta. Sin embargo, quizás la contribución más importante sean las preguntas generadas tanto a nivel específico de la interacción, como de las interacciones hospedero no específicas del género *Phytophthora*.

CONCLUSIONES FINALES

- Se logró la caracterización de *Phytophthora drechsleri-Euphorbia pulcherrima*, obteniendo una escala de severidad de la enfermedad que podrá ser utilizada en evaluaciones contra la enfermedad.
- A partir de la interacción *P. drechsleri-E. pulcherrima*, se describieron las respuestas de la planta a la infección con *P. drechsleri*, a nivel de respuestas inducidas de manera temprana así como las relacionadas con la resistencia.
- La aplicación de quitosano presentó una protección limitada contra la infección de *P. drechsleri*. En la inoculación de *T. harzianum* presenta una protección efectiva contra la infección de *P. drechsleri*.
- La aplicación por separado de *Trichoderma harzianum* y quitosano, mostró que los mecanismos de defensa vegetal inducidos son diferentes entre sí. Siendo más efectiva la respuesta inducida por *T. harzianum*.
- La aplicación combinada de quitosano y *T. harzianum* a la planta de nochebuena no presenta protección contra *P. drechsleri*.
- La aplicación combinada de quitosano y *T. harzianum* induce mecanismos de defensa tempranos, pero no los mecanismos de defensa relacionados con la resistencia en las plantas de nochebuena contra *P. drechsleri*.
- La aplicación combinada de quitosano y *T. harzianum* presenta un efecto negativo sobre las plantas de nochebuena, en contraste a la aplicación individual del quitosano y *T. harzianum*.