



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



**Efecto de dos elicitores en la inducción de respuestas
de defensa en *Theobroma cacao* L. y *Persea americana***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA

PRESENTA

Biól. Alexa Paola Plaza Ávila

COMITÉ TUTORAL

Dra. Antonia Gutiérrez Mora

Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapata

Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate

Zapopan, Jalisco, 30 de Enero 2023.

JUNTA DIRECTIVA

Directora de tesis

Dra. Antonia Gutiérrez Mora

Co-director de tesis

Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapata

Asesor

Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate



Guadalajara, Jalisco a 16 de enero de 2023

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Alexa Paola Plaza Ávila**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “EFECTO DE DOS ELICITORES EN LA INDUCCIÓN DE RESPUESTAS DE DEFENSA EN *Theobroma cacao* L. Y *Persea americana*” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día dieciséis del mes de enero del año dos mil veintitrés.

Antonia Gtz. M.
Dra. Antonia Gutiérrez Mora

Director de tesis/tutor académico

Joaquín Alejandro Qui Zapata
Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapata
Co-director de tesis/tutor en planta

Carlos Hugo Avendaño Arrazate
Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate
Asesor/Asesora



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 26 de enero de 2023

Ref. CP/144/2023

ALEXA PAOLA PLAZA ÁVILA
ESTUDIANTE DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 2003MB6510
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis **“Efecto de dos elicitores en la inducción de respuestas de defensa en *Theobroma cacao* L. y *Persea americana*”** desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. Antonia Gutiérrez Mora. Directora de tesis
Dr. Joaquín Alejandro Qui Zapopan. Co-director de tesis
Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate. Asesor de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención de grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo
Directora Adjunta de Investigación y Posgrado



AGRADECIMIENTOS

Al Centro Público de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ) por admitirme para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la asignación de beca de maestría No. CVU 1025542.

Al proyecto FORDECYT “Generación de estrategias científico-tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México” del cual forma parte el presente trabajo de investigación.

Al Instituto de Ecología (INECOL) por proporcionar la cepa de *Fusarium* sp. utilizada durante el desarrollo del proyecto.

Al comité tutorial por compartir su tiempo y sus conocimientos, siempre mostrando gran disposición de ayudar en todo lo necesario, además de los buenos momentos compartidos.

A todo el personal del INIFAP Campus Experimental Rosario Izapa por las facilidades otorgadas para el desarrollo de los experimentos con cacao.

A mis compañeros y personal de la Unidad de Biotecnología Vegetal, por todos los consejos y apoyo.

A mi familia y amigos, por el apoyo y motivación durante esta etapa.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Formación de callo a partir de pétalos y estaminoides en <i>Theobroma cacao</i> L..... | 23 |
| Figura 2. Establecimiento de prueba de barrenado en <i>Theobroma cacao</i> L. | 25 |
| Figura 3. Proliferación de yemas axilares <i>in vitro</i> en <i>Theobroma cacao</i> L. | 31 |
| Figura 4. Embriogénesis somática en <i>Theobroma cacao</i> L. | 33 |
| Figura 5. Daño en tallos de plantas de cacao 5 días después de la inoculación de <i>Fusarium</i> sp. | 34 |
| Figura 6. Daño en tallos de plantas de cacao 60 días después de la inoculación de <i>Fusarium</i> sp. | 35 |
| Figura 7. Cortes de tallo de <i>Theobroma cacao</i> L., día 5..... | 37 |
| Figura 8. Cortes de tallo de <i>Theobroma cacao</i> L., día 15..... | 38 |
| Figura 9. Plantas de <i>Theobroma cacao</i> L., día 15 | 39 |
| Figura 10. Evaluación de colonización de <i>Fusarium</i> sp. en tallos de cacao | 40 |
| Figura 11. Cortes de tallo de <i>Persea americana</i> , día 5. | 48 |
| Figura 12. Cortes de tallo de <i>Persea americana</i> , día 15. | 49 |
| Figura 13. Actividad de peroxidasas en hojas de aguacate (ácido salicílico). | 51 |
| Figura 14. Actividad de peroxidasas en hojas de aguacate (jasmonato de metilo) | 51 |
| Figura 15. Actividad de peroxidasas en tallos de aguacate (ácido salicílico) | 53 |
| Figura 16. Actividad de peroxidasas en tallos de aguacate (jasmonato de metilo). | 53 |
| Figura 17. Actividad de B -1,3 glucanasas en hojas de aguacate (ácido salicílico). | 55 |
| Figura 18. Actividad de B -1,3 glucanasas en hojas de aguacate (jasmonato de metilo) | 55 |
| Figura 19. Actividad de B -1,3 glucanasas en tallos de aguacate (ácido salicílico)..... | 56 |
| Figura 20. Actividad de B -1,3 glucanasas en tallos de aguacate (jasmonato de metilo) | 57 |
| Figura 21. Acumulación de compuestos fenólicos totales en hojas de aguacate (ácido salicílico) | 58 |
| Figura 22. Acumulación de compuestos fenólicos totales en hojas de aguacate (jasmonato de metilo). | 59 |
| Figura 23. Acumulación de compuestos fenólicos totales en tallos de aguacate (ácido salicílico) | 60 |
| Figura 24. Acumulación de compuestos fenólicos totales en tallos de aguacate (jasmonato de metilo) | 61 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Protocolos de embriogénesis somática indirecta en cacao. | 12 |
| Tabla 2. Distribución de tratamientos para prueba de barrenado | 24 |
| Tabla 3. Distribución de tratamientos en <i>Theobroma cacao</i> L. | 28 |
| Tabla 4. Distribución de tratamientos en <i>Persea americana</i> | 28 |
| Tabla 5. Actividad de peroxidasas en hojas y tallos de cacao..... | 42 |
| Tabla 6. Actividad de B- 1,3 glucanasas en hojas y tallos de cacao..... | 44 |
| Tabla 7. Cuantificación de compuestos fenólicos totales a 650 nm en hojas y tallos de cacao. | 46 |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 8 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| 3. MARCO TEÓRICO..... | 10 |
| 3.1. Consideraciones sobre <i>Fusarium euwallaceae</i> | 10 |
| 3.2. Descripción, importancia y cultivo <i>in vitro</i> de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)..... | 11 |
| 3.3. Importancia y cultivo del aguacate (<i>Persea americana</i>) | 14 |
| 3.4. Mecanismos de defensa en las plantas..... | 15 |
| 3.4.1. Proteínas asociadas a patogénesis (PR) | 15 |
| 3.4.2. Fitoalexinas | 16 |
| 3.5. Elicitores | 16 |
| 3.5.1. Ácido salicílico | 16 |
| 3.5.2. Jasmonato de metilo..... | 16 |
| 3.5.3. Ejemplos de utilización de elicitores | 17 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 18 |
| 5. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 6. HIPÓTESIS..... | 20 |
| 7. OBJETIVOS..... | 21 |
| 7.1. Objetivo general | 21 |
| 7.2. Objetivos específicos | 21 |
| 8. METODOLOGÍA..... | 22 |
| 8.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Theobroma cacao</i> L..... | 22 |
| 8.1.1. Proliferación de yemas axilares de cacao | 22 |
| 8.1.2. Inducción de embriogénesis somática en cacao | 22 |
| 8.2. Establecimiento de la metodología para evaluar inducción de defensa en <i>Theobroma cacao</i> L. | 23 |
| 8.2.1. Prueba de barrenado | 24 |
| 8.2.2. Preparación de inóculo | 26 |
| 8.3. Experimento con elicitores en <i>Theobroma cacao</i> L. y <i>Persea americana</i> | 26 |
| 8.3.1. Evaluación de la inducción de respuestas defensivas en <i>Theobroma cacao</i> L. y <i>Persea americana</i> | 27 |

| | | |
|----------|--|----|
| 8.3.2. | Evaluación de daño en el tallo y colonización de <i>Fusarium</i> sp. en tejidos..... | 29 |
| 8.3.3. | Determinación de actividad de peroxidasas | 29 |
| 8.3.4. | Determinación de actividad de β - 1,3 glucanasas..... | 29 |
| 8.3.5. | Acumulación de fitoalexinas por medio de compuestos fenólicos totales | 30 |
| 8.3.6. | Análisis estadístico | 30 |
| 9. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 31 |
| 9.1. | Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Theobroma cacao</i> L..... | 31 |
| 9.1.1. | Proliferación de yemas axilares..... | 31 |
| 9.1.2. | Embriogénesis somática..... | 32 |
| 9.2. | Pruebas de barrenado en <i>Theobroma cacao</i> L. | 33 |
| 9.3. | Pruebas con elicitores en <i>Theobroma cacao</i> L..... | 36 |
| 9.3.1. | Evaluación de daño en el tallo y colonización de <i>Fusarium</i> sp. | 37 |
| 9.3.2. | Respuesta de defensa bioquímica en plantas de cacao | 40 |
| 9.3.2.1. | Actividad de peroxidasas | 40 |
| 9.3.2.2. | Actividad de β -1,3 glucanasas..... | 43 |
| 9.3.2.3. | Acumulación de compuestos fenólicos totales..... | 45 |
| 9.4. | Pruebas con elicitores en <i>Persea americana</i> | 47 |
| 9.4.1. | Evaluación de daño en el tallo y colonización de <i>Fusarium</i> sp. | 47 |
| 9.4.2. | Respuesta de defensa bioquímica en plantas de aguacate..... | 50 |
| 9.4.2.1. | Actividad de peroxidasas | 50 |
| 9.4.2.2. | Actividad de B – 1,3 glucanasas..... | 54 |
| 9.4.2.3. | Acumulación de compuestos fenólicos totales..... | 57 |
| 10. | CONCLUSIONES | 62 |
| 11. | BIBLIOGRAFÍA..... | 63 |
| 12. | APORTES DEL PROYECTO..... | 69 |

1. RESUMEN

Fusarium euwallaceae es un hongo fitopatógono asociado con escarabajos ambrosiales del género *Euwallacea*. En el año 2012 surgieron los primeros reportes de daños causados por este complejo en cultivos de aguacate en Estados Unidos e Israel, aunque también representa un riesgo hacia otras especies de importancia económica, ornamental y forestal. Desde el año 2015 fue reportada la presencia de *Euwallacea* sp. en territorio nacional, lo que hace necesario desarrollar medidas para evitar su propagación, así como para su control. En el presente proyecto se utilizaron como modelo plantas de aguacate y cacao, representando especies de importancia económica que podrían verse afectadas.

Los inductores de defensa vegetal, también conocidos como elicitores, son sustancias que desencadenan respuestas de defensa en las plantas, lo que a largo plazo puede derivar en una mayor resistencia. Se aplicaron dos elicitores: ácido salicílico y jasmonato de metilo, y posteriormente las plantas fueron inoculadas con *Fusarium* sp. aislado de un complejo ambrosial. Fue evaluada la respuesta de defensa en las plantas a través del daño presente en el tallo, así como la actividad enzimática (peroxidasas y β 1,3-glucanasas) y acumulación de compuestos fenólicos totales.

Si bien el daño presente en el tallo estuvo principalmente asociado al daño mecánico derivado del proceso de barrenado, se pudo observar un efecto diferencial en la actividad enzimática y acumulación de compuestos fenólicos totales asociada a la aplicación de los elicitores y al inóculo de *Fusarium* sp., tanto a nivel local como sistémico. Esto sugiere que la utilización de estos compuestos podría representar una alternativa viable para la inducción de una respuesta de defensa en las plantas, mejorando así la resistencia ante potenciales enfermedades.

2. INTRODUCCIÓN

La dispersión del hongo fitopatógeno *Fusarium euwallaceae* se encuentra asociada con escarabajos ambrosiales del género *Euwallacea* (Curculionidae: Scolytinae), también conocidos como “escarabajos barrenadores polífagos” (EBP). Estos son insectos de origen asiático, por lo tanto considerados invasores. Las hembras poseen una estructura llamada micangia mandibular, a través de la cual puede transportarse *Fusarium* a sus galerías, colonizándolas y convirtiéndose en fuente de alimento para las larvas en desarrollo, así como los escarabajos adultos (Eskalen et al., 2013; Freeman et al., 2013)

La mayoría de las veces, los escarabajos ambrosiales atacan árboles moribundos o muertos, por lo que participan en procesos de descomposición; pero en el caso de algunos complejos ambrosiales como *Euwallacea nr. fornicatus* – *Fusarium euwallaceae*, afecta a árboles vivos. El daño al xilema que causa *Fusarium euwallaceae* está asociado con síntomas como presencia de exudados, marchitez e incluso puede derivar en la muerte del árbol hospedero (Freeman et al., 2013).

En el 2012 se reportó por primera vez la asociación *Euwallacea-Fusarium* causando la llamada “muerte regresiva de *Fusarium*” en árboles de aguacate en California (Eskalen et al., 2013). De igual forma supone una amenaza seria para la industria del aguacate en Israel (Mendel et al., 2012).

Debido a que *Fusarium euwallaceae* puede afectar a diversas plantas de interés económico y ornamental, entre las que destaca el aguacate, son requeridas estrategias para combatir este patógeno o mejorar la resistencia de las plantas. Con el fin de evaluar el modelo de inducción de resistencia se utilizarán plantas de aguacate (*Persea americana*), especie de la cual ya se tienen reportes de esta enfermedad, y cacao (*Theobroma cacao* L.), el cual podría verse potencialmente afectado por este complejo ambrosial.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Consideraciones sobre *Fusarium euwallaceae*

El conocimiento que se tiene sobre *Fusarium euwallaceae* es reciente y por lo tanto escaso, debido a que esta especie de hongo fitopatógeno fue descrita en el año 2013 a partir de las observaciones realizadas previamente en Israel y California, donde causó daños importantes a cultivos de aguacate (Freeman et al., 2013)

A partir de un estudio en dos jardines botánicos del condado de Los Ángeles, se observó que 207 especies de árboles, pertenecientes a 58 familias, mostraron síntomas consistentes con haber sido afectadas por *Euwallacea* sp. De éstas, un 54% tuvo presencia de *Fusarium* al menos en el sitio de entrada del coleóptero. Entre las especies afectadas se incluyen 11 nativas de California, 13 importantes en un sentido agronómico y diversos árboles urbanos. 19 especies en total fueron identificadas como hospederos reproductivos. Los resultados sugieren que el complejo ambrosial puede establecerse en una gran diversidad de plantas (Eskalen et al., 2013).

Recientemente se reportó que el escarabajo barrenador Kuroshio (KSHB, por sus siglas en inglés) (*Euwallacea* sp. nr. *fornicatus*), similar al escarabajo barrenador polífago, está asociado con los hongos *Fusarium kuroshium* y *Graphium kuroshium*, los cuales también resultan ser patogénicos al realizar pruebas en aguacate. Esto resalta que existen dos potenciales amenazas para las especies leñosas en California (Na et al., 2018).

En el año 2015 se localizó al primer ejemplar de *Euwallacea* nr. *fornicatus* en México, dentro del territorio de Tijuana, Baja California (García-Avila et al., 2016), de forma cercana a la frontera. Según la SENASICA (2019), en el territorio nacional *Euwallacea* sp. se considera una plaga transitoria: accionable y bajo vigilancia. Su estatus es presente, pero restringida sólo a algunas áreas (zona urbana de Tijuana, Baja California). Dentro del país también se tiene implementado el “Plan de acción para la vigilancia y aplicación de medidas de control contra complejos ambrosiales reglamentados en México: *Xyleborus glabratus* – *Raffaelea lauricola* y *Euwallacea* sp. – *Fusarium euwallaceae*” por parte de la Dirección General de Sanidad Vegetal y el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

Muchos estudios actuales sobre *Fusarium euwallaceae* se limitan a difundir información referente a la distribución de este fitopatógeno, así como mencionar las especies que se encuentra afectando. La SENASICA (2019) reporta que hasta la fecha no hay estudios del impacto económico en los cultivos agrícolas donde se ha reportado la plaga.

3.2. Descripción, importancia y cultivo *in vitro* de cacao (*Theobroma cacao* L.)

El cacao (*Theobroma cacao*) es perteneciente a la familia de las malváceas. El género *Theobroma* se caracteriza por englobar árboles ramificados, los cuales poseen hojas simples y frutos indehiscentes carnosos conocidos como “mazorcas”. Su distribución natural comprende desde la cuenca del Amazonas hacia la región meridional de México, en bosques tropicales lluviosos (Dostert et al., 2012). Dentro de México se produce principalmente en Tabasco y Chiapas (Avendaño-Arrazate et al., 2011) y es una especie con gran importancia económica y cultural, siendo utilizada principalmente para la producción de chocolate.

Existen dos enfermedades de cacao que representan las pérdidas más grandes: la enfermedad de la mancha negra, causada por *Phytophthora* spp., y la “escoba de bruja” causada por *Moniliophthora perniciosa* (Marelli et al., 2019).

Aunque actualmente no existen reportes del complejo *Euwallacea* sp. - *Fusarium euwallaceae* afectando a este cultivo, se tiene constancia de la presencia de escarabajos ambrosiales, principalmente de los géneros *Xyleborus* e *Hypothenemus* asociados al agroecosistema de cacao (Pérez-De La Cruz et al., 2009).

En el cacao se ha reportado la enfermedad conocida como “mal del machete”, la cual guarda cierta similitud con la marchitez por *Fusarium*. Esta enfermedad es causada por el hongo fitopatógeno *Ceratocystis cacaofunesta*, el cual se encuentra asociado comúnmente con coleópteros barrenadores del género *Xyleborus* (Infocacao, 2016).

La diseminación de las esporas ocurre por medio del viento o por el movimiento de los escarabajos entre los árboles (Phillips-Mora & Cerda-Bustillos, 2009). La infección ocurre a través de heridas preexistentes, por ejemplo causadas por herramientas como machetes –de donde deriva el nombre por el que se conoce a la enfermedad-, así como causadas por insectos (Phillips-Mora & Cerda-Bustillos, 2009).

Referente al cultivo *in vitro*, el cacao se considera una especie recalcitrante, haciendo necesario adaptar la metodología según el genotipo a utilizar (Quiñones Gálvez et al., 2013). Si bien se han realizado esfuerzos como la proliferación de yemas axilares (Flynn et al., 1990), la embriogénesis somática ha presentado los resultados más relevantes como método de propagación clonal (Alejandro-Lázaro et al., 2015).

La proliferación de yemas axilares consiste en utilizar brotes apicales o segmentos nodales con yemas axilares para generar múltiples brotes. Es decir, consiste en el desarrollo de nuevos brotes a partir de meristemos preexistentes (Ngezahayo & Liu, 2014). En cacao son escasos los reportes de la utilización de esta técnica, pero destaca el de Flynn et al (1990) donde se menciona que se obtuvo la expansión y elongación de los brotes, así como el desarrollo de hojas tan pronto como 13 días después del establecimiento *in vitro*. En el estudio se destacó que el cultivo a largo plazo fue más favorable utilizando el medio con sales WPM (Lloyd & McCown, 1980), en comparación al medio con sales MS (Murashige & Skoog, 1962) al 50%. También se observó que los ápices fueron más susceptibles a la oxidación y presentaron menor tasa de respuesta, a diferencia de los explantes nodales.

La embriogénesis somática se define como el proceso a través del cual las células somáticas llegan a formar embriones, a través de un proceso que se asemeja a la embriogénesis cigótica (Thorpe & Stasolla, 2001). Si bien los protocolos en cacao son diversos, los explantes más importantes para esta técnica son los pétalos y estaminoides (Alejandro-Lázaro et al., 2015). Generalmente se utiliza una técnica indirecta (Tabla 1) la cual implica inducir en primer lugar la formación de callo: se colocan los explantes en un medio de cultivo con sales DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) adicionado con los reguladores de crecimiento thidiazuron (TDZ), con actividad de citoquinina, y ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D), una auxina. Una vez formados los callos, se utiliza un medio sin reguladores que permita el desarrollo de los embriones (Alejandro-Lázaro et al., 2015; Garcia et al., 2018; Gultinan & Maximova, 2010; Velásquez-Salazar et al., 2006).

Tabla 1. Protocolos de embriogénesis somática indirecta en cacao.

| Autores | Año | Medios de cultivo | Condiciones |
|------------|------|--|-------------------|
| Velásquez- | 2006 | 1. Callo. Sales DKW, 22.7 nM TDZ, 80 g/l | No se especifican |

| | | | |
|---|------|--|---|
| Salazar et al | | <p>de sacarosa, 4 mg 2-4 D.</p> <p>2. Callo embriogénico. Sales básicas Lloyd y McCrown, 2.5 mg/l de cinetina, 50 ml/l de agua de coco, 80 g/l de sacarosa.</p> <p>3. Masas pro-embriogénicas: Medio DKW rico en aminoácidos (0.044 mg/l arginina, 0.019 mg/l glicina, 0.033 mg/l leucina, 0.046 mg/l lisina, 0.051 mg/l triptófano), 0.3 g de KNO₃.</p> <p>4. Embriones. Medio con sales básicas DKW.</p> | <p>tiempos de resiembra, se mantuvieron en condiciones de oscuridad, temperatura 26-29°C.</p> |
| Guiltinan y Maximova (The Pennsylvania State University) | 2010 | <p>1. PCG. Sales y vitaminas DKW, glucosa 20 g/l, glutamina 250 mg/l, myo-inositol 100 mg/l, 2 mg/l 2-4 D, 5 µg/l TDZ, pH 5.8. 2 g/l phytigel.</p> <p>2. SCG. Sales McCrown's 2.3 g/l, vitaminas B5 (1000x stock) 1 ml/l, glucosa 20 g/l, 2-4 D 2 mg/l, 6-BA 50 µg/l, pH 5.7. 2.2 g/l phytigel.</p> <p>3. ED. Sales y vitaminas DKW, sacarosa 30 g/l, glucosa 1 g/l, pH 5.7. 2 g/l phytigel.</p> <p>4. PEC: Sales y vitaminas DKW, KNO₃ 0.3 g/l, aminoácidos (1000x stock) 1 ml/l, sacarosa 10 g/l, glucosa 20 g/l, pH 5.8. 1.75 g/l phytigel</p> | <p>Dos semanas entre cada resiembra, condiciones de oscuridad.</p> <p>En medio ED mantener por 6-8 semanas.</p> <p>Al tener embriones maduros, pasar a medio PEC.</p> <p>Temperatura 25-30°C.</p> |
| Alejandro-Lázaro et al | 2015 | <p>1. Callo primario y secundario. Sales DKW, glucosa 20 g/l, glutamina 250 mg/l, myo inositol 100 mg/l, 2-4 D 2 mg/l, TDZ 5 µg/l, pH 5.8. Gelrite 3 g/l.</p> <p>2. Callo embriogénico. Sales y vitaminas DKW, glucosa 40 g/l, glutamina 250 mg/l, KNO₃ 3 mg/l, aminoácidos 1 ml/l, pH 5.8. Gelrite 3 g/l.</p> <p>3. Embriones somáticos globulares: Sales y vitaminas DKW con vitaminas de Gamborg, KNO₃ 3 mg/l, aminoácidos 1</p> | <p>14 días entre resiembras, condiciones de oscuridad, temperatura 26±1° C.</p> |

| | | | |
|---------------------|------|---|---|
| | | ml/l, glucosa 20 g/l, pH 5.8, Gelrite 3 g/l. 4. Embriones somáticos tipo torpedo: Sales MS sin vitaminas, vitaminas de Gamborg, glucosa 20 g/l, pH 5.8. Gelrite 3 g/l. | |
| Garcia et al | 2016 | <ol style="list-style-type: none"> 1. PCG. Sales DKW y vitaminas, 2 mg 2-4 D, 5 µg/l TDZ, 250 mg/l glutamina, 200 mg/l myo-inositol, 20 g/l glucosa, pH 5.8. 2 g/l phytigel. 2. SCG. Sales WPM, solución de vitaminas Gamborg 1X, 2 mg/l 2-4 D, 50 µg/l BAP, 20 g/l glucosa, pH 5.8. 2 g/l phytigel. 3. ED4: Sales y vitaminas DKW, 40 g/l glucosa, pH 5.8. 2 g/l phytigel. 4. ED3: Sales y vitaminas DKW, 30 g/l glucosa, pH 5.8. 2 g/l phytigel | 2 semanas entre cada medio, en medio ED3 8 semanas. Temperatura 27 ± 2 °C. |

De igual forma, existen algunos protocolos describiendo una técnica directa (Garcia et al., 2018), es decir, que no involucra la formación de callo, utilizando medio de cultivo con sales MS (Murashige & Skoog, 1962). Asimismo, ha sido descrita la embriogénesis somática secundaria, la cual utiliza como explante cotiledones procedentes de embriones somáticos primarios (Alejandro-Lázaro et al., 2015; Garcia et al., 2018).

3.3. Importancia y cultivo del aguacate (*Persea americana*)

El aguacate (*Persea americana*), perteneciente a la familia de las lauráceas, tiene gran importancia económica y cultural a nivel mundial debido a su fruto. Actualmente existe evidencia de que esta especie se originó en el área que comprende desde el centro de México hacia Centroamérica (Marais, 2004). A nivel mundial, México lidera tanto su producción como exportación, destacando el estado de Michoacán, donde se concentra un 84.9% de la producción del país (SENASICA, 2017).

Los cultivos de aguacate pueden verse afectados por distintos patógenos, entre los que resalta por su importancia el oomiceto *Pytophthora cinnamomi*, causante de la “pudrición de la raíz

de *Pytophthora*”. Es considerado como el fitopatógeno de aguacate que tiene una distribución más amplia (Marais, 2004).

Se tienen antecedentes de importantes daños causados por *Fusarium euwallaceae* en este cultivo en países como Estados Unidos (Eskalen et al., 2013), Israel (Mendel et al., 2012, 2017), así como su reciente detección en Sudáfrica (van den Berg et al., 2019). Se considera que la variedad Hass es la más susceptible al ataque del coleóptero *Euwallacea nr. fornicatus*, según lo observado en Israel (Mendel et al., 2017).

3.4. Mecanismos de defensa en las plantas

Comúnmente se hace referencia a dos tipos de defensas en las plantas: constitutivas e inducibles. Las respuestas de defensa constitutivas, también conocidas como continuas, previenen la infección, además de proporcionar rigidez a la planta (Boots & Best, 2018; Freeman & Beattie, 2008). Por otro lado, las defensas inducidas son activadas por la detección del patógeno, es decir, ocurren tras la infección (Anil et al., 2013; Boots & Best, 2018; Freeman & Beattie, 2008).

Tras la activación de respuestas locales, entre las que se incluyen la “explosión oxidativa”, cambios en la composición de la pared celular, producción de compuestos antimicrobianos o proteínas asociadas a patogénesis (proteínas PR); la señal puede extenderse y derivar en cambios en la expresión genética de secciones no afectadas de la planta, lo que se conoce como “respuesta sistémica” (Heil & Bostock, 2002).

3.4.1. Proteínas asociadas a patogénesis (PR)

La producción de proteínas PR es inducida bajo condiciones patológicas o relacionadas, siendo consideradas como un componente clave de la defensa de las plantas bajo condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico (Jain & Khurana, 2018). Su función es diversa: se tienen algunas con actividad antifúngica como glucanasas, y quitinasas, así como enzimas oxidativas como peroxidasas o polifenol oxidasas, (Choudhary et al., 2007), sin embargo, también se puede presentar actividad antibacteriana, antiviral, insecticida o nematocida (Jain & Khurana, 2018).

3.4.2. Fitoalexinas

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producidos como respuesta a estrés en las plantas, lo que lleva a que se acumulen de forma temporal (Arruda et al., 2016; Jeandet, 2015).

3.5. Elicitores

El término “elicitor” se suele referir a macromoléculas que tienen la capacidad de inducir respuestas bioquímicas o estructurales asociadas con la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas (Benhamou, 1996). Otra definición de “elicitor” hace referencia a compuestos que pueden desencadenar respuestas similares a las inducidas por la infección del patógeno en las plantas (Thakur & Sohal, 2013).

Se menciona que la inducción de respuestas defensivas eventualmente puede derivar en una resistencia más alta (Thakur & Sohal, 2013). Esto se conoce como “priming”, donde a partir de un estímulo inicial se producen cambios en la planta, permitiendo que la respuesta defensiva sea más rápida o fuerte posteriormente, y como consecuencia es mejorada la resistencia o tolerancia al estrés (Mauch-Mani et al., 2017).

3.5.1. Ácido salicílico

El papel más importante del ácido salicílico se asocia a la señalización en la respuesta inmune de las plantas. Durante la infección de un patógeno, generalmente se produce una acumulación de este compuesto, derivando en un aumento de la expresión de genes PR y el desarrollo de resistencia sistémica adquirida (RSA) (An & Mou, 2011).

3.5.2. Jasmonato de metilo

En general se le llama “jasmonato” a cualquier intermediario o derivado biológicamente activo de la biosíntesis de ácido jasmónico (Turner et al., 2002). El jasmonato de metilo (MeJa) es un compuesto volátil identificado inicialmente en flores de *Jasminum grandiflorum*, teniendo un papel importante en las interacciones entre plantas y herbívoros, así como con otras plantas. Asimismo, está asociado con la inducción de respuestas defensivas ante varios tipos de estrés ambiental (Cheong & Choi, 2003).

3.5.3. Ejemplos de utilización de elicitores

Se han realizado experimentos en *Theobroma cacao* L. utilizando el compuesto acibenzolar-S-metil (ASM), un análogo de ácido salicílico, para mejorar la resistencia ante los patógenos *Crinipellis pernicioso* y *Verticillium dahliae*, y se observó una disminución en la incidencia de las enfermedades causadas por éstos. El mecanismo de acción estuvo asociado con la producción de enzimas de defensa como peroxidasas o polifenol oxidasas, aunque esto también depende del genotipo del cacao utilizado. Se observaron resultados más relevantes al aumentar el tiempo entre la aplicación del elicitor y el inóculo de los fitopatógenos (Resende et al., 2002).

En aguacate se trataron raíces con ácido salicílico, con el objetivo de evaluar la inducción de respuesta de defensa ante *Phytophthora cinnamomi*: la aplicación resultó en un aumento en los niveles endógenos de ácido salicílico, y a su vez la producción de un compuesto metanólico con la capacidad de inhibir el crecimiento radial de *Phytophthora* (Rangel-Sánchez et al., 2014).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Fusarium euwallaceae es un hongo fitopatógono recientemente detectado y descrito, el cual causa daños a una gran diversidad de plantas, principalmente a cultivos de aguacate. Al haber sido detectado de forma reciente, no se tienen definidas estrategias para su control, aunque se han realizado esfuerzos en cuestión de potenciales métodos químicos y biológicos.

En el año 2015 se detectó por primera vez la presencia de *Euwallacea fornicatus*, el escarabajo ambrosial asociado a *Fusarium euwallaceae*, en México; por lo que resulta crucial el poner a prueba estrategias para su prevención y control.

Se conoce que el aguacate puede ser severamente afectado por este complejo ambrosial; mientras que en el caso del cacao no se han reportado daños, aunque se tiene constancia de que esta especie puede ser afectada por escarabajos ambrosiales, principalmente pertenecientes a los géneros *Hypothenemus* y *Xyleborus*, por lo que podría encontrarse en riesgo ante *Fusarium euwallaceae*.

5. JUSTIFICACIÓN

Los elicitores están asociados a la inducción de respuestas defensivas en las plantas, y esto puede derivar en una resistencia más alta a enfermedades. Anteriormente se han utilizado elicitores para mejorar la resistencia contra algunos fitopatógenos de cacao y aguacate, donde se observó un aumento en la actividad de enzimas asociadas a la defensa y, por lo tanto, disminución de la incidencia de la enfermedad.

Debido a que *Fusarium euwallaceae* y otros fitopatógenos similares deben manejarse de forma cuarentenada para no difuminarlos en espacios donde no se encuentran presentes, resulta conveniente desarrollar metodologías para evaluar opciones para su control o mejorar la resistencia de las plantas.

6. HIPÓTESIS

Los elicitores desencadenarán la producción de enzimas de defensa y acumulación de compuestos fenólicos totales en *Theobroma cacao* y *Persea americana* ante inóculo de *Fusarium* sp, aislado de un complejo ambrosial.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar la inducción de respuestas defensivas ante *Fusarium* sp. utilizando *Theobroma cacao* L. y *Persea americana* como modelo.

7.2. Objetivos específicos

1. Propagar plantas *in vitro* de cacao.
2. Establecer una metodología para la evaluación de la inducción de defensa en plantas de cacao en condiciones de invernadero.
3. Evaluar la inducción en la respuesta de defensa de plantas de cacao en condiciones de invernadero, tratadas con ácido salicílico y jasmonato de metilo.
4. Evaluar la inducción en la respuesta de defensa de plantas de aguacate en condiciones de invernadero, tratadas con dos concentraciones de ácido salicílico y jasmonato de metilo.

8. METODOLOGÍA

8.1. Cultivo *in vitro* de *Theobroma cacao* L.

8.1.1. Proliferación de yemas axilares de cacao

Se utilizaron brotes de *Theobroma cacao* L., variedad criollo, en condiciones de invernadero. Se aplicó fungicida de 24 a 48 horas antes del establecimiento *in vitro*.

Para el establecimiento *in vitro*, los brotes de *Theobroma cacao* L. fueron colectados y colocados en agua destilada. Se enjuagaron con hipoclorito de sodio al 3% por 10 minutos, seguido por tres lavados de agua destilada estéril, dentro de una campana de flujo laminar. Una vez desinfectados, fueron transferidos a medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) al 50%, 20 g/l de sacarosa, 0.1 g/l de ácido cítrico y ascórbico, 1 ml/l de Plant Preservative Mixture (PPM©), cuyo pH fue ajustado a 5.8 y posteriormente se agregaron 3 g/l de phytigel. Se vació en frascos de vidrio, y estos fueron esterilizados a 121°C, 1.5 lb de presión, por 15 minutos en autoclave. Los explantes fueron incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz-oscuridad y una intensidad luminosa de aproximadamente 2000 luxes. Se realizaron resiembras de forma mensual.

8.1.2. Inducción de embriogénesis somática en cacao

Para la inducción de embriogénesis somática en cacao, se utilizaron botones florales de plantas en condiciones de invernadero, los cuales fueron colectados y colocados en agua destilada. Se probaron dos métodos de desinfección:

1. Se realizó un lavado con etanol al 70%, y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. A continuación, se realizó otro lavado con Tween®20 e hipoclorito de sodio al 2% durante dos minutos, seguido por tres lavados con agua destilada estéril.
2. Se enjuagó con hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos, y a continuación se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

Con el fin de reducir la oxidación de los explantes, se realizó un enjuague con una solución de ácido cítrico y ascórbico (10 mg/100 ml) previo al establecimiento *in vitro*.

Referente a la disección de los botones florales, se utilizaron los siguientes métodos:

1. Se separaron los sépalos, colocando *in vitro* la flor completa.

2. Se separaron sépalos, pétalos y estaminoides.

Una vez desinfectados los explantes, fueron colocados en un medio con sales y vitaminas DKW (Driver & Kuniyuki, 1984), 20 g/l de glucosa, 0.1 g/l de ácido cítrico y ascórbico, 5 µg/l de Thidiazuron (TDZ) y 4 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4 D) como fitorreguladores. El pH fue ajustado a 5.8 y se agregaron 2 g/l de phytigel. El medio fue esterilizado a 121°C, 1.5 lb de presión, durante 15 minutos en autoclave, y posteriormente fue vaciado en cajas Petri dentro de campana de flujo laminar.

Se mantuvieron las cajas Petri en el incubador a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, en condiciones de oscuridad, durante un periodo de dos semanas para la formación de callo (Figura 1). Posteriormente se sembraron en medio DKW sin reguladores, realizando cambio de medio cada dos semanas.

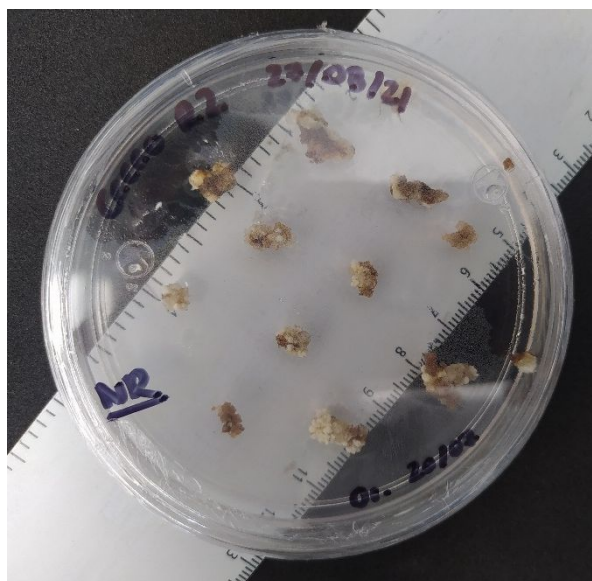


Figura 1. Formación de callo a partir de pétalos y estaminoides en *Theobroma cacao* L.

8.2. Establecimiento de la metodología para evaluar inducción de defensa en *Theobroma cacao* L.

El experimento se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campus Experimental Rosario Izapa, ubicado en Tuxtla Chico, Chiapas, con la asesoría del Dr. Carlos Hugo Avendaño Arrazate. Se realizó un experimento con el fin de evaluar y ajustar la técnica de barrenado en *Theobroma cacao* L., utilizada previamente en otras especies.

Se utilizaron plantas injertadas de *Theobroma cacao* L. en condiciones de invernadero. Fueron seleccionadas las plantas con aproximadamente 1 cm de grosor a una altura de 10 cm de la base.

8.2.1. Prueba de barrenado

Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con 7 tratamientos (Tabla 2), y 3 plantas por bloque/repetición. Se consideraron como variables dos tipos de barrenado (50 y 80% del grosor del tallo) y dos concentraciones de esporas (1×10^4 y 1×10^6 esporas/ml) de *Fusarium* sp.

Tabla 2. Distribución de tratamientos para prueba de barrenado

| Tratamiento | Descripción |
|-------------|---|
| 1 | Control |
| 2 | Perforación 50%, concentración 1×10^4 esporas/ml |
| 3 | Perforación 50%, concentración 1×10^6 esporas/ml |
| 4 | Perforación 80%, concentración 1×10^4 esporas/ml |
| 5 | Perforación 50%, concentración 1×10^6 esporas/ml |
| 6 | Perforación 50%, sin inóculo |
| 7 | Perforación 80%, sin inóculo |

Se realizó una perforación en el tallo aproximadamente a los 10 cm de altura de la base utilizando un taladro con una broca de aproximadamente 1 mm de diámetro, según el diseño experimental, y se inocularon 200 μ l de la suspensión de esporas con una micropipeta, cubriendo posteriormente con plástico adherente (Figura 2) para evitar la contaminación.



Figura 2. Establecimiento de prueba de barrenado en *Theobroma cacao* L. A: Plantas de cacao utilizadas en el experimento. B: Aplicación de inóculo en plantas de cacao. C: Sellado del inóculo.

Cinco días tras el inicio del experimento se realizó un muestreo al azar de una planta por tratamiento/bloque, realizando un corte longitudinal del tallo para observar el daño. Sesenta

días tras el inicio del experimento se realizó el muestreo de las plantas restantes, siguiendo el mismo procedimiento.

8.2.2. Preparación de inóculo

El cultivo o cepa de *Fusarium* sp. utilizado en las pruebas de barrenado fue proporcionado directamente por el Instituto de Ecología (INECOL); este fue aislado de acuerdo con el protocolo de la Dra. Diana Sánchez Rangel (com. pers.): se obtuvo a partir de los escarabajos ambrosiales *Xyleborus ferrugineus*, *Xyleborus bispinatus* y *Xylosandrus morigerus* proporcionados por el Laboratorio de Entomología Molecular a cargo del Dr. Luis Arturo Ibarra Juárez. Éstos fueron esterilizados superficialmente con etanol al 96% por 1 minuto y posteriormente se realizaron de tres a seis enjuagues con agua destilada estéril y fueron segmentados en cabeza y abdomen, colocándose en tubos de 1.5 mL de forma individual. Se agregaron 50-100 µl de solución salina al 0.9% y se trituraron con ayuda de un micropistilo de plástico estéril. Se plaquearon 25 µl de esta solución por triplicado en medio PDA (PDA, 39 g/L Sigma-Aldrich) y fueron incubados a una temperatura de 28°C por 3 o 4 días o hasta la aparición de colonias, las cuales fueron seleccionadas según sus diferencias en morfología y se generaron cultivos monospóricos.

La preparación del inóculo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Asistencia en Diseño y Tecnología del Estado de Jalisco (CIATEJ) Subsede Zapopan, en la Unidad de Biotecnología Vegetal. Se realizó resiembra del cultivo original proporcionado por el INECOL en medio PDA al menos 30 días antes de la aplicación del inóculo. A partir de éste, se obtuvo una suspensión de esporas, las cuales se cuantificaron en cámara de Neubauer y fueron ajustadas a concentraciones de 1×10^4 y 1×10^6 esporas/ml con agua destilada estéril.

8.3. Experimento con elicitores en *Theobroma cacao* L. y *Persea americana*

De acuerdo con los resultados obtenidos del experimento realizado en el INIFAP en Chiapas, para el experimento con elicitores, se utilizaron plantas de *Theobroma cacao* L. variedad criollo en condiciones de invernadero, en las instalaciones del CIATEJ Subsede Zapopan. Fueron seleccionadas al azar plantas con al menos 1 cm de grosor a una altura de 10 cm de la base, con follaje y que no presentaran síntomas de enfermedad. El sustrato estaba compuesto por perlita y peat moss en una proporción de 50:50. Como preparación para el experimento, se

realizó riego dos veces por semana y se aplicó Blaukorn ® y Osmocote ® como fertilizante cada 15 días.

Por otro lado, para la evaluación del efecto de los elicitores en aguacate variedad Hass, se utilizaron plantas ubicadas en los invernaderos del CIATEJ Subsede Zapopan. Se siguió el mismo protocolo que en las plantas de cacao.

Para la preparación del inóculo, se utilizó el cultivo de *Fusarium sp.* descrito previamente. A partir del mismo se realizó una suspensión de esporas, las cuales se cuantificaron en cámara de Neubauer y fueron ajustadas a una concentración de 1×10^6 esporas/ml con agua destilada estéril.

Con respecto a los elicitores utilizados, se prepararon soluciones stock de ácido salicílico y jasmonato de metilo a concentraciones de 20 mM y 10 mM respectivamente. El ácido salicílico fue diluido en etanol previo a completar el volumen final con agua destilada, mientras que el jasmonato de metilo fue diluido directamente en agua destilada.

A partir de las soluciones stock, las cuales fue esterilizadas mediante filtración, se ajustó con agua destilada la concentración de ambos elicitores a 50 y 500 μ M para su aplicación.

8.3.1. Evaluación de la inducción de respuestas defensivas en *Theobroma cacao* L. y *Persea americana*

Con el fin de evaluar la inducción de respuestas defensivas, se aplicaron de forma foliar con un atomizador, aproximadamente 10 ml de elicitores por planta, según el diseño experimental. Debido a la limitante de las plantas disponibles, en el experimento de *Theobroma cacao* L. se contempló solamente una concentración de cada elicitores, mientras que en *Persea americana* se consideraron dos.

Transcurridos 21 días de la aplicación de los elicitores, se realizó una perforación en el tallo utilizando un taladro con una broca de aproximadamente 1 mm de diámetro, considerando el 80% del grosor -a 20 cm de altura desde la base en *Theobroma cacao* L., 10 en el caso de *Persea americana*-, y se inocularon las plantas con 200 μ l de la suspensión de esporas de *Fusarium sp.*

En *Theobroma cacao* L. se establecieron 6 tratamientos (Tabla 3), con tres plantas por cada periodo de tiempo a evaluar, considerando una planta como una repetición.

Tabla 3. Distribución de tratamientos en *Theobroma cacao* L.

| Tratamiento | Descripción |
|--------------------|--|
| C | Control |
| Fu | Plantas inoculadas con <i>Fusarium</i> sp. |
| SA | Plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M |
| SA + Fu | Plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inóculo de <i>Fusarium</i> sp. |
| MeJa | Plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μ M |
| MeJa + Fu | Plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μ M e inóculo de <i>Fusarium</i> sp. |

En el caso de *Persea americana* se establecieron 10 tratamientos (Tabla 4) con cuatro plantas por cada periodo de tiempo a evaluar, considerando una planta como una repetición.

Tabla 4. Distribución de tratamientos en *Persea americana*

| Tratamiento | Descripción |
|---------------------|---|
| C | Control |
| Fu | Plantas inoculadas con <i>Fusarium</i> sp. |
| SA(1) | Plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M |
| SA(2) | Plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M |
| MeJa(1) | Plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μ M |
| MeJa(2) | Plantas tratadas con jasmonato de metilo 500 μ M |
| SA(1) + Fu | Plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inóculo de <i>Fusarium</i> sp. |
| SA(2) + Fu | Plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M e inóculo de <i>Fusarium</i> sp. |
| MeJa(1) + Fu | Plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μ M e inóculo de <i>Fusarium</i> sp. |
| MeJa(2) + Fu | Plantas tratadas con jasmonato de metilo 500 μ M e inóculo de <i>Fusarium</i> sp. |

En ambos experimentos se tomaron muestras de hojas y tallo el día del inóculo (D0), así como 1, 5 y 15 días después del inóculo con *Fusarium* (D1, D5 y D15), asimismo se realizó documentación fotográfica del estado de las plantas. Las muestras fueron pesadas y colocadas en nitrógeno líquido, para posteriormente ser almacenadas a -80°C. Se maceraron en presencia de nitrógeno líquido, y fueron resuspendidas en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7 para evaluar actividad enzimática (peroxidasas y β - 1,3 glucanasas), y en metanol al 80% (v/v) para fenoles totales. Se centrifugaron a 4700 rpm a 4°C por 20 minutos y el sobrenadante fue recuperado para las respectivas pruebas.

8.3.2. Evaluación de daño en el tallo y colonización de *Fusarium* sp. en tejidos

A partir de las 24 horas de la inoculación del hongo (D1), se realizó un corte transversal en el tallo abarcando 5 cm arriba y debajo del sitio donde se realizó la perforación con el taladro, y posteriormente se realizó un corte longitudinal atravesando la herida, con el fin de evaluar el daño de forma cualitativa. Se tomó una sección del tallo y se colocó en solución fijadora FAA.

Para evaluar la colonización de *Fusarium* sp., se retiró la solución fijadora FAA y se agregó KOH al 10%, manteniendo a 55°C durante 30 minutos. Posteriormente se retiró el KOH y realizaron tres lavados con agua destilada. Tras los lavados se agregó H₂O₂ al 2% y se mantuvieron las muestras a 55°C durante 30 minutos. Se retiró el H₂O₂ y se agregó HCl 0.1 N, colocando las muestras por 8 minutos a 55°C. Se descartó el HCl y se añadió azul de tripano al 0.05%, tras lo cual las muestras permanecieron por 30 minutos a 55°C. Finalmente se realizaron lavados con lactoglicerol hasta eliminar el colorante. Se observaron las muestras en un microscopio óptico (Microscopio Olympus modelo BH-2, Tokio, Japón).

8.3.3. Determinación de actividad de peroxidasas

Para cuantificar las proteínas PR con actividad peroxidasa, se tomó como referencia el protocolo seguido por Oliveira et al (2014). Una unidad de actividad peroxidasa (1 UA) se define como la variación de una unidad de absorbancia por minuto. El resultado se expresó por gramo de proteína total, la cual fue cuantificada por el método de Bradford (1976).

8.3.4. Determinación de actividad de β - 1,3 glucanasas

La cuantificación de proteínas PR con actividad β - 1,3 glucanasas se realizó con base en el protocolo de Oliveira et al (2014). Se estimaron los productos liberados tras la incubación para

los grupos reductores a 515 nm utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La glucosa se usó como estándar. Los resultados se expresaron como nkat por g de proteína total, la cual fue cuantificada por el método de Bradford (1976).

8.3.5. Acumulación de fitoalexinas por medio de compuestos fenólicos totales

Se basó en el protocolo seguido por Ainsworth & Gillespie (2007) con modificaciones. Se realizó un extracto metanólico, el cual fue cuantificado con reactivo de Folin Cicalteau durante 5 minutos. Se cuantificó a 650 y 725 nm. Como estándar para la cuantificación se tomó una curva de catecol. El resultado fue expresado como nm catecol/mg FW (peso fresco).

8.3.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Cultivo *in vitro* de *Theobroma cacao* L.

Uno de los objetivos fue realizar cultivo *in vitro* de *Theobroma cacao* L. con el fin de obtener plántulas para la realización de pruebas de inducción de resistencia, utilizando elicitores y filtrado de *Fusarium* sp.

9.1.1. Proliferación de yemas axilares

La proliferación de yemas axilares *in vitro* no es un método frecuentemente utilizado en cacao, aunque existen algunos reportes donde se ha tenido éxito (Flynn et al., 1990). En el ejemplo mencionado, se observó que los ápices resultaban más susceptibles a la contaminación y oxidación, a diferencia de los explantes nodales. Además, en estos últimos se observaba bajo índice de respuesta general.

Durante el desarrollo del proyecto no se obtuvieron resultados favorables, pues se presentaba oxidación constante de los explantes a pesar de incluir ácido cítrico y ascórbico en el medio de cultivo, ya que se tienen antecedentes que su uso en otros cultivos como *Solanum betaceum* (Salazar-Vega et al., 2022) -especie altamente susceptible a la oxidación derivada del daño mecánico- ha permitido reducirla, aunque fue posible controlar la contaminación. Debido a la escasez de antecedentes de la utilización de esta técnica en cacao y a los resultados obtenidos en el presente proyecto, esto podría sugerir que la proliferación de yemas axilares no es una técnica viable para la propagación *in vitro* de esta especie.



Figura 3. Proliferación de yemas axilares *in vitro* en *Theobroma cacao* L.

9.1.2. Embriogénesis somática

Referente a la embriogénesis somática, se seleccionó el método de desinfección con hipoclorito de sodio al 10% seguido por tres lavados de agua destilada, además de realizar un enjuague con solución de ácido cítrico y ascórbico previo a la disección. Esto se relacionó con menor oxidación de los explantes. Con respecto a la disección, los mejores resultados se obtuvieron con una separación de los sépalos, pétalos y estaminoides. Los sépalos no formaron callo, a diferencia de los pétalos y estaminoides. Esto coincide con lo reportado por Alejandro-Lázaro et al (2015), pues se menciona que estos son los explantes que poseen mayor importancia en la actualidad para la propagación *in vitro* de cacao. Aproximadamente tras dos meses de resiembras en medio DKW sin reguladores, se logró la formación de embriones somáticos (Figura 4A) y su posterior germinación (Figura 4B) en algunos cultivos. A pesar de esto, la cantidad de material vegetal obtenido no fue suficiente para poder continuar con el experimento, por lo que el seguimiento de este objetivo se continuará posteriormente.

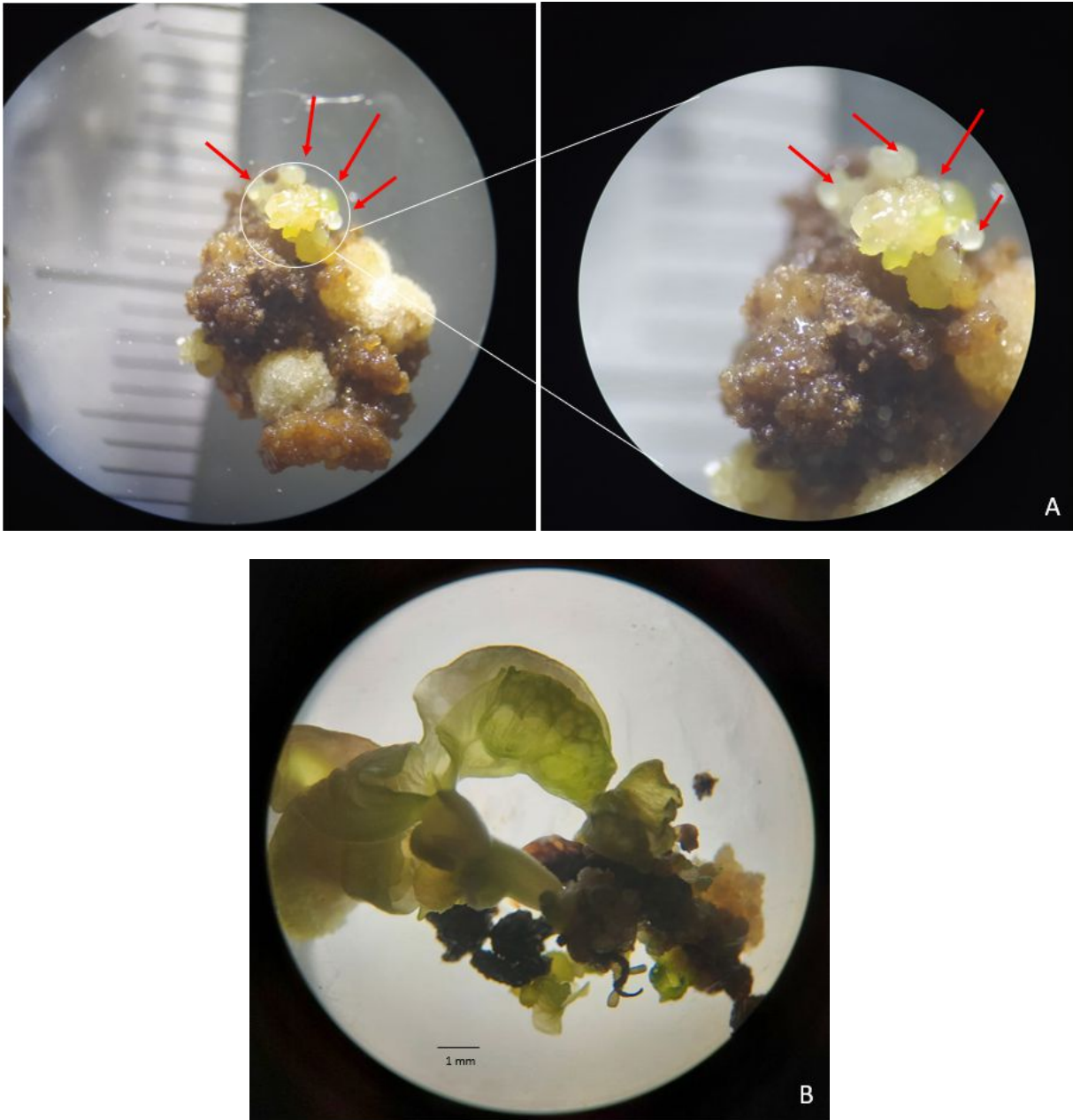


Figura 4. Embriogénesis somática en *Theobroma cacao* L. A: Formación de embriones somáticos. B: Germinación de embriones somáticos.

9.2. Pruebas de barrenado en *Theobroma cacao* L.

Se realizó una prueba de barrenado en plantas de cacao con el objetivo de probar y ajustar, de ser necesario, la técnica utilizada previamente en *Salix bonplandiana* (Camacho-Moreno, 2022). Se consideró utilizar la mayor cantidad de inóculo posible con el fin de generar una mayor superficie de daño o respuesta de defensa en la planta, sin que esto derive en daño

severo o la muerte de esta. Se evaluaron dos tipos de barrenado (50% y 80% del grosor del tallo) así como dos concentraciones de esporas (1×10^4 y 1×10^6 esporas/ml) y se realizaron muestreos de tallos 5 días y 60 días tras el inóculo, con el propósito de evaluar el daño presente en los mismos.

Durante el primer muestreo (Figura 5), 5 días tras la inoculación, en algunas plantas se observó daño previo al experimento causado por barrenadores. En los tratamientos correspondientes a ambos tipos de barrenado y concentraciones de esporas (Figura 5B, C y E), se presentó mayor lignificación del tallo en el sitio donde se realizó la perforación y posterior inóculo. En los tratamientos que no recibieron inóculo (Figura 5F-G), el daño presente en el tallo fue más superficial, derivado del daño mecánico por la acción de barreno.

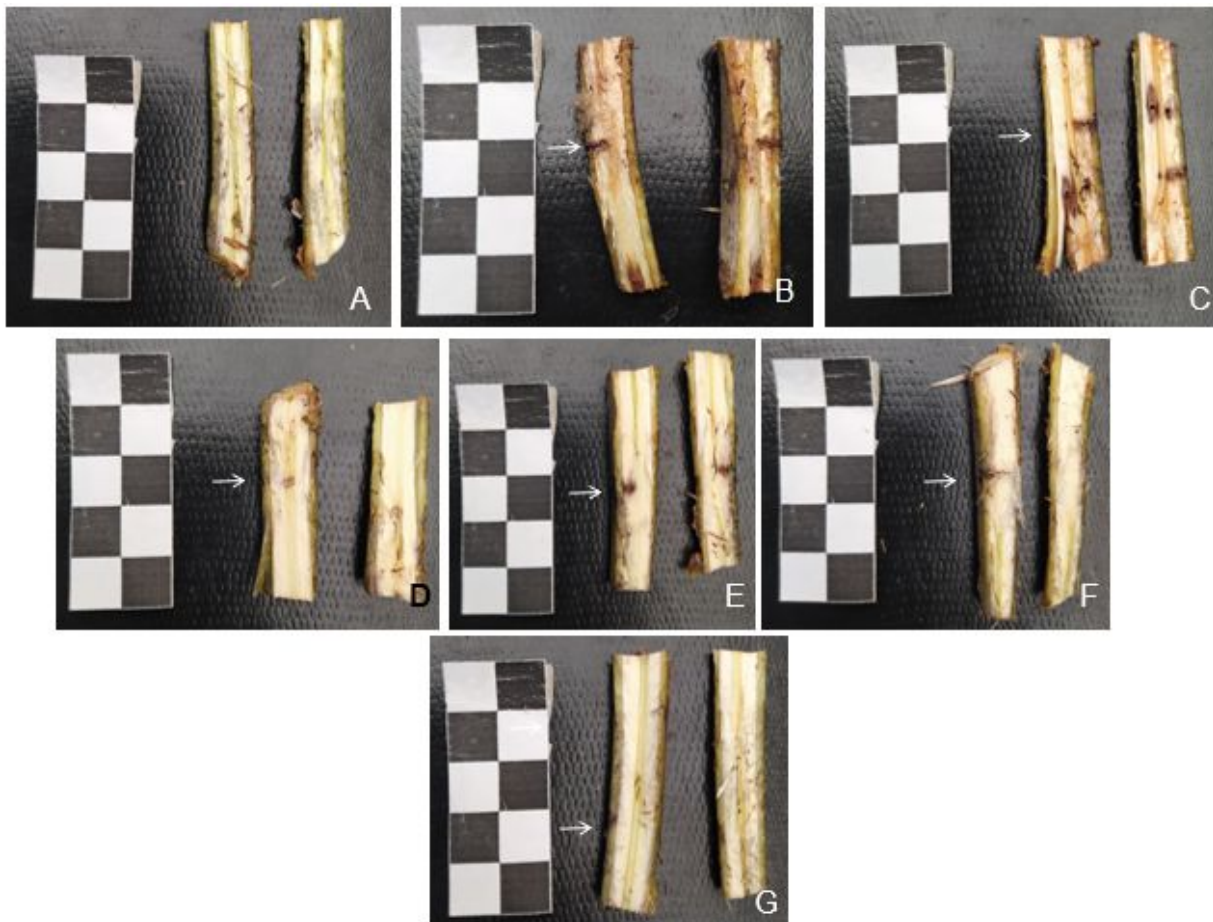


Figura 5. Daño en tallos de plantas de cacao 5 días después de la inoculación de *Fusarium* sp.; A: Control, plantas sin inóculo ni perforación. B. Perforación al 50% e inóculo con concentración 1×10^4 esporas/ml; C. Perforación al 50% e inóculo con concentración 1×10^6 esporas/ml; D. Perforación al 80% e inóculo con concentración 1×10^4 esporas/ml; E:

Perforación al 80% e inóculo con concentración 1×10^6 esporas/ml; F: Perforación al 50% sin inóculo; G: Perforación al 80% sin inóculo. Cada cuadro corresponde a 1x1 cm. Se señala el sitio donde se realizó la perforación.

El segundo muestreo se realizó 60 días tras el inóculo (Figura 6). Al igual que en el primer muestreo, se observó daño causado por barrenadores en algunas de las plantas, lo que dificultaba el percibir directamente el daño derivado de la acción de barrenado y posterior inóculo de *Fusarium* sp. En los tratamientos correspondientes a la perforación al 80% del grosor del tallo con ambas concentraciones de esporas (Figura 6C-D), se observó mayor daño en el tallo, en comparación con los tratamientos que no fueron inoculados (Figura 6E-F). El daño más evidente se presentó en el tratamiento correspondiente a la perforación al 80% y la concentración más alta de esporas (Figura 6D).

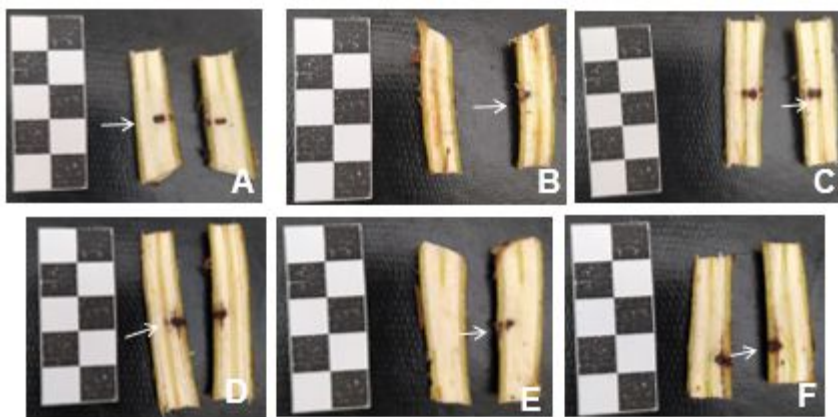


Figura 6. Daño en tallos de plantas de cacao 60 días después de la inoculación de *Fusarium* sp.; A. Perforación al 50% e inóculo con concentración 1×10^4 esporas/ml; B. Perforación al 50% e inóculo con concentración 1×10^6 esporas/ml; C. Perforación al 80% e inóculo con concentración 1×10^4 esporas/ml; D. Perforación al 80% e inóculo con concentración 1×10^6 esporas/ml; E. Perforación al 50% sin inóculo; F. Perforación al 80% sin inóculo. Cada cuadro corresponde a 1x1 cm. Se señala el sitio donde se realizó la perforación.

Derivado de los resultados obtenidos, se consideró utilizar la perforación al 80% del grosor del tallo, así como la concentración 1×10^6 esporas/ml para el posterior experimento en las instalaciones del CIATEJ pues estos parámetros, siendo los más altos, no derivaron en daño severo o la muerte de las plantas. Asimismo, no se observaron indicios de que este hongo sea patógeno en plantas de cacao debido a que no se presentaron síntomas de enfermedad durante el desarrollo del proyecto. Sin embargo, se espera que el barrenado y posterior inóculo permita desencadenar una respuesta de defensa en la planta.

En *Salix bonplandiana* (Camacho-Moreno, 2022) se observaron resultados similares, pues se presentó mayor área de daño en el tratamiento con perforación al 80% del grosor del tallo y una concentración de 1×10^6 esporas/ml, sin que esto derivara en la muerte de las plantas a los 30 días del establecimiento del experimento.

9.3. Pruebas con elicitores en *Theobroma cacao* L.

Se utilizaron dos elicitores: ácido salicílico (SA) y jasmonato de metilo (MeJa) con el fin de abarcar las dos principales rutas de señalización involucradas en la respuesta de defensa en las plantas: la vía del ácido salicílico y ácido jasmónico. Resulta importante señalar estas vías de señalización no funcionan de manera independiente, sino que llegan a tener influencia mutua, tanto con interacciones sinérgicas como antagónicas. De manera general, se considera que las vías del ácido salicílico y jasmónico poseen efectos antagónicos (Anil et al., 2013).

Es conocido que los niveles de ácido salicílico en la planta aumentan tras la infección, ya sea de virus, hongos, insectos o bacterias (Lefevere et al., 2020). Esto a su vez se asocia con la expresión de genes asociados a patogénesis y el desarrollo de la llamada resistencia sistémica adquirida (RSA o SAR). La inducción de respuestas defensivas en la planta también se puede desencadenar a través de la aplicación de ácido salicílico exógeno o sus análogos funcionales (An & Mou, 2011).

La vía del ácido jasmónico, por otro lado, se suele activar en respuesta a daño mecánico, insectos masticadores, herbívoros y patógenos necrotróficos (Schweiger et al., 2014).

Durante el desarrollo del experimento, se decidió utilizar jasmonato de metilo (MeJa) en lugar de ácido jasmónico (JA) pues se considera que este posee más eficacia debido a su propiedad volátil, lo que facilitaría el movimiento entre células y por lo tanto permitiría una activación más rápida de la vía del ácido jasmónico (Jiang & Yan, 2018).

En cacao existentes antecedentes de la utilización de acibenzolar-S-metil, un análogo de ácido salicílico, con el fin de mejorar la resistencia ante los fitopatógenos *Crinipellis pernicioso* y *Verticillium dahliae*. Se logró la disminución de la incidencia de ambas enfermedades con relación al control, lo que estuvo asociado con el aumento de actividad de enzimas como peroxidasas o polifenol oxidasas, aunque el perfil enzimático dependió del genotipo de cacao utilizado (Resende et al., 2002).

Se consideró que la aplicación de estos elicitores permitiría desencadenar una respuesta de defensa en plantas de cacao ante el inóculo de *Fusarium* sp. aislado de un complejo ambrosial. Esto se evaluó a partir del daño presente en el tallo, así como cuantificación de actividad enzimática (peroxidasas y β -1,3 glucanasas) y acumulación de compuestos fenólicos totales.

9.3.1. Evaluación de daño en el tallo y colonización de *Fusarium* sp.

Tres semanas después de la aplicación de los elicitores, se realizó documentación fotográfica del estado de las plantas. No se observaron efectos fitotóxicos asociados a la aplicación de estos con relación al control.

Un día tras el inóculo (D1), se realizaron cortes de los tallos para observar el daño asociado a la actividad de barrenos y posterior inoculación. Sin embargo, en este punto la diferencia entre los distintos tratamientos no fue clara, pues principalmente se observó el daño mecánico causado por el taladro y no derivado de la colonización del hongo.

En el muestreo del día 5 tras el inóculo (D5) (Figura 7), no se advirtieron cambios en la situación de los tallos: el daño presente en los mismos estaba principalmente asociado al daño mecánico, no se observaron efectos derivados de la potencial infección y colonización de *Fusarium* sp.



Figura 7. Cortes de tallo de *Theobroma cacao* L., día 5. A. Control, B. Inóculo, C. Tratamiento con ácido salicílico 50 μ M, D. Tratamiento con ácido salicílico 50 μ M e inóculo, E. Tratamiento con ácido salicílico 50 μ M e inóculo, F. Tratamiento con ácido salicílico 50 μ M e inóculo.

E. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μ M, F. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μ M e inóculo. Fotografías: Dr. Juvencio Castañeda Nava.

El último día de muestreo (Figura 8), las condiciones se mantuvieron y no se registraron daños causados por infección y colonización de *Fusarium* sp, aunque se observó mayor lignificación del tallo en tratamientos correspondientes al jasmonato de metilo (Figura 8E-F). Esto podría asociarse con el papel que posee el ácido jasmónico en la inducción de una respuesta hacia el daño mecánico (Schweiger et al., 2014). No se observaron efectos en el estado general de las plantas que pudiesen indicar daños causados por *Fusarium* sp. (Figura 9).

Se presentaron resultados similares en el experimento con *Salix*, pues a los 15 días de la inoculación no se observaron síntomas asociados a la colonización del hongo, solamente daño mecánico derivado del proceso de barrenado (Camacho-Moreno, 2022).



Figura 8. Cortes de tallo de *Theobroma cacao* L., día 15. A. Control, B. Inóculo, C. Tratamiento con ácido salicílico 50 μ M, D. Tratamiento con ácido salicílico 50 μ M e inóculo, E. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μ M, F. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μ M e inóculo. Fotografías: Dr. Juvencio Castañeda Nava.



Figura 9. Plantas de *Theobroma cacao* L., día 15. A. Control, B. Inóculo, C. Tratamiento con ácido salicílico 50 μ M, D. Tratamiento con ácido salicílico 50 μ M e inóculo, E. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μ M, F. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μ M e inóculo. Fotografías: Dr. Juvencio Castañeda Nava.

Referente a la colonización de *Fusarium* sp. en tallo, evaluada mediante tinción con azul de tripano (Figura 10): no se observó colonización al 100% en ninguno de los tratamientos al finalizar los muestreos. En algunos casos, incluyendo los tratamientos con elicitors, se observó presencia de micelio. Sin embargo, no es posible inferir una correlación entre el tipo de tratamiento (con o sin aplicación de elicitors, tipo de elicitor) y la cantidad de micelio observado.

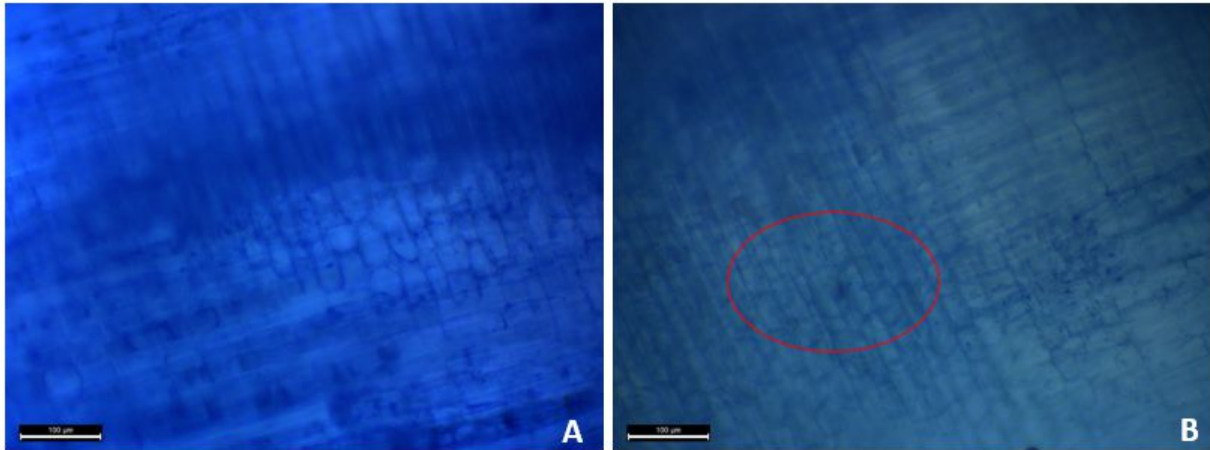


Figura 10. Evaluación de colonización de *Fusarium* sp. en tallos de cacao A. Planta no inoculada; B. Planta inoculada.

9.3.2. Respuesta de defensa bioquímica en plantas de cacao

Se evaluó la inducción de defensa bioquímica a través de la cuantificación de actividad enzimática de proteínas PR como β -1,3 glucanasas y peroxidasas, así como acumulación de compuestos fenólicos totales.

Las proteínas PR generalmente se encuentran presentes en las plantas, pero su producción y concentración aumenta de forma importante tras el ataque de un patógeno o al someterse a condiciones de estrés, ya sea biótico o abiótico (Agrios, 2005).

Las β -1,3 glucanasas se involucran directamente en la degradación de la pared celular de hongos potencialmente patógenos. Al degradar la pared celular, podrían liberarse compuestos como β -1,3 glucanos, los cuales a su vez podrían funcionar como elicitores, desencadenando tanto respuestas de defensa local como sistémica en la planta (Balasubramanian et al., 2012).

Las peroxidasas liberan radicales libres aumentando la tasa de polimerización de compuestos fenólicos a sustancias similares a lignina, lo que se deposita en la pared celular e interfiere con el desarrollo del patógeno (Agrios, 2005).

9.3.2.1. Actividad de peroxidasas

Se evaluó la actividad de peroxidasas (Tabla 5) tanto a nivel local (tallo, sitio donde se realizó el barrenado y posterior inóculo) como sistémico (hojas).

A nivel local, se presentó una diferencia significativa con el control en el tratamiento con jasmonato de metilo (MeJa), 21 días después de la aplicación de los elicitores (D0), exhibiendo mayor actividad. Un día después del inóculo (D1), se observó un aumento significativo en la actividad de peroxidasas en el tratamiento con ácido salicílico (SA) que no fue inoculado, sin observarse diferencias significativas en el resto de los tratamientos. Transcurridos 5 días (D5), la actividad de peroxidasas en todos los tratamientos con elicitores disminuyó y fue menor al control, aunque esto no fue significativo en el tratamiento con ácido salicílico sin inóculo. Al finalizar el experimento (D15) no se observaron diferencias entre los tratamientos. De manera general se observa que se presentó un efecto diferencial asociado a la aplicación de elicitores, tanto el jasmonato de metilo de manera inicial como el ácido salicílico al interactuar con el inóculo entre los días 1 y 5.

A nivel sistémico se presentaron niveles de actividad más altos que en los tallos. Un día tras el inóculo (D1) se observó una tendencia hacia un aumento de actividad en la mayoría de los tratamientos, aunque en el caso del tratamiento con ácido salicílico independientemente del inóculo, la actividad fue menor de forma significativa con respecto al control. 5 días (D5) después la actividad disminuyó en diversos tratamientos, pero en el caso del SA sin inóculo se presentó un aumento significativo. En el último día de muestreo (D15), el tratamiento que no recibió aplicación de elicitores pero fue inoculado con *Fusarium* exhibió significativamente menor actividad, mientras que los demás tratamientos presentaron un comportamiento similar al control. A partir de esta información se sugiere que, a nivel sistémico, el ácido salicílico al interactuar con *Fusarium* sp. presentó un efecto diferencial en la actividad de peroxidasas entre el día 1 y 5 después del inóculo, mientras que no se observaron diferencias significativas en los tratamientos con jasmonato de metilo.

Se presentaron problemas con las muestras correspondientes al tratamiento con MeJa día 1 tras el inóculo, así como el tratamiento con *Fusarium* sp. 5 días tras el inóculo, por lo que la actividad enzimática se enlista como “no determinada” (ND).

Tabla 5. Actividad de peroxidasas en hojas y tallos de cacao.

| Días | Tratamiento | Hojas | Tallos |
|------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| | | UA / g proteína total | UA / g proteína total |
| D0 | C | 2.13 ± 0.414 a | 0.018 ± 0.025 a |
| | SA | 2.71 ± 0.481 a | 0.045 ± 0.065 ab |
| | MeJa | 2.73 ± 0.827 a | 0.066 ± 0.047 b |
| D1 | C | 4.03 ± 0.561 b | 0.055 ± 0.081 a |
| | Fu | 4.12 ± 0.84 b | 0.005 ± 0.004 a |
| | SA | 3.3 ± 0.919 a | 0.703 ± 1.090 b |
| | SA + Fu | 2.1 ± 1.636 a | 0.067 ± 0.100 a |
| | MeJa | ND | ND |
| | MeJa + Fu | 4.21 ± 2.261 b | 0.016 ± 0.024 a |
| D5 | C | 2.08 ± 2.373 a | 0.046 ± 0.049 c |
| | Fu | ND | ND |
| | SA | 4.06 ± 0.919 b | 0.029 ± 0.030 bc |
| | SA + Fu | 1.7 ± 1.636 a | 0.004 ± 0.006 a |
| | MeJa | 1.66 ± 1.354 a | 0.008 ± 0.007 ab |
| | MeJa + Fu | 3.01 ± 2.261 ab | 0.005 ± 0.006 ab |
| D15 | C | 2.65 ± 1.826 b | 0.013 ± 0.013 a |
| | Fu | 0.72 ± 1.023 a | 0.399 ± 0.747 a |
| | SA | 2.12 ± 1.478 ab | 0.239 ± 0.693 a |
| | SA + Fu | 3.43 ± 0.703 b | 0.014 ± 0.018 a |
| | MeJa | 2.67 ± 2.492 b | 0.028 ± 0.026 a |
| | MeJa + Fu | 2.96 ± 1.142 b | 0.018 ± 0.014 a |

C corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp., Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp., SA: plantas tratadas con ácido salicílico 50 µM, SA+Fu: plantas tratadas con ácido salicílico 50 µM e inoculadas con *Fusarium* sp., MeJa: plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 µM, MeJa + Fu: corresponde a plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 µM e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación. Letras iguales corresponden a actividades enzimáticas estadísticamente similares y letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En el estudio de Resende et al (2002) con plantas de cacao se observó que la actividad de peroxidasas difirió de forma significativa entre las plantas tratadas con un elicitador (acibenzolar-S-metil, análogo de ácido salicílico) y el control, presentando mayor actividad en las primeras, independientemente del inóculo. 15 días tras la inducción se alcanzaron los niveles más altos de actividad, mientras que a los 30 días se observaron los menores. En el presente proyecto se observó una tendencia similar de aumento y posterior disminución de actividad. Si bien sí se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el control

y tratamientos con elicitores, principalmente en el caso del ácido salicílico, no se observó un aumento significativo de actividad asociado a estos. Esto puede atribuirse a diversas causas, pero una de ellas podría ser el tipo o dosis de elicitador utilizada, como fue en el caso de War et al (2011) donde se observó que la dosis puede ser insuficiente para desencadenar una respuesta de defensa significativa en las plantas o incluso resultar fitotóxica, lo que podría derivar en una disminución de la actividad. Otro factor que podría estar relacionado con una baja respuesta podría ser el hongo utilizado: aunque fue utilizada una cepa de *Fusarium* aislada de un escarabajo ambrosial, esta no tiene una patogenicidad hacia el cacao y por lo tanto la respuesta inducida es de baja intensidad.

9.3.2.2. Actividad de β -1,3 glucanasas

Se cuantificó la actividad de β -1,3 glucanasas a nivel local (tallos) y sistémico (hojas) (Tabla 6).

En los tallos, el tratamiento con jasmonato de metilo presentó menor actividad que el control 21 días tras la aplicación de elicitores (D0). No se observaron muchas diferencias entre los tratamientos y muestreos en un inicio, pero en el día 5 (D5) se comenzó a presentar una tendencia al aumento de actividad, siendo estadísticamente significativo con respecto al control el tratamiento con ácido salicílico que no fue inoculado. Durante el día 15 (D15), los tratamientos con ambos elicitores e inóculo presentaron un aumento en la actividad en comparación al resto. Esto puede indicar que sí existe una respuesta local en los tratamientos con elicitores y el hongo, pero no se presenta de forma inmediata.

En las hojas se destaca un comportamiento similar al finalizar el experimento, pues los tratamientos con jasmonato de metilo sin inóculo y ambos elicitores con el inóculo presentaron un aumento significativo en la actividad. Esto se puede asociar con la inducción de una respuesta sistémica.

Al igual que la determinación de actividad de peroxidasas, se presentaron problemas con las muestras correspondientes al tratamiento con MeJa día 1 tras el inóculo, así como el tratamiento con *Fusarium* sp. 5 días tras el inóculo, por lo que la actividad enzimática se menciona como “no determinada” (ND).

Tabla 6. Actividad de B- 1,3 glucanasas en hojas y tallos de cacao

| Días | Tratamiento | Hojas nKat / g proteína total | Tallos nKat / g proteína total |
|------|-------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| D0 | C | 3.15 ± 2.091 ab | 1.41 ± 0.475 b |
| | SA | 2.1 ± 0.566 a | 1.13 ± 0.055 ab |
| | MeJa | 4.43 ± 2.456 b | 1.05 ± 0.338 a |
| D1 | C | 4.41 ± 1.821 b | 1.46 ± 0.294 ab |
| | Fu | 4.39 ± 1.887 b | 1.14 ± 0.242 a |
| | SA | 3.07 ± 0.424 ab | 1.42 ± 0.335 ab |
| | SA + Fu | 3.76 ± 1.175 b | 1.22 ± 0.21 a |
| | MeJa | ND | ND |
| | MeJa + Fu | 2.31 ± 1.264 a | 1.61 ± 0.43 b |
| D5 | C | 3.77 ± 1.593 c | 2.12 ± 0.508 a |
| | Fu | ND | ND |
| | SA | 2.6 ± 0.466 ab | 3.14 ± 1.360 b |
| | SA + Fu | 2.36 ± 0.218 a | 1.49 ± 0.751 a |
| | MeJa | 3.46 ± 1.008 bc | 2.01 ± 0.845 a |
| | MeJa + Fu | 3.47 ± 1.205 bc | 1.88 ± 0.683 a |
| D15 | C | 2.46 ± 0.338 a | 2.15 ± 0.837 a |
| | Fu | 2.55 ± 0.896 a | 1.85 ± 0.663 a |
| | SA | 2.34 ± 0.446 a | 2.29 ± 0.609 a |
| | SA + Fu | 4.15 ± 1.572 b | 3.79 ± 1.809 b |
| | MeJa | 4.04 ± 1.964 b | 2.19 ± 1.027 a |
| | MeJa + Fu | 4.94 ± 1.736 b | 3.5 ± 2.006 b |

C corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp., Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp., SA: plantas tratadas con ácido salicílico 50 µM, SA+Fu: plantas tratadas con ácido salicílico 50 µM e inoculadas con *Fusarium* sp., MeJa: plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 µM, MeJa + Fu: corresponde a plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 µM e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación. Letras iguales corresponden a actividades enzimáticas estadísticamente similares y letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Existen pocos estudios sobre la inducción de respuestas de defensa en plantas leñosas como el cacao, pero en Resende (2002) se menciona que esta especie difiere de lo reportado en plantas herbáceas, pues la activación de las respuestas defensivas requiere un periodo más largo de tiempo tras la aplicación del inductor. El aumento de actividad de β 1,3-glucanasas asociado con la aplicación de elicitores o interacción con un patógeno coincide con lo reportado por Gupta et al (2013), pues la actividad enzimática aumentó de forma progresiva y significativa

con relación al control en plantas de rúcula (*Eruca sativa*) en respuesta al hongo *Alternaria brassicicola*.

9.3.2.3. Acumulación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos generalmente pueden ser tóxicos para los patógenos, y tienen a acumularse a una tasa más alta tras la infección (Agrios, 2005). La especificidad de estos compuestos depende de la condición de estrés, y de la propia planta (Chowdhary et al., 2022). Se evaluó la acumulación de compuestos fenólicos totales tanto en tallos (respuesta local) como hojas (respuesta sistémica) (Tabla 7) a dos longitudes de onda, 650 y 725 nm. En el caso de los tallos, un día tras el inóculo (D1) comenzó a observarse una tendencia hacia al aumento de actividad: el tratamiento con ácido salicílico e inóculo de *Fusarium* destacó al presentar un aumento significativo en la producción de compuestos fenólicos, presentando un comportamiento diferencial con respecto al que no fue inoculado. En el caso del tratamiento con *Fusarium* que no recibió aplicación de elicitores, la acumulación de compuestos fenólicos fue significativamente menor al control. Durante el día 5 (D5), la producción de compuestos fenólicos disminuyó en el tratamiento con ácido salicílico e inóculo, pero en los tratamientos con jasmonato de metilo se presentó un aumento con respecto al control, aunque solamente fue significativo en el caso del que incluía el inóculo. Al finalizar el experimento, la producción de compuestos fenólicos totales disminuyó en todos los tratamientos, solamente MeJa+Fu se mantuvo sin diferencia significativa con respecto al control. Esto sugiere que se presenta un comportamiento diferencial en la respuesta local en la acumulación de fenólicos totales en los tratamientos que incluyen ambos elicitores e inóculo.

En las hojas se observó un efecto similar, aunque 21 días tras la aplicación de elicitores (D0), se observó un aumento significativo en la cantidad de compuestos fenólicos totales de las plantas tratadas con ambos elicitores (SA y MeJa) con relación al control. Un día tras el inóculo (D1), se presentó un incremento significativo en los tratamientos con elicitores e inóculo de *Fusarium* sp., nuevamente presentando un efecto diferencial respecto a los que no fueron inoculados o no recibieron aplicación de elicitores. Durante el día 5 (D5), la cantidad de compuestos fenólicos disminuyó en estos tratamientos, y se presentó un comportamiento similar en todos. Esto indica que se presentó una respuesta tanto local como sistémica derivada de la aplicación de elicitores en la interacción con el inóculo de *Fusarium* sp., siendo el día 1 el que presentó un efecto notorio.

Al igual que en la actividad enzimática de β -1,3 glucanasas y peroxidasas, se presentaron problemas con las muestras correspondientes al tratamiento con MeJa, día 1 tras el inóculo, así como en el tratamiento con *Fusarium* sp, por lo que se coloca el valor “no determinado” (ND).

Tabla 7. Cuantificación de compuestos fenólicos totales a 650 nm en hojas y tallos de cacao.

| Días | Tratamiento | Hojas nm catecol / mg peso fresco | Tallos nm catecol / mg peso fresco |
|------|-------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| D0 | C | 1.86 ± 0.459 a | 1.81 ± 0.336 a |
| | SA | 2.74 ± 0.419 b | 2.07 ± 0.159 a |
| | MeJa | 2.38 ± 0.241 b | 2.07 ± 0.580 a |
| D1 | C | 2.31 ± 0.053 b | 2.51 ± 0.212 b |
| | Fu | 1.98 ± 0.213 a | 2.11 ± 0.139 a |
| | SA | 1.96 ± 0.281 a | 2.21 ± 0.153 a |
| | SA + Fu | 3.05 ± 0.193 d | 3.35 ± 0.626 c |
| | MeJa | ND | ND |
| | MeJa + Fu | 2.69 ± 0.252 c | 2.67 ± 0.298 b |
| D5 | C | 2.45 ± 0.362 a | 2.31 ± 0.258 a |
| | Fu | ND | ND |
| | SA | 2.53 ± 0.153 a | 2.36 ± 0.453 a |
| | SA + Fu | 2.43 ± 0.120 a | 2.30 ± 0.369 a |
| | MeJa | 2.59 ± 0.336 a | 2.53 ± 0.208 ab |
| | MeJa + Fu | 2.58 ± 0.137 a | 2.85 ± 0.601 b |
| D15 | C | 2 ± 0.278 bc | 2.41 ± 0.316 c |
| | Fu | 1.82 ± 0.157 ab | 1.75 ± 0.267 b |
| | SA | 1.76 ± 0.135 ab | 1.54 ± 0.053 a |
| | SA + Fu | 1.65 ± 0.131 a | 1.43 ± 0.087 a |
| | MeJa | 1.65 ± 0.083 a | 1.57 ± 0.092 a |
| | MeJa + Fu | 2.1 ± 0.606 c | 2.32 ± 0.161 c |

C: corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp., Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp., SA: plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M, SA+Fu: plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., MeJa: plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μ M, MeJa + Fu: corresponde a plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación. Letras iguales corresponden a actividades enzimáticas estadísticamente similares y letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

El aumento de compuestos fenólicos totales asociado con la aplicación de elicitores se ha reportado en diversos estudios: en el caso del tomate (*Solanum lycopersicum*) en sistema de cultivo hidropónico se produjo un aumento gradual 24 horas después de la aplicación de

elicitores, siendo hasta 12 veces mayor al control en el caso del ácido salicílico tras 96 horas. Esto potencialmente estuvo asociado con una mejor respuesta de defensa ante *Ralstonia solanacearum*, disminuyendo la incidencia de la enfermedad (Mandal et al., 2013). También se advirtió una mayor acumulación de compuestos fenólicos en plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) tratadas con ácido salicílico 2 mM (War et al., 2011)

9.4. Pruebas con elicitores en *Persea americana*

Se realizó un experimento similar al descrito anteriormente, pero, a diferencia al realizado en *Theobroma cacao* L., se utilizaron dos dosis de cada elicitor: 50 y 500 μ M, con el fin de evaluar la inducción de respuesta de defensa ante un inóculo de *Fusarium* sp. aislado de un complejo ambrosial.

9.4.1. Evaluación de daño en el tallo y colonización de *Fusarium* sp.

Un día tras el inóculo de *Fusarium* (D1), se realizaron cortes de tallo para observar el daño. Sin embargo, en este punto solamente se observó daño mecánico derivado de la actividad de barrenos, sin existir una diferencia clara entre los distintos tratamientos.

En el día 5 (D5) (Figura 11) en algunos tratamientos se percibió mayor lignificación del tejido. No obstante, la diferencia entre los tratamientos no fue tan evidente para permitir hacer una inferencia sobre el efecto de los elicitores al interactuar con el inóculo de *Fusarium* sp.

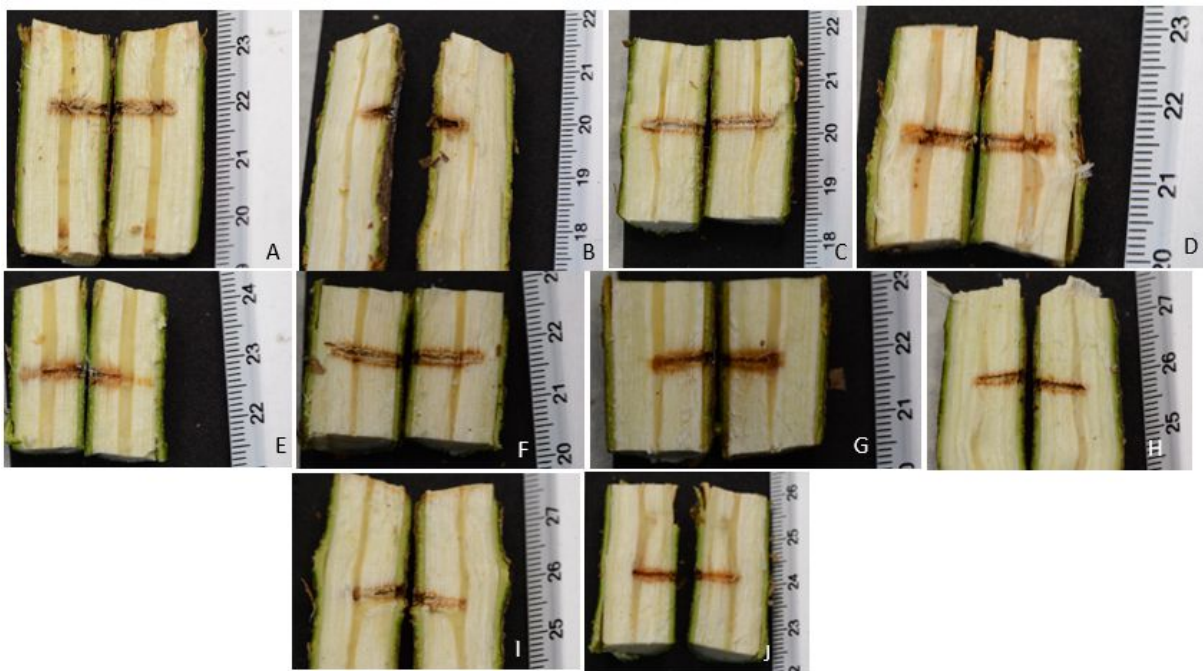


Figura 11. Cortes de tallo de *Persea americana*, día 5. A. Control, B. Inóculo, C. Tratamiento con ácido salicílico 50 μM , D. Tratamiento con ácido salicílico 500 μM , E. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μM , F. Tratamiento con jasmonato de metilo 500 μM , G. Tratamiento con ácido salicílico 50 μM e inóculo, H. Tratamiento con ácido salicílico 500 μM e inóculo, I. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μM e inóculo, J. Tratamiento con jasmonato de metilo 500 μM e inóculo. Fotografías: Dr. Juvencio Castañeda Nava.

Durante el último día de muestreo (Figura 12) se observó mayor lignificación en los tallos, tanto el tratamiento que solamente recibió el inóculo (Figura 12B) como los que fueron tratados con elicitores, independientemente de si fueron inoculados o no (Figura 12C-J), a diferencia del control (Figura 12A). Se considera que la lignificación es un indicador de la inducción de respuestas de defensa, pues se asocia con un refuerzo de la pared celular, aumentando su resistencia (Patel et al., 2020).



Figura 12. Cortes de tallo de *Persea americana*, día 15. A. Control, B. Inóculo, C. Tratamiento con ácido salicílico 50 μM , D. Tratamiento con ácido salicílico 500 μM , E. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μM , F. Tratamiento con jasmonato de metilo 500 μM , G. Tratamiento con ácido salicílico 50 μM e inóculo, H. Tratamiento con ácido salicílico 500 μM e inóculo, I. Tratamiento con jasmonato de metilo 50 μM e inóculo, J. Tratamiento con jasmonato de metilo 500 μM e inóculo. Fotografías: Dr. Juvencio Castañeda Nava.

Al igual que en el experimento realizado con cacao, así como el experimento con *Salix* (Camacho-Moreno, 2022), no se observaron síntomas o daños en las plantas que pudiesen indicar que *Fusarium* sp. es patógeno para esta especie. El daño en el tallo observado durante el desarrollo del proyecto está principalmente asociado al proceso de barrenado, y no a la potencial infección causada por el hongo. Asimismo, al realizar las tinciones para evaluar la colonización de *Fusarium* en el tallo se presentaron resultados similares a los obtenidos en cacao: no se observó colonización al 100% al finalizar el experimento, y, si bien se observó

presencia de micelio en algunos tratamientos, esto no permite inferir una relación con el tipo de tratamiento aplicado.

9.4.2. Respuesta de defensa bioquímica en plantas de aguacate

Se evaluó en tallos (respuesta local) y hojas (respuesta sistémica) la actividad de peroxidasas, β -1,3 glucanasas y acumulación de compuestos fenólicos totales asociada a los distintos tratamientos.

9.4.2.1. Actividad de peroxidasas

Después de 21 días de la aplicación de los elicitores (D0), en las hojas (Figuras 13 y 14) el tratamiento con jasmonato de metilo en su menor dosis presentó significativamente menor actividad con respecto al control. Un día tras el inóculo (D1), los tratamientos con ácido salicílico en ambas dosis y jasmonato de metilo en su dosis más baja sin inóculo presentaron un aumento significativo de actividad, teniendo un efecto diferencial con los que sí fueron inoculados. Durante el día 5 (D5), la actividad de estos tratamientos disminuyó y se observó una tendencia al aumento de actividad en los tratamientos que recibieron el inóculo, siendo estadísticamente significativo con respecto al control en el tratamiento con ácido salicílico en su menor dosis, así como el jasmonato de metilo en su dosis más alta sin inóculo. Al finalizar el experimento, volvió a presentarse un aumento de actividad en los tratamientos con ácido salicílico sin inóculo, siendo estadísticamente significativo en la dosis más baja, así como en el tratamiento que solamente fue inoculado pero no recibió aplicación de elicitores. Asimismo, los tratamientos que habían presentado mayor actividad durante el día 5, presentaron una disminución de esta. Se presentó un efecto diferencial en la actividad de peroxidasas a nivel sistémico asociado con el tipo de elicitador utilizado, su dosis y el inóculo de *Fusarium* sp.

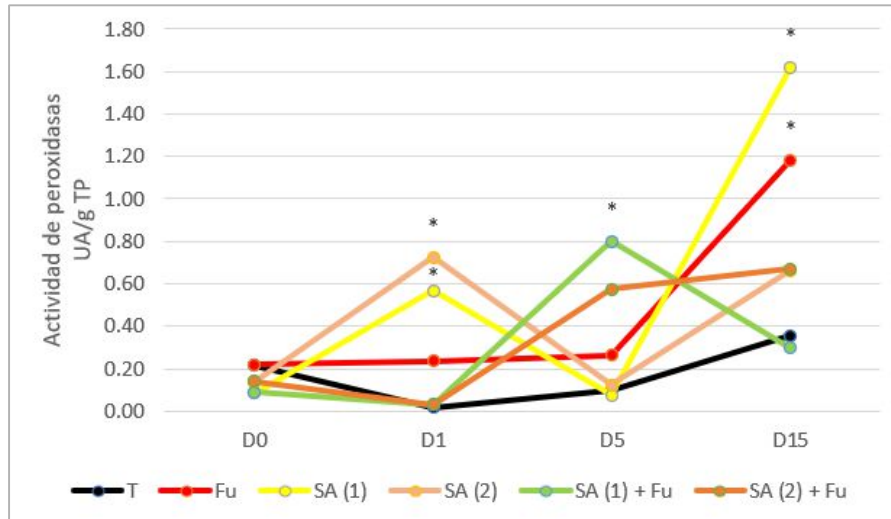


Figura 13. Actividad de peroxidasas en hojas de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. SA(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M, SA(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M, SA(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., SA(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp. D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

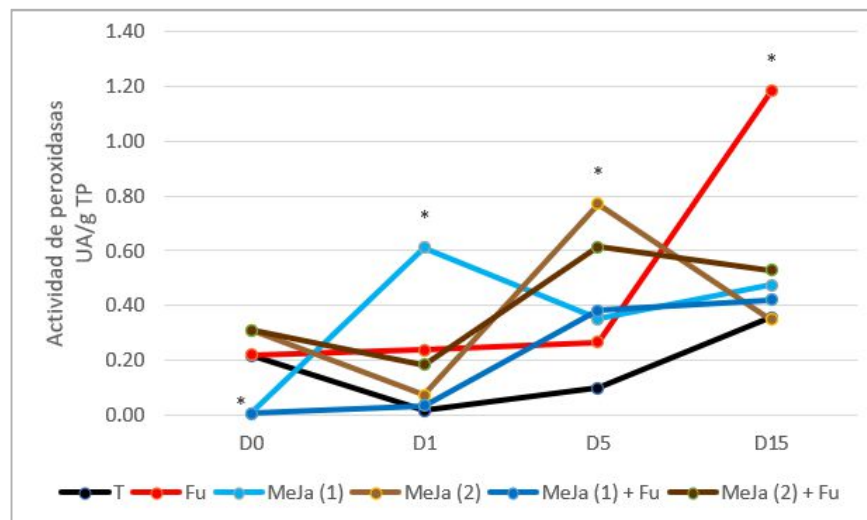


Figura 14. Actividad de peroxidasas en hojas de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. MeJa(1): plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μ M, MeJa(2): plantas tratadas con jasmonato de metilo 500 μ M, MeJa(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con jasmonato de metilo 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., MeJa(2) + Fu: corresponde a

plantas tratadas con jasmonato de metilo 500 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

En tallos (respuesta local) (Figuras 15 y 16) se presentó una disminución significativa en la actividad de peroxidasas en los tratamientos que recibieron las dosis más altas de ambos elicitors. Un día después de recibir el inóculo (D1), los tratamientos con dosis más altas de presentaron un aumento significativo de actividad con relación a los controles, el cual se mantuvo hasta el día 5 (D5). Al finalizar el experimento, la actividad de peroxidasas en estos tratamientos disminuyó y fue similar en todos los tratamientos, con la excepción de ácido salicílico en su dosis más baja, ya que presentó mayor actividad. Se puede observar que existe una respuesta local inducida por los elicitors, principalmente entre el día 1 y 5 después del inóculo, lo cual además estuvo asociado con la dosis de elicitor más alta.

En un estudio con plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) también se observó un efecto asociado a la dosis de elicitor: las plantas tratadas con 1.5 mM de ácido salicílico presentaron mayor actividad de peroxidasas, a diferencia de las dosis 1 mM y 2 mM. En este caso, la menor actividad observada en la dosis más alta potencialmente estuvo ligada con un efecto fitotóxico (War et al., 2011). En plantas de tomate, se observó un aumento de actividad de peroxidasas tres veces mayor en plantas tratadas con acibenzolar-S-metil (análogo de ácido salicílico) con relación al control. Durante el día 5 tras el inóculo, la actividad en plantas tratadas con elicitor pero no inoculadas fue significativamente menor a las que sí lo fueron. Asimismo, al efecto transitorio de aumento de actividad le siguió una rápida disminución (Baysal et al., 2003), un patrón similar al observado en el presente experimento.

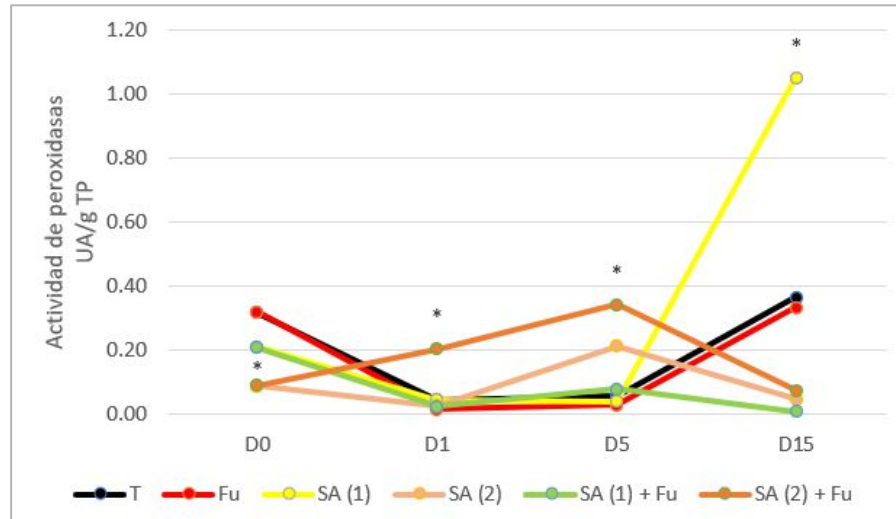


Figura 15. Actividad de peroxidasas en tallos de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. SA(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M, SA(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M, SA(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., SA(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

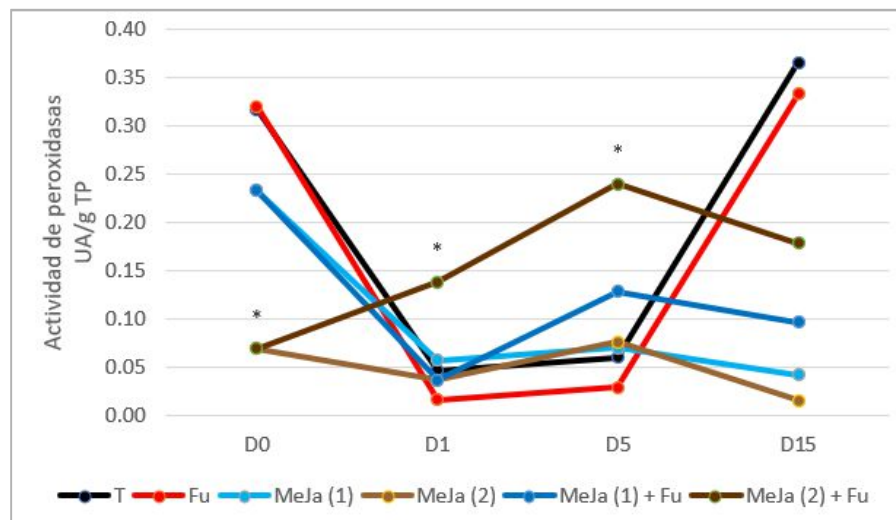


Figura 16. Actividad de peroxidasas en tallos de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. MeJa(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M, MeJa(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M, MeJa(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., MeJa(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas

con ácido salicílico 500 μM e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

9.4.2.2. Actividad de B – 1,3 glucanasas

En las hojas (Figuras 17 y 18) se presentó una disminución de actividad en las B -1,3 glucanasas tras la aplicación de ácido salicílico (SA) en ambas concentraciones, lo que posiblemente esté ligado al proceso de priming. Un día después del inóculo (D1), se observó una tendencia al aumento de actividad en la mayoría de los tratamientos siendo significativo con respecto al control en el tratamiento con jasmonato de metilo en su dosis más alta al no ser inoculado, presentando un comportamiento diferencial con el que sí recibió el inóculo; así como ácido salicílico 50 μM e inóculo de *Fusarium* sp. 5 días después (D5), todos los tratamientos con elicitores presentaron una tendencia a la disminución de actividad, a diferencia del control y al que fue inoculado con *Fusarium* sp, el cual presentó un aumento con respecto al muestreo anterior. La actividad del tratamiento con jasmonato de metilo en su dosis más alta e inóculo fue menor de forma significativa con respecto al control. En este punto, todos los tratamientos con elicitores e inóculo presentaron significativamente menor actividad con relación al tratamiento que solamente recibió el inóculo.

Al finalizar el experimento, se mantuvo la tendencia a la disminución de actividad en diversos tratamientos, pero se presentó un aumento en el tratamiento con ácido salicílico en su menor dosis sin inóculo. Tanto este tratamiento como el que solamente fue inoculado con *Fusarium* sp. presentaron significativamente mayor actividad que el control. Por otro lado, el ácido salicílico en su dosis más alta y el jasmonato de metilo en su dosis más baja presentaron significativamente menor actividad. Se presentó un efecto diferencial a nivel sistémico asociado a la aplicación de elicitores e inóculo.

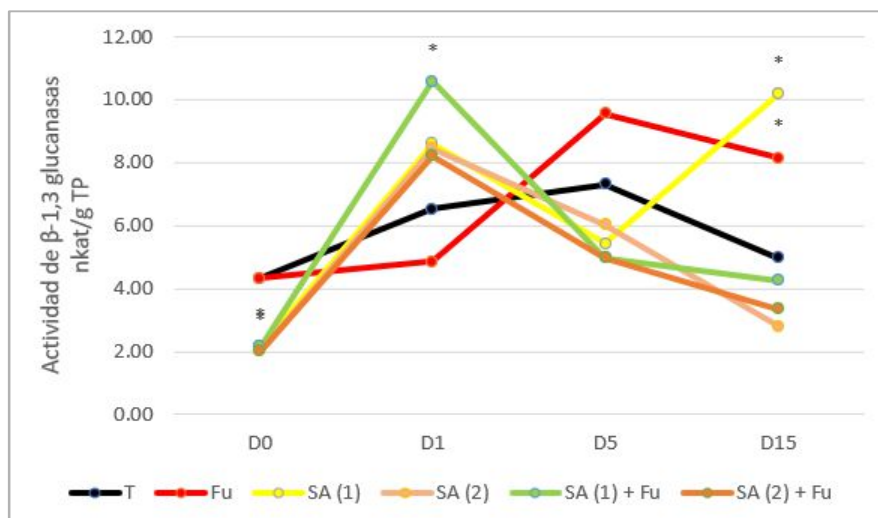


Figura 17. Actividad de B -1,3 glucanasas en hojas de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. SA(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M, SA(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M, SA(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., SA(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

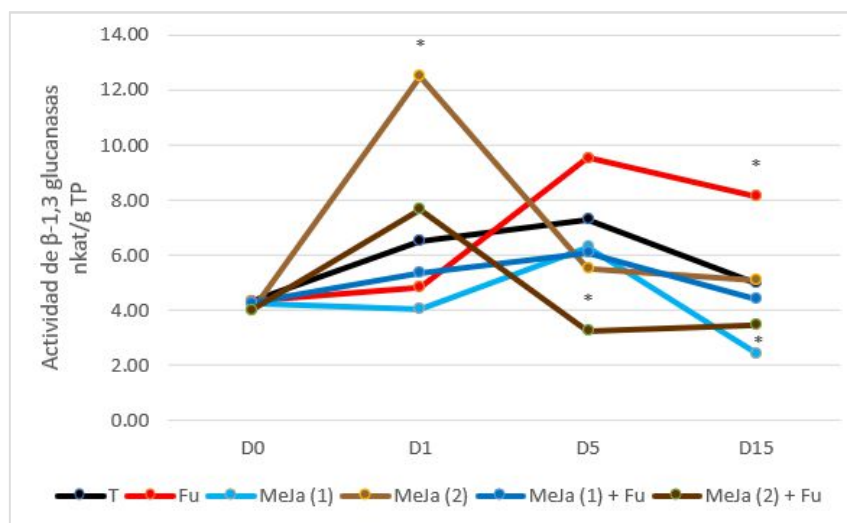


Figura 18. Actividad de B -1,3 glucanasas en hojas de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. MeJa(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M, MeJa(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M, MeJa(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., MeJa(2) + Fu: corresponde a plantas

tratadas con ácido salicílico 500 μM e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

En el tallo (Figuras 19 y 20), 21 días tras la aplicación de elicitores (D0) se observó una disminución significativa en el tratamiento con ácido salicílico en la menor dosis. Entre las dosis de cada elicitor se presentó un comportamiento diferencial. Un día tras el inóculo (D1), la mayoría de los tratamientos presentó un comportamiento similar al control, si bien en el caso del ácido salicílico en su mayor dosis sin inóculo y el jasmonato de metilo en su mayor dosis con inóculo se produjo un aumento significativo. En el día 5 (D5) se presentaron comportamientos muy distintos entre los tratamientos, existiendo tanto la disminución como aumento de actividad, destacando el ácido salicílico en su dosis más alta sin inóculo como el jasmonato de metilo en su dosis más alta con inóculo, ya que ambos exhibieron significativamente mayor actividad al control. Al finalizar el experimento, se observó un aumento en el control y el tratamiento que fue inoculado, mientras que la mayoría de los tratamientos con elicitores presentaron significativamente menor actividad.

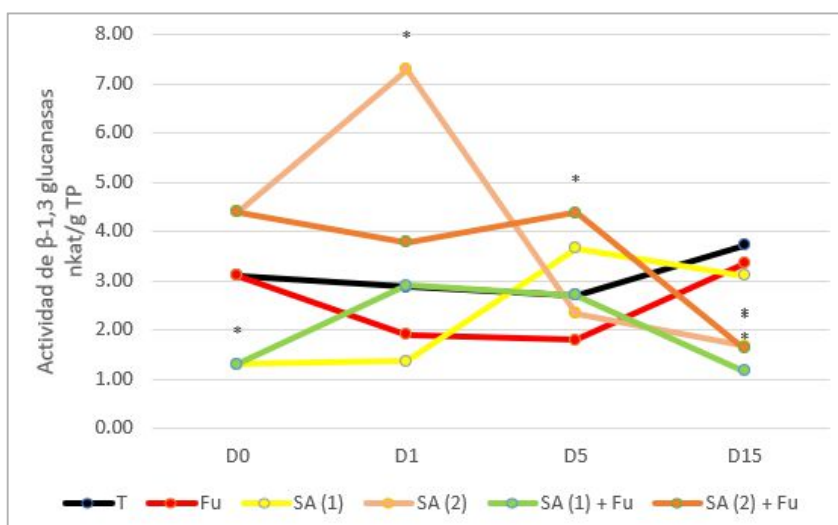


Figura 19. Actividad de B -1,3 glucanasas en tallos de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. SA(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μM , SA(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μM , SA(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μM e inoculadas con *Fusarium* sp., SA(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 500 μM e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días

después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

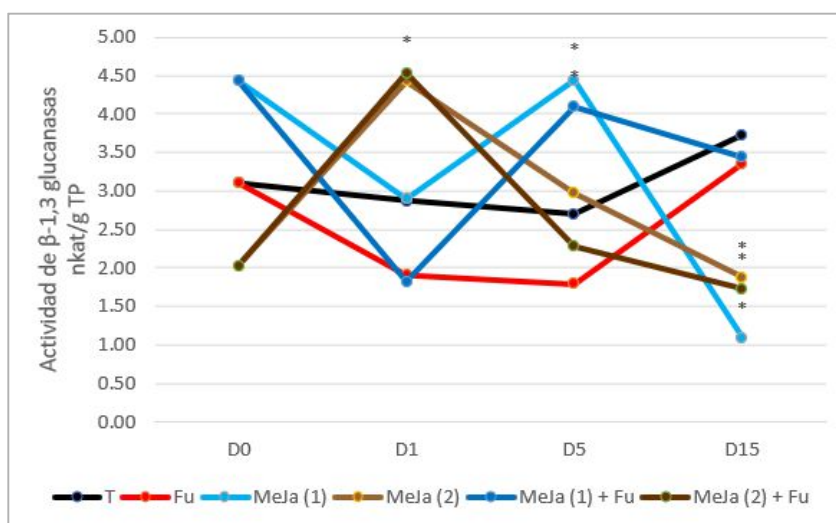


Figura 20. Actividad de B -1,3 glucanasas en tallos de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. MeJa(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M, MeJa(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M, MeJa(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., MeJa(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

9.4.2.3. Acumulación de compuestos fenólicos totales

Se evaluó la acumulación de compuestos fenólicos totales tanto en tallos como hojas a 650 y 725 nm. Veintiún días tras la aplicación de elicitores (D0), las hojas (Figuras 21 y 22) que fueron asperjadas con ambas concentraciones de jasmonato de metilo (MeJa) presentaron una disminución significativa en la cantidad de fenólicos totales. Un día tras el inóculo (D1), en diversos tratamientos se observó una tendencia a la disminución en la cantidad de compuestos fenólicos, siendo significativa con respecto al control en el caso del jasmonato de metilo 50 μ M con inóculo. Por otro lado, dos tratamientos destacaron al presentar un aumento significativo: el que recibió el inóculo de *Fusarium* sp. y no fue tratado con elicitores, y el ácido salicílico en su mayor dosis sin inóculo. Durante el día 5 (D5) continuó la tendencia hacia la disminución de compuestos fenólicos, siendo todos los tratamientos con elicitores, así como el que solamente fue inoculado, menores al control. Presentaron diferencias

significativas el tratamiento con *Fusarium* sp. y el jasmonato de metilo en su dosis más alta con inóculo. Al finalizar el experimento volvió a producirse un aumento en los compuestos fenólicos totales en algunos tratamientos: las plantas inoculadas, y que a su vez no recibieron elicitors, destacaron por poseer la mayor acumulación. También se presentó un aumento significativo en tratamientos con ácido salicílico en ambas dosis sin inóculo. Los tratamientos con elicitors e inóculo no difirieron del control. A grandes rasgos, esto sugiere que existe una respuesta sistémica asociada a la aplicación de estos elicitors.

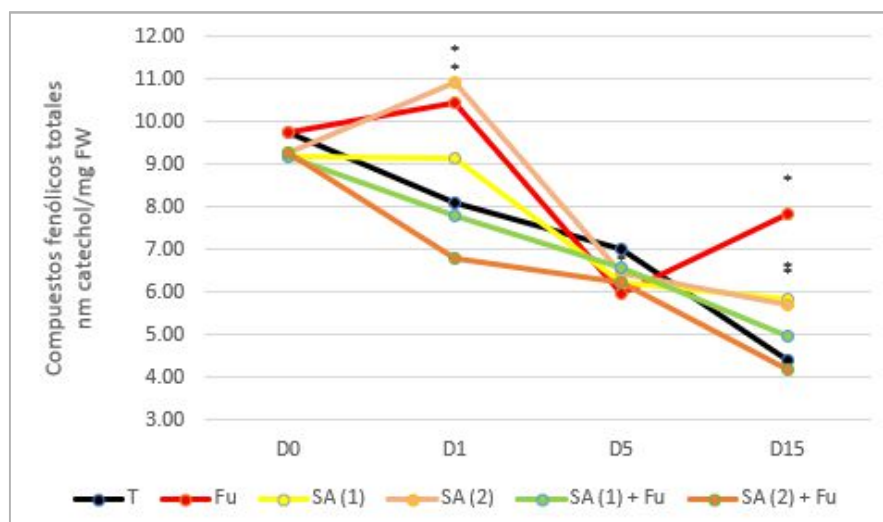


Figura 21. Acumulación de compuestos fenólicos totales en hojas de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitors ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. SA(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μM, SA(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μM, SA(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μM e inoculadas con *Fusarium* sp., SA(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 500 μM e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp.

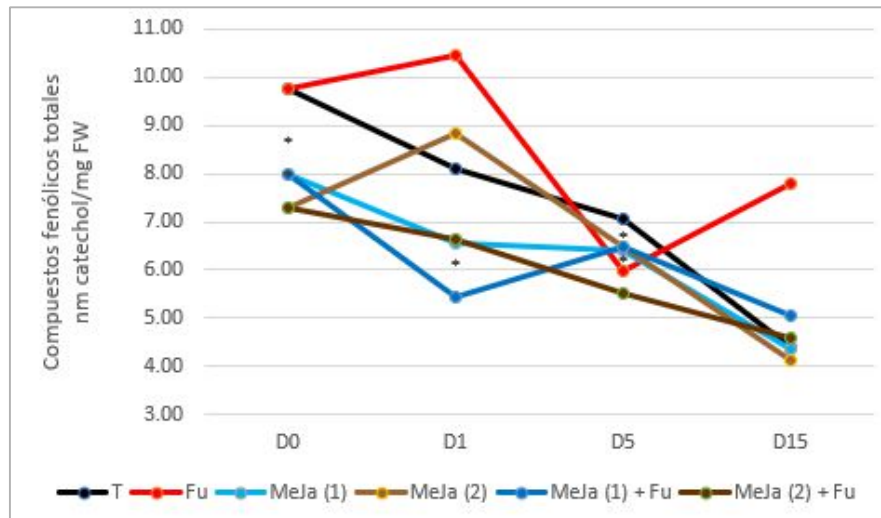


Figura 22. Acumulación de compuestos fenólicos totales en hojas de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. MeJa(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M, MeJa(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M, MeJa(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., MeJa(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

En el caso de los tallos (Figuras 23 y 24), se destacó un aumento en la acumulación de compuestos fenólicos tras el tratamiento con ácido salicílico en la menor dosis. Un día después del inóculo (D1), la cantidad de compuestos fenólicos totales disminuyó en diversos tratamientos con elicitores, en la mayoría de forma significativa, con la excepción del jasmonato de metilo sin inóculo en ambas dosis y el ácido salicílico en su dosis más alta con inóculo, los cuales no presentaron diferencias con el control. En el día 5 (D5) se observó una tendencia general hacia la disminución, aunque en diversos tratamientos con elicitores se observó mayor cantidad de compuestos fenólicos en comparación al control, con la excepción de los tratamientos de ácido salicílico sin inóculo en la menor dosis, así como los de jasmonato de metilo e inóculo: la mayor dosis presentó significativamente menor cantidad. Al finalizar el experimento se mantuvo la tendencia a la disminución en diversos tratamientos con elicitores, pero aun así dos de ellos presentaron significativamente mayor cantidad de compuestos fenólicos que el control: el ácido salicílico en su dosis más baja sin inóculo, y el jasmonato de metilo en su dosis más baja con inóculo. El mismo caso se observó en el

tratamiento que solamente recibió inóculo, pero no fue tratado con elicitores. Por otro lado, los tratamientos con jasmonato de metilo sin inóculo, el ácido salicílico 500 μM con inóculo y el jasmonato de metilo 500 μM con inóculo exhibieron significativamente menor actividad.

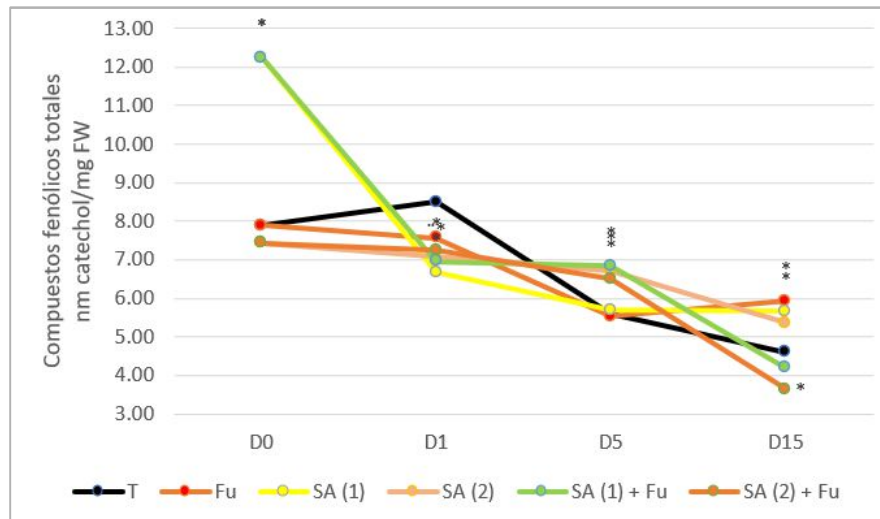


Figura 23. Acumulación de compuestos fenólicos totales en tallos de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. SA(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μM , SA(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μM , SA(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μM e inoculadas con *Fusarium* sp., SA(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 500 μM e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp.

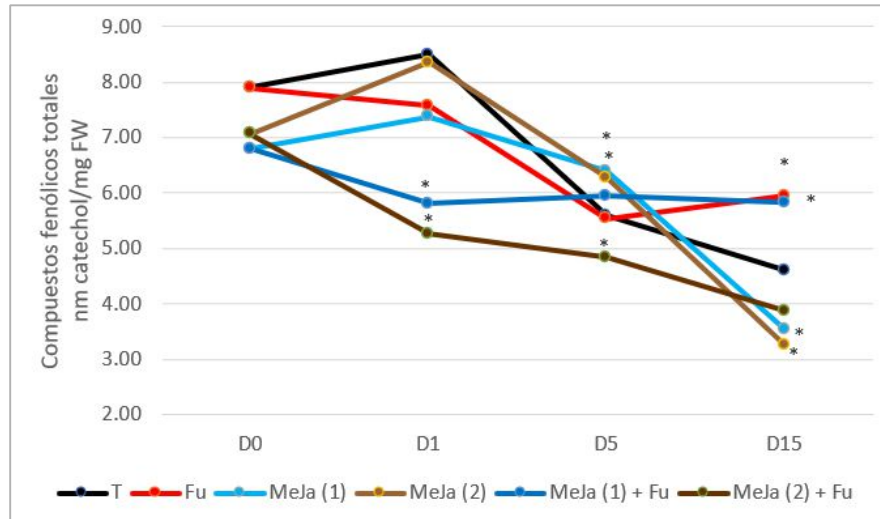


Figura 24. Acumulación de compuestos fenólicos totales en tallos de aguacate. T corresponde a plantas que no recibieron tratamiento con elicitores ni inoculación con *Fusarium* sp. Fu: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. MeJa(1): plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M, MeJa(2): plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M, MeJa(1) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 50 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp., MeJa(2) + Fu: corresponde a plantas tratadas con ácido salicílico 500 μ M e inoculadas con *Fusarium* sp. D0 corresponde al día de la inoculación con *Fusarium* sp., D1, D5 y D5 corresponden respectivamente a 1, 5 y 15 días después de la inoculación de *Fusarium* sp. El símbolo de asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control.

10. CONCLUSIONES

- Se estableció de forma exitosa una metodología de barrenado en plantas de cacao y aguacate, la cual permite estudiar el efecto de un inóculo de *Fusarium* sp. sin derivar en daños severos o muerte de la planta.
- *Fusarium* sp. utilizado no resultó patogénico en cacao y aguacate al no mostrar síntomas de colonización efectiva o daños en las plantas inoculadas.
- El barrenado, aplicación de elicitores e inóculo presentó un efecto diferencial en la actividad enzimática (peroxidasas y β -1,3 glucanasas) y acumulación de compuestos fenólicos totales a nivel local y sistémico en plantas de cacao y aguacate. Esto podría asociarse con la inducción de una respuesta de defensa.
- El uso de elicitores podría representar una alternativa viable la inducción de mecanismos de defensa en plantas, lo que eventualmente podría derivar en una mayor resistencia.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). How plants defend themselves against pathogens. In *Plant Pathology* (pp. 207–248). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047378-9.50012-9>
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Alejandro-Lázaro, A., Azpeitia-Morales, A., Sáenz-Carbonell, L., & Mirafuentes-Hernández, F. (2015). Embriogénesis somática secundaria en el genotipo de cacao (*Theobroma cacao* L.) inifap 1 y su descripción histológica. *Revista Electrónica Nova Scientia*, 7(2)(14), 398–417.
- An, C., & Mou, Z. (2011). Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 53, Issue 6, pp. 412–428). <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x>
- Anil, K., Das, S. N., & Podile, A. R. (2013). Induced defense in plants: A short overview. In *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences* (Vol. 84, Issue 3, pp. 669–679). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0279-2>
- Arruda, R. L., Paz, A. T. S., Bara, M. T. F., Côrtes, M. V. de C. B., de Filippi, M. C. C., & da Conceição, E. C. (2016). An approach on phytoalexins: function, characterization and biosynthesis in plants of the family Poaceae. *Ciencia Rural*, 46(7), 1206–1216. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151164>
- Avendaño-Arrazate, C. H., Villarreal-Fuentes, J. M., Campos-Rojas, E., Gallardo-Méndez, R. A., Mendoza-López, A., Aguirre-Medina, J. F., Sandoval-Esquivez, A., & Espinosa-Zaragoza, S. (2011). *Diagnóstico del cacao en México*. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., & Sakthivel, N. (2012). Plant β -1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. In *Biotechnology Letters* (Vol. 34, Issue 11, pp. 1983–1990). <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1012-6>
- Baysal, Ö., Soylu, E. M., & Soylu, S. (2003). Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, 52(6), 747–753. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2003.00936.x>
- Benhamou, N. (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 1(7).
- Boots, M., & Best, A. (2018). The evolution of constitutive and induced defences to infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1883). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0658>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72).

- Camacho-Moreno, O. I. (2022). *Evaluación de respuesta defensiva en Salix bonplandiana a elicitores ante Fusarium solani proveniente de complejo ambrosial*. Instituto Tecnológico de Tlajomulco.
- Cheong, J. J., & Choi, Y. do. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. In *Trends in Genetics* (Vol. 19, Issue 7, pp. 409–413). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00138-0)
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, · B N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. In *Indian J. Microbiol* (Vol. 47).
- Chowdhary, V., Alooparampil, S., v. Pandya, R., & G. Tank, J. (2022). *Physiological Function of Phenolic Compounds in Plant Defense System*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101131>
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., la Torre, M. I., & Weigend, M. (2012). *Hoja botánica: Cacao, Theobroma cacao L.* Giacomotti Comunicación Gráfica S.A.C. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.31228.44165>
- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox Walnut root stock. *HortScience*, 19(4), 507–509.
- Eskalen, A., Stouthamer, R., Lynch, S. C., Rugman-Jones, P. F., Twizeyimana, M., Gonzalez, A., & Thibault, T. (2013). Host range of *Fusarium dieback* and its ambrosia beetle (Coleoptera: Scolytinae) vector in southern California. *Plant Disease*, 97(7), 938–951. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1026-RE>
- Flynn, W. P., Glicenstein, L. J., & Fritz, P. J. (1990). *Theobroma cacao L.*: an axillary bud in vitro propagation procedure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20, 111–117.
- Freeman, & Beattie, G. A. (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2008-0226-01>
- Freeman, S., Sharon, M., Maymon, M., Mendel, Z., Protasov, A., Aoki, T., Eskalen, A., & O'Donnell, K. (2013). *Fusarium euwallaceae* sp. nov.--a symbiotic fungus of *Euwallacea* sp., an invasive ambrosia beetle in Israel and California. *Mycologia*, 105(6), 1595–1606. <https://doi.org/10.3852/13-066>
- Garcia, C., Marelli, J. P., Motamayor, J. C., & Villela, C. (2018). Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao L.* In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1815, pp. 227–245). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_15
- García-Avila, C. D. J., Trujillo-Arriaga, F. J., López-Buenfil, J. A., González-Gómez, R., Carrillo, D., Cruz, L. F., Ruiz-Galván, I., Quezada-Salinas, A., & Acevedo-Reyes, N. (2016). First Report of *Euwallacea nr. Fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist*, 99(3), 555–556. <https://doi.org/10.1653/024.099.0335>
- Guiltinan, M., & Maximova, S. (2010). *Integrated system for vegetative propagation of cacao Protocol book (2.1)*. The Pennsylvania State University.

- Gupta, P., Ravi, I., & Sharma, V. (2013). Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Journal of Plant Interactions*, 8(2), 155–161. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.679705>
- Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. In *Annals of Botany* (Vol. 89, Issue 5, pp. 503–512). <https://doi.org/10.1093/aob/mcf076>
- Infocacao. (2016). “*Mal del machete*”, una enfermedad del cacao que no se debe descuidar (Issue 11). Infocacao. http://www.fhia.org.hn/downloads/cacao_pdfs/infocacao/InfoCacao_No11_Dic_2016.pdf
- Jain, D., & Khurana, J. P. (2018). Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (pp. 265–28). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12
- Jeandet, P. (2015). Phytoalexins: Current progress and future prospects. In *Molecules* (Vol. 20, Issue 2, pp. 2770–2774). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules20022770>
- Jiang, D., & Yan, S. (2018). MeJA is more effective than JA in inducing defense responses in *Larix olgensis*. *Arthropod-Plant Interactions*, 12(1), 49–56. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9551-3>
- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially feasible micro- propagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc*, 30, 421–427.
- Mandal, S., Kar, I., Mukherjee, A. K., & Acharya, P. (2013). Elicitor-induced defense responses in *Solanum lycopersicum* against *Ralstonia solanacearum*. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/561056>
- Marais, L. J. (2004). Avocado Diseases of Major Importance Worldwide and their Management. In S. A. M. H. Naqvi (Ed.), *Diseases of Fruits and Vegetables: Vol. II* (pp. 1–36). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/1-4020-2607-2_1
- Marelli, J. P., Guest, D. I., Bailey, B. A., Evans, H. C., Brown, J. K., Junaid, M., Barreto, R. W., Lisboa, D. O., & Puig, A. S. (2019). Chocolate under threat from old and new cacao diseases. In *Phytopathology* (Vol. 109, Issue 8, pp. 1331–1343). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0477-RVW>
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>

- Mendel, Z., Protasov, A., Maoz, Y., Maymon, M., Miller, G., Elazar, M., & Freeman, S. (2017). The role of *Euwallacea* nr. *forficatus* (Coleoptera: Scolytinae) in the wilt syndrome of avocado trees in Israel. *Phytoparasitica*, *45*(3), 341–359. <https://doi.org/10.1007/s12600-017-0598-6>
- Mendel, Z., Protasov, A., Sharon, M., Zveibil, A., Yehuda, S. ben, O'Donnell, K., Rabaglia, R., Wysoki, M., & Freeman, S. (2012). An Asian ambrosia beetle *Euwallacea forficatus* and its novel symbiotic fungus *Fusarium* sp. pose a serious threat to the Israeli avocado industry. *Phytoparasitica*, *40*(3), 235–238. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0223-7>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473–497.
- Na, F., Carrillo, J. D., Mayorquin, J. S., Ndinga-Muniania, C., Stajich, J. E., Stouthamer, R., Huang, Y. T., Lin, Y. T., Chen, C. Y., & Eskalen, A. (2018). Two novel fungal symbionts *Fusarium kuroshium* sp. Nov. and *graphium kuroshium* sp. nov. of kuroshio shot hole borer (*euwallacea* sp. nr. *forficatus*) cause fusarium dieback on woody host species in California. *Plant Disease*, *102*(6), 1154–1164. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1042-RE>
- Ngezahayo, F., & Liu, B. (2014). Axillary Bud Proliferation Approach for Plant Biodiversity Conservation and Restoration. *International Journal of Biodiversity*, *2014*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/727025>
- Oliveira, J. T. A., Barreto, A. L. H., Vasconcelos, I. M., Eloy, Y. R. G., Gondin, D. M. F., Fernandes, C. F., & Freire-Filho, F. R. (2014). Role of Antioxidant Enzymes, Hydrogen Peroxide and PRProteins in the Compatible and Incompatible Interactions of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Genotypes with the Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, *02*(03). <https://doi.org/10.4172/2329-955x.1000131>
- Patel, Z. M., Mahapatra, R., & Jampala, S. S. M. (2020). Role of fungal elicitors in plant defense mechanism. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture* (pp. 143–158). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818469-1.00012-2>
- Pérez-De La Cruz, M., Equihua-Martínez, A., Romero-Nápoles, J., Sánchez-Soto, S., García-López, E., & Bravo-Mojica, H. (2009). Escolítidos (Coleoptera: Scolytidae) Asociados al Agroecosistema Cacao en Tabasco, México. *Neotropical Entomology*, *38*(5), 602–609.
- Phillips-Mora, W., & Cerda-Bustillos, R. (2009). *Catálogo Enfermedades del cacao en Centroamérica* (E. Somarriba & S. Orozco, Eds.; 1st ed.). CATIE.
- Quiñones Gálvez, J., Reinaldo Trujillo Sánchez, C., Capdesuñer Ruiz, Y., Yemeys Quirós Molina, T., & Martha Hernández de la Torre, D. C. (2013). Antioxidant potential of phenolic extracts of *Theobroma cacao* L. (cocoa). In *Revista Cubana de Plantas Medicinales* (Vol. 18, Issue 2). <http://scielo.sld.cu>
- Rangel-Sánchez, G., Castro-Mercado, E., & García-Pineda, E. (2014). Avocado roots treated with salicylic acid produce phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl), a compound with antifungal

- activity. *Journal of Plant Physiology*, 171(3–4), 189–198.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.07.004>
- Resende, M. L. V., Nojosa, G. B. A., Cavalcanti, L. S., Aguilar, M. A. G., Silva, L. H. C. P., Perez, J. O., Andrade, G. C. G., Carvalho, G. A., & Castro, R. M. (2002). Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology*, 51(5), 621–628. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00754.x>
- Salazar-Vega, K. S., Pillalaza Montalvo, S. A., & Vaca-Suquillo, I. (2022). The Effect of Ascorbic and Citric Acids in the in Vitro Establishment of *Solanum betaceum* to Prevent Phenolic Oxidation. In Á. , Rocha, P. C. López-López, & J. P. Salgado-Guerrero (Eds.), *Communication, Smart Technologies and Innovation for Society . Smart Innovation, Systems and Technologies* (Vol. 252, pp. 199–205). https://doi.org/10.1007/978-981-16-4126-8_19
- Schweiger, R., Heise, A. M., Persicke, M., & Müller, C. (2014). Interactions between the jasmonic and salicylic acid pathway modulate the plant metabolome and affect herbivores of different feeding types. *Plant, Cell and Environment*, 37(7), 1574–1585.
<https://doi.org/10.1111/pce.12257>
- SENASICA. (2017, March 3). *México: Primer productor mundial de aguacate*.
<https://www.gob.mx/senasica/articulos/mexico-primer-productor-mundial-de-aguacate?idiom=es>
- SENASICA. (2019). *Complejo Escarabajo Barrenador Polífago Euiwallacea sp. - Fusarium euwallaceae*. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria - Dirección General de Sanidad Vegetal - Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria.
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. *ISRN Biochemistry*, 2013, 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2013/762412>
- Thorpe, T. A., & Stasolla, C. (2001). Somatic embryogenesis. In S. S. Bhojwani & W. Y. Soh (Eds.), *Current Trend in the Embryology of Angiosperms* (pp. 279–336). Kluwer Academic Publishers.
- Turner, J. G., Ellis, C., & Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14(SUPPL.). <https://doi.org/10.1105/tpc.000679>
- van den Berg, N., du Toit, M., Morgan, S. W., Fourie, G., & de Beer, Z. W. (2019). First Report of *Fusarium euwallaceae* causing necrotic lesions on *Persea americana* in South Africa. *Plant Disease*, 103(7).
- Velásquez-Salazar, R., Sandrea, Y., Betancourt, C., Mata, J., & García, F. (2006). Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolanos. *Agronomía Trop.*, 56(1), 61–74.

War, A. R., Paulraj, M. G., War, M. Y., & Ignacimuthu, S. (2011). Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*cicer arietinum* l). *Plant Signaling and Behavior*, 6(11), 1787–1792. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17685>

12. APORTES DEL PROYECTO

- Dos estancias académicas en INIFAP Campus Experimental Rosario Izapa (Tuxtla Chico, Chiapas): febrero y abril, 2021.
- Capítulo “Biofábricas para plantas *in vitro*” en Manual de prácticas de laboratorio para la micropropagación de plantas.
ISBN para la edición impresa: 978-607-8734-33-7
ISBN para la edición electrónica: 978-607-8734-34-4
- Participación con cartel “Efecto de elicitores en respuesta a infección por *Fusarium* sp. en aguacate” en Congreso Redbio 2022 (Mérida, Yucatán).