



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Evaluación fisiológica de plantas de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en la respuesta al estrés por anegamiento e infección de *Fusarium oxysporum***

**Andrea Del Pilar Villarreal Navarrete**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2013



# **Evaluación fisiológica de plantas de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en la respuesta al estrés por anegamiento e infección de *Fusarium oxysporum*.**

**Andrea del Pilar Villarreal Navarrete**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Agrarias, Línea Fisiología de cultivos**

Director:

Dr. Sci. Agr., Gerhard Fischer  
Facultad de Ciencias Agrarias

Codirectora:

Dr. Sci., Luz Marina Melgarejo Muñoz  
Departamento de Biología – Facultad de Ciencias

Asesora:

Ph. D., Lilliana María Hoyos Carvajal  
Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Bogotá, Colombia

2013



*A mis padres*

*¡Virgen María, sin pecado concebida, rogad  
por nosotros que recurrimos a vos!*

*Amen*



## **Agradecimientos**

Agradezco a la División de investigaciones Bogotá – DIB, Universidad Nacional de Colombia por la financiación de este trabajo, y a la facultad de agronomía de esta misma institución por su apoyo y educación.

A la profesora Lilliana María Hoyos por su confianza y asesoría

A mi codirectora de tesis, la profesora Luz Marina Melgarejo por su asesoría, por el préstamo de su laboratorio, invernadero y equipos

A mi director de tesis, profesor Gerhard Fischer por su confianza, consejos oportunos y asesoría.

A los encargados de la clínica de plantas y del laboratorio de fitopatología de la facultad de agronomía Jesús Alberto León y Wadith de León por su colaboración en la identificación y manejo del patógeno y procesos histopatológicos.

A la Bióloga Laura Victoria Pérez por su asesoría en el manejo de equipos de mediciones fisiológicas.

A la técnica en química Yuli Paola Valencia por su colaboración y compañía durante mi estancia en el laboratorio de fisiología vegetal del departamento de biología.

Al microbiólogo agrícola Camilo Sanabria por su valiosa colaboración en las etapas de plantulación, posterior asesoría en el manejo del patógeno y por toda su paciencia y cariño.

A mi padre Jorge Villarreal por su apoyo y confianza incondicional, por su amor, comprensión y por su ejemplo de lucha y perseverancia. A mi Madre Pilar Navarrete por su cariño, amistad y por ser mi modelo de mujer y profesional creativa e independiente. A mi hermana Luisa Catalina Villarreal, por su apoyo y ejemplo de fuerza y profesionalismo.

A Dios y a la virgen María por acompañarme en cada paso y por darme la fortuna de haber crecido en una familia hermosa con abuelos fraternos y ejemplares, tíos y tías amorosos y primos traviesos y llenos de sueños.





## Resumen

La uchuva (*Physalis peruviana*), planta de gran importancia económica para Colombia, es atacada por patógenos como *Fusarium oxysporum* y por cambios en los regímenes climáticos causados por el calentamiento global. Esto causa grandes afectaciones a su sistema de producción. Esta investigación evaluó el efecto del anegamiento continuo en la respuesta fisiológica y patológica de las plantas de uchuva, por medio del seguimiento de las tasas fotosintéticas, crecimiento, fluorescencia de la clorofila a y contenidos de prolina y azúcares reductores. Plantas de uchuva de 4 meses, se sometieron a 3 tratamientos (inundación durante 6 días continuos, inoculación con *F. oxysporum* e inoculación con el patógeno con posterior inundación) y control absoluto. Las plantas de uchuva se recuperaron pasados 6 días después de la inundación (ddi) tras una disminución en sus tasas fotosintéticas del 27,14%. Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* detuvieron el crecimiento y las tasas fotosintéticas se redujeron entre un 30 y 50%. El período de incubación para el patógeno en este tratamiento fue de 18 ddi. La inundación produjo en la planta un efecto adverso frente a la inoculación con el patógeno, por lo que en el tratamiento con estos dos tipos de estrés se generó en la planta una pudrición del cuello de raíz lo que llevó a muerte de la planta en 30 días, producto de la condición de hipoxia y al probable ingreso de otros microorganismos al sistema. Los primeros síntomas de la marchitez vascular en plantas inundadas e inoculadas se presentaron a los 8 ddi y la recuperación de funciones biológicas al retirar el anegamiento, como sucedió en las plantas que no fueron inoculadas, fue imposible. La disminución en las tasas fotosintéticas en estas últimas plantas alcanzó el 80%. A nivel bioquímico fue evidente la acumulación de prolina bajo el panorama de inoculación con *F. oxysporum* y la actividad de azúcares en hojas. Es interesante notar como el taponamiento de los haces vasculares en las plantas afectadas con el patógeno se dan de manera simultánea a la respuesta fisiológica siendo esta respuesta más evidente en plantas anegadas e inoculadas. Estos datos se convierten en una herramienta importante para la toma de decisiones, en el plan de acción a seguir en campo tras eventos de estrés biótico y abiótico.

**Palabras clave:** Tasa de asimilación neta, fluorescencia de la clorofila a, prolina, estrés biótico, estrés abiótico, uchuva, *F. oxysporum*.

## Abstract

The cape gooseberry (*Physalis peruviana*), a plant of high economic importance to Colombia, is attacked by pathogens such as *Fusarium oxysporum* and suffers from changes in climate patterns caused by global warming. This causes great damages to its production system. This research evaluated the effect of continuous flooding in physiological and pathological response of cape gooseberry plants, by monitoring photosynthetic rates, growth, chlorophyll fluorescence and contents of proline and total and reducing sugars. Cape gooseberry plants of 4 months, subjected to 3 treatments (flooding for 6 consecutive days, inoculation with *F. oxysporum* and inoculation with the pathogen with subsequent flooding) and absolute control. Cape gooseberry plants recover after 6 days of flooding (daf) after a decline in photosynthetic rates of 27.14%. Plants inoculated with *F. oxysporum* stopped the growth and photosynthetic rates were reduced by 30 to 50%. The incubation period for the pathogen in this treatment was 18 ddi. Flooding occurred on the ground an adverse effect against challenge with the pathogen, so that treatment with these two types of stress generated in the plant a rotting root collar leading to plant death at 30 days, due to the condition of hypoxia and the likely entry of other microorganisms to the system. The first symptoms of vascular wilt of flooded and inoculated plants were observed at 8 daf and recovery of biological functions by removing waterlogging, as in the plants that were not inoculated, was impossible. The decrease in photosynthetic rates in these latter plants reached 80%. At the biochemical level proline accumulation was evident with inoculation with *F. oxysporum* whereas sugars activity in leaves was observed. Interestingly, the plugging of the vascular bundles in the affected plants with the pathogen occurs simultaneously with the physiological response being this response more evident in flooded and inoculated plants. These data becomes an important tool for decision making, the plan of action to follow in field events after biotic and abiotic stresses.

**Keywords:** Net assimilation rate, chlorophyll fluorescence, proline, biotic, abiotic stress, gooseberry, *F. oxysporum*.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Respuesta fisiológica de plantas de uchuva (<i>P. peruviana</i> L.), bajo condición de anegamiento y ataque de <i>F. oxysporum</i> .....</b>	<b>9</b>
1.1    Introducción .....	9
1.2    Metodología .....	14
1.2.1    Material vegetal y ubicación .....	14
1.2.2    Diseño de experimentos y muestreos.....	15
1.2.3    Inundación de las plantas.....	16
1.2.4    Inoculación de plantas de uchuva ( <i>P. peruviana</i> ) con la cepa Map5 de <i>F. oxysporum</i> .....	16
1.2.5    Escalas de evaluación de síntomas.....	18
1.2.6    Parámetros de crecimiento .....	19
1.2.7    Mediciones de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila.....	20
1.3    Resultados.....	20
1.3.1    Variables de crecimiento .....	20
1.3.2    Evolución de los síntomas visuales de estrés por anegamiento y ataque de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	33
1.3.3    Mediciones de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila a.....	35
1.4    Discusión de resultados .....	46
<b>2. Respuesta bioquímica de plantas de uchuva (<i>P. peruviana</i> L.), bajo condición de anegamiento y ataque de <i>F. oxysporum</i> .....</b>	<b>55</b>
2.1    Introducción .....	55
2.2    Metodología .....	58
2.2.1    Diseño de experimentos y muestreo.....	58
2.2.2    Contenidos de prolina en hoja y raíz .....	58
2.2.3    Contenido de azúcares reductores en hoja y raíz .....	59
2.3    Resultados.....	60
2.4    Discusión de resultados .....	63
<b>3. Respuesta anatómica y morfológica de plantas de uchuva (<i>P. peruviana</i> L.), bajo condición de anegamiento y ataque de <i>F. oxysporum</i> .....</b>	<b>69</b>
3.1    Introducción .....	69

3.2	Metodología .....	71
3.2.1	Material vegetal .....	71
3.2.2	Marcha histotécnica.....	71
3.2.3	Aislamientos del patógeno del material vegetal .....	73
3.3	Resultados.....	73
3.3.1	Marcha histotécnica.....	73
3.3.2	Aislamientos del patógeno del material vegetal .....	80
3.4	Discusión de resultados .....	82
<b>4.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>85</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo 1: Análisis físico-químico de suelo.....</b>	<b>91</b>
	<b>Anexo 2: Análisis microbiológico de suelo.....</b>	<b>92</b>
	<b>Anexo 3: Pruebas de patogenicidad .....</b>	<b>94</b>
	<b>Anexo 4. Curvas de luz y diarias .....</b>	<b>97</b>
	<b>Anexo 5. Curvas de calibración .....</b>	<b>102</b>
	<b>Anexo 6. Análisis estadístico para las variables agronómicas .....</b>	<b>104</b>
	<b>Anexo 7. Análisis estadístico para variables de fisiológicas.....</b>	<b>111</b>
	<b>Anexo 8. Análisis estadístico para variables bioquímicas.....</b>	<b>118</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>123</b>

# Introducción

La uchuva es una planta silvestre perteneciente a la familia solanaceae, género *Physalis*, especie *Physalis peruviana* (Fischer y Miranda, 2012). Su centro de origen se ubica en los Andes, específicamente en Perú, de donde se expandió a varias zonas del trópico y subtrópico, distribuyéndose en la actualidad en América y algunas especies en el viejo mundo (Ramírez *et al.*, 2008).

El género *Physalis* incluye de 90 a 100 especies, de las cuales más de la mitad crecen en México, lo que permite establecer como centro de diversidad a este país. La Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, cuenta con colecciones de 220 y 98 accesiones de *Physalis*, respectivamente. Desafortunadamente estos bancos de germoplasma no cuentan con un adecuado sistema de información y además se desconoce la procedencia de algunos de los materiales (Fischer y Miranda, 2012; Ramírez *et al.*, 2008).

Existen más de 80 ecotipos de uchuva a nivel mundial, diferenciables por el porte de la planta, la forma del cáliz, el tamaño, el color y el sabor del fruto. En Colombia se cultiva principalmente el ecotipo Colombia, que se caracteriza por tener una mejor coloración y mayor contenido de azúcares que otros, lo que lo convierte en el ecotipo de mayor demanda por los mercados internacionales (Almanza y Fischer, 1993).

La uchuva (*P. peruviana*) es un frutal que bajo las condiciones climáticas en Colombia crece óptimamente a altitudes entre los 2.300 y 2.800 msnm, pero debido a sus mecanismos de adaptación se encuentra también en distintas condiciones agroecológicas, entre los entre los 1.500 a 3.000 msnm (Fischer y Miranda, 2012; Angulo, 2005). A mayor altitud las plantas de uchuva presentan un porte más bajo, hojas pequeñas y gruesas, lo que permite filtrar la radiación ultravioleta. Debido a las bajas temperaturas el primer pico de cosecha se retrasa y el ciclo de producción es más corto (Fischer, 1995).

La temperatura ambiental óptima para la producción de uchuva, oscila entre los 8 y los 17°C, y la temperatura óptima del suelo entre los 22 y los 29°C (Angulo, 2005a, Fischer, 1995). Al ser la uchuva una planta de crecimiento indeterminado, es necesario que durante todas las etapas del cultivo haya suficiente disponibilidad de agua con precipitaciones anuales entre 1.000 y 2.000 mm. La errática distribución de las lluvias y el exceso de humedad lleva a un crecimiento vegetativo exuberante y a un retraso en la fructificación. El anegamiento causa la muerte del sistema radical y por consiguiente de la planta entera (Fischer y Miranda, 2012).

En la economía colombiana, la uchuva (*Physalis peruviana* L.), ha alcanzado uno de los lugares más importantes en la producción de frutales, debido a sus altos volúmenes de exportación, siendo el segundo fruto exportado después del banano. Desde el año 2001, la uchuva fue incluida en el acuerdo de competitividad de productos hortofrutícolas promisorios del Ministerio de Agricultura Colombiano (Ramírez *et al.*, 2008; Agrocadenas, 2005), y el incremento en su producción ha sido constante, con un aumento en rendimiento a una tasa anual de 19,8% (Agronet, 2009).

Colombia es el mayor productor de uchuva a nivel mundial, seguido por Zimbabwe, Malasia, China, Kenia y Sudáfrica. Las exportaciones anuales promedio de uchuva son de 25 millones de dólares, representados en 1.850 t de fruto fresco, de las cuales más del 95% se destina a la Unión Europea: Holanda (46%), Alemania (26,8%), Gran Bretaña (11,7%) y Francia (7,2%) (Agronet, 2009).

A nivel nacional, el departamento que lidera la producción de uchuva es Boyacá con un área sembrada de 388 ha y rendimientos de 16,3 t ha<sup>-1</sup>. La participación de este departamento en la producción nacional de uchuva constituye el 59% y es seguido por Antioquia y Cundinamarca con el 19,6 y el 8,5%, respectivamente. Es importante anotar que para el año 2007 el departamento de Cundinamarca lideraba la producción nacional, con un área sembrada de 441 ha y un rendimiento de 20,7 t ha<sup>-1</sup>. A partir del 2008, un descenso cercano a las 200 ha de cultivo en Cundinamarca, impactó fuertemente a los agricultores del departamento (Agronet, 2012).

El descenso en el área sembrada en Cundinamarca tiene como causa principal el inadecuado manejo realizado al cultivo, lo que permitió la diseminación de la enfermedad

con mayor impacto para el cultivo de uchuva, el complejo fusariosis o marchitamiento vascular. El aumento en la incidencia y severidad de esta enfermedad, cuyo agente causal es el hongo *Fusarium oxysporum*, generó la pérdida de los cultivos e impidió que nuevas plantaciones se establecieran de forma rentable, desplazando los cultivos hacia el departamento de Boyacá. El uso de material de propagación infectado, la baja rotación de los cultivos, el uso de riego por gravedad, la reutilización del material de tutorado, entre otros factores, permitió que el patógeno sobreviviera en el suelo y aumentara su patogenicidad (Zapata *et al.*, 2005; Bonilla, *et al.*, 2009).

Los cultivos de uchuva pertenecen a pequeños agricultores que siembran entre 3 a 5 ha, alternándolo con otros frutales y hortalizas. Las labores del cultivo son desarrolladas principalmente por el grupo familiar, sin asistencia técnica adecuada, lo que genera altos costos de producción relacionados con mano de obra, tutorado, transporte y uso excesivo de agroquímicos.

Otro de los problemas a los que se ve enfrentado el cultivo de uchuva, son las alteraciones ambientales producto del cambio climático. Dentro de estas alteraciones se encuentran, aumentos en la temperatura, radiación y precipitaciones.

Si bien es cierto que el cultivo de uchuva no se ve fuertemente afectado por inundaciones severas, las condiciones de alta humedad alteran el ciclo de cultivo y la exponen a diferentes ataques de enfermedades y plagas.

El panel intergubernamental de cambio climático (IPCC por sus siglas en inglés), reporta que el aumento en las precipitaciones, causadas principalmente por el calentamiento global resultado de las actividades humanas, tendrá un mayor impacto en las regiones tropicales y en latitudes altas, como consecuencia del aumento del ciclo hidrológico mundial. Debido a esto, los eventos de inundaciones en riberas de ríos y zonas arables serán constantes y devastadoras, principalmente para pequeños agricultores (Bailey-Serres y Voeseneck, 2008).

En Colombia este panorama del cambio climático ligado al efecto del fenómeno de “La Niña”, el cual favorece el incremento de las precipitaciones en gran parte del país en particular sobre las regiones Caribe y Andina, se manifiesta con un aumento significativo

de los niveles de los ríos y con ellos la probabilidad de inundaciones lentas, crecientes súbitas y aumento de los deslizamientos de tierra (Ideam, 2012).

Las regiones Caribe y Andina son áreas de vocación agrícola y pecuaria, por lo que el efecto de las inundaciones y deslizamientos es mucho más grave en el renglón agropecuario. Una de las zonas más afectadas y en donde se concentra casi el 20% de la población colombiana, y un porcentaje considerable de la actividad económica nacional, es la sabana de Bogotá. El país depende de la producción agrícola de esta región y la disminución y pérdida de los productos agrícolas no solo afecta la economía nacional sino que el problema se extiende a diferentes países por la disminución en volúmenes y calidad de productos agropecuarios de exportación tales como leche, papa, flores, entre otros. El panorama de inundaciones y pérdidas en cosechas y animales altera todos los procesos socioeconómicos regionales (Pabón y Torres, 2008).

Varios estudios han reportado que existe susceptibilidad de gran cantidad de plantas al estrés hídrico por inundación, lo cual limita la producción de cultivos tan importantes para la sabana de Bogotá como maíz (*Zea mays* L.), brócoli (*Brassica oleracea*), nabo (*Brassica rapa*), frijol (*Vigna radiata*), crisantemo (*Chrysanthemum* sp.), trigo (*Triticum aestivum* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), cebolla larga (*Allium fistulosum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) y uchuva (*Physalis peruviana*) (Jiménez *et al.*, 2012), pero la gran mayoría de las investigaciones que evalúan la respuesta fisiológica y genética de las plantas ante el inundamiento, se han enfocado en especies tolerantes como *Oryza*, *Rumex* y *Echinochloa* (Bailey-Serres y Voesebeck, 2008).

Las inundaciones no solo traen consecuencias directas sobre los cultivos, también se generan alteraciones en las comunidades microbianas del ambiente y en los ciclos infectivos de los patógenos vegetales, que cambian la incidencia y la severidad de las enfermedades. Para la gran mayoría de los patosistemas es indispensable un análisis de su ciclo de vida bajo este panorama de inundaciones continuas y es clara la necesidad que tienen los productores de conocer estas variantes para buscar soluciones a la problemática presentada.

La excesiva precipitación genera un ambiente en el cual se limita la circulación de oxígeno en el suelo y se afecta la función radical y las plantas se hacen más vulnerables



al ataque patogénico de microorganismos habitantes del suelo. Las condiciones de alta humedad pueden favorecer los ciclos infectivos de algunas bacterias y hongos fitopatógenos como *Phytophthora* spp, *Pythium* spp, *Fusarium* spp, y mildes vellosos. Además de presentarse aumento en las poblaciones de estos patógenos, otros microorganismos menos frecuentes en los sistemas pueden incrementar sus poblaciones o migrar, causando daños en los cultivos (Osorio, 2011).

## JUSTIFICACIÓN

La importancia de la uchuva como cultivo, la susceptibilidad de esta a las inundaciones y a *F. oxysporum* y el desconocimiento tanto de la dinámica del patógeno en anegamiento, como de la respuesta de las plantas de uchuva a estos dos tipos de estrés, hacen indispensable este tipo de investigación en donde se busca determinar la respuesta fisiológica de la uchuva a la inundación y encontrar el momento en el que el aparato fotosintético se ve afectado por el estrés.

En condiciones normales del ambiente los diferentes tipos de estrés a los que se ve enfrentada una planta no llegan solos, sino que suelen aparecer diferentes situaciones de estrés al mismo tiempo (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008). Las inundaciones traen para muchos cultivos problemas sanitarios por plagas y enfermedades. No se conoce cómo están variando las poblaciones de patógenos ni sus ciclos infectivos en la sabana de Bogotá tras las inundaciones, pero para muchos patosistemas el aumento en las precipitaciones aumenta la severidad y la incidencia de las enfermedades. A causa de las condiciones favorables para muchos patógenos, la velocidad de desarrollo de epidemias puede ser mayor. Esto genera la necesidad urgente de desarrollar sistemas de información que permitan de manera oportuna conocer el estado del cultivo y detectar los primeros indicios de las enfermedades (Osorio, 2011).

El análisis de la fisiología de las plantas de uchuva, durante el período de incubación del hongo no se encuentra reportado y tampoco el análisis de esta respuesta en eventos combinados de estrés biótico por la infección del patógeno *F. oxysporum* y de estrés abiótico por exceso de agua.

Las investigaciones afirman que los cambios en la fisiología limitan el crecimiento y el

desarrollo de la planta, así como la calidad del producto y la productividad del cultivo. Estos cambios fisiológicos y su respuesta dependen de la información genética de la especie vegetal. Sin embargo, cuando se trata de estrés biótico y abiótico, la respuesta de las plantas no puede extrapolarse de manera generalizada, así se trate de especies dentro de la misma familia (Cruz *et al.*, 2011).

## **OBJETIVOS**

### **General:**

Evaluar el efecto del anegamiento en la respuesta fisiológica y fitopatológica de las plantas de uchuva.

### **Específicos:**

1. Evaluar la respuesta fisiológica de las plantas de uchuva frente al estrés por anegamiento y ataque de *F. oxysporum*.
2. Evaluar la respuesta bioquímica en acumulación de prolina y azúcares de las plantas de uchuva al estrés por anegamiento y ataque de *F. oxysporum*.
3. Determinar los cambios anatómicos y morfológicos que se dan durante el estrés por anegamiento y ataque de *F. oxysporum*.
4. Evaluar el efecto de la inundación en la severidad de *F. oxysporum*.





# **1. Respuesta fisiológica de plantas de uchuva (*P. peruviana* L.), bajo condición de anegamiento y ataque de *F. oxysporum***

## **1.1 Introducción**

Las plantas a través de los procesos evolutivos han generado diferentes características morfológicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir en determinados ambientes. Esta adaptación está limitada a las condiciones del ambiente en el cual se han desarrollado y en el que se ha permitido la transmisión de su información genética. Pero las condiciones medioambientales no son siempre las mismas y en ocasiones se presentan factores de estrés para los cuales no todas las plantas están genéticamente preparadas para enfrentarlo, como altas o bajas temperaturas, déficit hídrico, altas radiaciones, salinidad, o anaerobiosis generada por encharcamientos o inundaciones, y otros tipos de estrés de procedencia biótica. Estos factores afectan el crecimiento, la productividad, reproducción y los procesos fotosintéticos de la planta (Melgarejo, 2011).

Por estas razones las plantas presentan otros procesos de adaptación transitoria o aclimatación. La aclimatación es la expresión fenotípica de algunas o varias características adaptativas. Estas expresiones pueden darse a través de modificaciones morfológicas, anatómicas o cambios en la fisiológica y bioquímica de la planta. La recuperación o resistencia que presenten las plantas a estas condiciones desfavorables del ambiente determinan el grado de tolerancia a un estrés o combinación de estos (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008).

El estrés por anegamiento, que produce hipoxia en las plantas, es considerado uno de los principales factores ambientales que limitan el crecimiento y la productividad de los cultivos, especialmente en regiones de alta pluviosidad y con pobre drenaje de los suelos

(Li *et al.*, 2010, Ezin *et al.*, 2010). Las pérdidas en producción a causa de las inundaciones pueden ser del 10% y del 40% en casos de anegamiento severo (Ezin *et al.*, 2010).

La inundación es definida como la saturación del suelo con agua alrededor de las raíces (Yiu *et al.*, 2011). Es claro que muchas especies vegetales que crecen en zonas de inundación, se han adaptado a las condiciones de anegamiento para sobrevivir a este evento, pero es importante anotar que no todas las especies que crecen en estas zonas son tolerantes al exceso de agua sino que han generado estrategias de evasión que les permiten completar su ciclo de vida entre eventos de inundación (Bailey-Serres y Voesebeck, 2008).

Otras especies cuentan con rasgos anatómicos y morfológicos que les permiten sobrevivir en condiciones de anegamiento. Esta respuesta es conocida como “síndrome de escape al bajo nivel de oxígeno” (LOES por sus siglas en inglés) (Bailey-Serres y Voesebeck, 2008).

Como respuesta de defensa ante un estrés por anegamiento, la planta induce rápidamente señales de transducción que permiten la adaptación metabólica de la planta. Las especies tolerantes expresan una interacción de adaptaciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas que les permite superar el evento de estrés (Yin *et al.*, 2010). La especie vegetal, la edad de la planta, la duración del anegamiento, la calidad del agua y las condiciones del sitio determinan la tolerancia al estrés (Ezin *et al.*, 2010).

El costo de la respuesta al anegamiento mediante modificaciones morfológicas y anatómicas como lo hacen las plantas con respuesta LOES, es bastante alto, por lo que muchas especies realmente tolerantes crean un metabolismo limitado durante la inundación, disminuyendo el crecimiento y conservando la energía y los carbohidratos (Bailey-Seres y Voesebeck, 2008).

El principal efecto de la inundación es la baja disponibilidad de oxígeno en el suelo, generando hipoxia o anoxia en las plantas, dada la baja solubilidad del oxígeno y la disminución en la difusión de este y otros gases en el agua, dependiendo de la duración

del evento y la tolerancia de la planta a este tipo de deficiencia (Yin *et al.*, 2010; Yiu *et al.*, 2011).

Ante la disminución de oxígeno para la respiración aeróbica en las plantas, se genera un rápido déficit de energía y los procesos dependientes de este tipo de respiración son suprimidos; esta situación genera una alteración en la relación entre raíz y parte aérea, debido principalmente a la inhibición en la asimilación de CO<sub>2</sub> por cierre estomático y la fotosíntesis (Li *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2010).

Los primeros síntomas que expresan las plantas frente al anegamiento son el amarillamiento de las hojas del tercio inferior; luego se muestra epinastia en las hojas del tercio medio, detención en el crecimiento y menor acumulación de materia seca, y finalmente la muerte de la planta. El amarillamiento y el menor crecimiento de las plantas inundadas son un síntoma clásico de la deficiencia en la absorción de nitrógeno (N) y a la traslocación de este dentro de la planta (Ezin *et al.*, 2010).

Los suelos inundados inducen un rápido descenso en las tasas fotosintéticas de la planta, lo cual se correlaciona con la disminución en la fijación de fijación CO<sub>2</sub> resultado del cierre estomático. La disminución en la conductancia estomática (gs) es el factor que principalmente afecta la fotosíntesis neta (A). En especies sensibles la gs y la transpiración (E) disminuyen, pero la concentración de CO<sub>2</sub> intracelular (Ci) se mantiene relativamente estable por un mayor período de tiempo de estrés, indicando que la fotosíntesis es afectada por el intercambio gaseoso. Tras un período considerable de encharcamiento continuo, la gs y E siguen disminuyendo pero la Ci aumenta, indicando que los factores que afectan la A en etapas avanzadas de la respuesta al anegamiento, no son por intercambio gaseoso. En contraste, en especies tolerantes, la gs y E disminuyen con el avance de la inundación y Ci declina fuertemente al final, lo que sugiere que el intercambio de gases es el principal factor limitante de la fotosíntesis (Yin *et al.*, 2010).

El estrés hídrico afecta las plantas a nivel morfológico y fisiológico, generando en las células efectos tales como, acumulación de ácido abscísico (ABA), disminución de la expansión y división celular, ajuste osmótico, acumulación de prolina, fotooxidación de

clorofilas y reducción de actividades enzimáticas. Ante tales eventos, las plantas responden, deteniendo el crecimiento de todos sus órganos, cerrando estomas, disminuyendo las tasas fotosintéticas, acelerando la senescencia, aumentando el aborto floral, incrementando la proporción raíz/parte aérea y removilizando sus reservas de fotoasimilados (Boomsma y Vyn, 2008).

Los bajos niveles de oxígeno en el suelo, producto del encharcamiento, no solo genera estrés en las plantas sino que también altera las poblaciones microbianas y cambia los niveles de nutrientes y la disponibilidad y solubilidad de estos.

Por un lado los microorganismos que son capaces de sobrevivir en ambientes anaeróbicos cambian los aceptores de electrones del oxígeno a otros elementos disponibles en estas condiciones de anegamiento, disminuyendo la cantidad de cationes en el suelo o aumentando la solubilidad de otros que al quedar más disponibles para las plantas, generan toxicidad, como ocurre con el hierro (Fe) y el manganeso (Mn). El N por su lado cambia de su forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a formas gaseosas que se liberan al ambiente disminuyendo su contenido en suelo (Unger *et al.*, 2009).

Adicional a esto las poblaciones microbianas que se encargan de realizar el ciclaje de nutrientes son por lo general comunidades aeróbicas, por lo que este proceso se ve limitado en condiciones de hipoxia (Unger *et al.*, 2009).

Existen muchos patógenos vegetales habitantes del suelo que son facultativos y pueden sobrevivir a condiciones de inundación e incluso volverse más agresivos ante esta condición medioambiental (Osorio, 2011). Dentro de la población microbiana asociada a suelos productores de uchuva, se encuentra presente el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*, agente causal del marchitamiento vascular en estas plantas y cuya incidencia ha generado grandes pérdidas a los agricultores y ha desplazado el cultivo a otras zonas. Puede suponerse que *F. oxysporum* al ser un hongo con características facultativas sobrevive en condiciones de hipoxia o anoxia y aumenta su agresividad.

*F. oxysporum*, es un habitante del suelo, que puede sobrevivir por largos períodos de tiempo (hasta 30 años), gracias a sus particulares estructuras de supervivencia conocidas



como clamidiosporas (Cruz *et al.*, 2011), las cuales también pueden ser transportadas en la semilla, el agua de riego o en las herramientas (Trigiano *et al.*, 2004).

La marchitez vascular producida por el hongo *F. oxysporum*, es una enfermedad que se desarrolla a partir de la germinación de las clamidiosporas que al entrar en contacto con las raíces de la planta, genera un apresorio que penetra la corteza radical y desarrolla un micelio interno en la raíz que avanza hasta alcanzar el sistema vascular, específicamente los conductos xilemáticos (Cruz *et al.*, 2011; Trigiano *et al.*, 2004).

A través del xilema se transportan el agua y las sales minerales. Por su facilidad de transporte, el micelio se disemina rápidamente, avanzando y produciendo dentro del sistema pequeñas esporas conocidas como microconidias, que por su tamaño pueden circular fácilmente por el flujo de agua e invadir toda la planta (Cruz *et al.*, 2011).

Este tipo de agentes fúngicos, disminuyen o bloquean el flujo de agua a través del xilema por obstrucciones físicas de los vasos con las hifas del hongo, secreciones de polisacáridos y enzimas pectinolíticas (Chekali *et al.*, 2011; Trigiano *et al.*, 2004). Una de las señales de respuesta que usa la planta para detener el progreso de la enfermedad, es generar gomas o geles que actúan como barreras físicas que detienen la evolución de la infección. Como consecuencia de esta obstrucción en los haces vasculares, se detiene el suministro de agua y nutrientes y por consiguiente se alteran las funciones metabólicas y el crecimiento, llevando a la planta finalmente a la muerte (Chekali *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2011; Trigiano *et al.*, 2004).

La evolución y agresividad de esta sintomatología cambia de acuerdo a la edad de la planta, la susceptibilidad de esta al patógeno y las condiciones ambientales (Cruz *et al.*, 2011).

Se reporta que ante un ataque fúngico de tipo vascular, se produce una disminución en las tasas de asimilación fotosintética ligado a un descenso en el contenido de agua foliar como consecuencia de la baja absorción de agua producida por la presencia del hongo dentro del sistema vascular y por el taponamiento por tilosas y gomas generado por la misma planta como defensa (Chekali *et al.*, 2011; Pascual *et al.*, 2010). El ascenso limitado del agua a través del xilema por el taponamiento del mismo, genera una

sintomatología muy similar a la que presenta la planta cuando se somete a déficit hídrico (Chekali *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2011).

Debido a la disminución en las tasas fotosintéticas producidas por el estrés hídrico generado por la invasión del patógeno y a que los procesos fotosintéticos son tan sensibles al estrés biótico, el análisis del estado del fotosistema II (PSII) a través de la fluorescencia de la clorofila-a es un buen indicador del impacto sobre la fase de transducción de energía. Estos dos tipos de estrés biótico y abiótico también pueden afectar la fase de fijación de carbono lo que puede analizarse a través de la medición del intercambio de gases (Cruz, 2013).

En este capítulo se evalúa la respuesta fisiológica de las plantas de uchuva frente al estrés por anegamiento y ataque de *F. oxysporum* a través de las mediciones sobre el intercambio gaseoso y la eficiencia máxima potencial del PSII.

## **1.2 Metodología**

### **1.2.1 Material vegetal y ubicación**

Las plantas de uchuva ecotipo Colombia, de 2 meses de edad, fueron adquiridas en el vivero Semigar del municipio de Granada (Cundinamarca). Estas plantas fueron mantenidas en el vivero con riego cada tercer día y una fertilización con fertilizante comercial N-P-K con dos gramos por planta. Las plantas se trasladaron a los invernaderos de fisiología vegetal del departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) y fueron regadas cada tercer día con agua corriente durante un mes. Estas plantas no presentaron ningún problema fitosanitario por lo que no fue necesario realizar ningún control de plagas ni enfermedades.

El invernadero de fisiología vegetal, es un invernadero abierto por un lateral, en estructura de vidrio con tejas plásticas, por lo que la aleatorización de las plantas fue constante, garantizando de esta manera la captación de luz homogénea y la circulación de aire.

El sustrato usado para mantener las plantas de uchuva fue suelo de origen andino del departamento de Cundinamarca, al que se realizó análisis fisicoquímico en el laboratorio de suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias (Anexo 1, Análisis físico-químico de suelos) y análisis microbiológico en la clínica de plantas de la misma facultad (Anexo 2, Análisis microbiológico de suelos). Estos análisis permitieron ver que la calidad físico-química era adecuada con niveles de conductividad eléctrica ligeramente salino que no interfiere con la producción de uchuva y contenidos nutricionales normales para suelos de origen andino, ver anexo 1. Por esta razón y dado que el periodo del ensayo era corto no se realizó una segunda fertilización. Tras el análisis microbiológico se reportó la existencia de cepas de *Fusarium* spp. que tras una siembra previa de plantas de uchuva en este sustrato se descartó la patogenicidad para estas plantas.

Las condiciones ambientales en el invernadero durante el tiempo de experimentación se encontraron bajo los siguientes rangos; la radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés), tuvo un valor promedio de  $147,44 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , temperatura promedio de  $14,67^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de 78,85%. Los datos PAR fueron tomados con el equipo de medición de intercambio de gases por infrarrojo IRGA marca LCIPro+ (ADC, England) en el momento de hacer mediciones de fotosíntesis, y las variables de temperatura y humedad relativa fueron tomadas con la estación microclimática con registrador HOBO y sensor de luz Licor.

### 1.2.2 Diseño de experimentos y muestreos

Para el montaje en invernadero se usó un diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento. Se manejaron 3 tratamientos y un control absoluto consistentes en:

- Tratamiento 1. Inoculación con *F. oxysporum* cepa Map5,
- Tratamiento 2. Inundación de las plantas por 6 días consecutivos,
- Tratamiento 3. Inoculación con *F. oxysporum* cepa Map5 e inundación 48 horas después de la inoculación con el patógeno,
- Control absoluto.

Se usaron 20 plantas por tratamiento para muestreos destructivos de crecimiento, determinaciones bioquímicas y marcha histotécnica y 4 plantas fijas por tratamiento para las mediciones de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila (eficiencia máxima potencial del PSII (Fv/Fm)).

### **1.2.3 Inundación de las plantas**

La inundación de las plantas bajo este tratamiento se realizó utilizando tinajas plásticas selladas de 60\*40\*30 cm. Las plantas sembradas en bolsas individuales con el sustrato suelo+arena fueron ubicadas en las tinajas, colocando 6 plantas por tinaja y se inundaron con agua corriente hasta 5 cm por encima del cuello de raíz (Aldana y García, 2012). Las plantas que fueron sometidas al tratamiento con inoculación y posterior inundación, se colocaron en tinajas de las mismas características bajo el mismo sistema de inundación 48 horas después de haber sido inoculadas. La condición de anegamiento se mantuvo por 6 días continuos.

### **1.2.4 Inoculación de plantas de uchuva (*P. peruviana*) con la cepa Map5 de *F. oxysporum***

Ensayos realizados por Ortiz (2011), revelaron que una cepa de *F. oxysporum* denominada FU y que fue aislada de plantas de uchuva con sintomatología de marchitez vascular en el municipio de Ventaquemada (Boyacá, Colombia), presenta alta patogenicidad sobre plantas de uchuva. Esta cepa que ha sido conservada en el banco de hongos de la clínica de plantas de la facultad de agronomía sede Bogotá, fue contrastada por medio de pruebas de patogenicidad con la cepa Map5 de *F. oxysporum* perteneciente al cepario de hongos del laboratorio de microbiología molecular de la corporación colombiana de investigación agropecuaria, Corpoica, aislada de plantas de uchuva en el municipio de Silvania (Cundinamarca, Colombia), que según estudios de la corporación, presenta patogenicidad en plantas de uchuva.

La patogenicidad de estas dos cepas de *F. oxysporum*, se comprobó a través de pruebas de patogenicidad y postulados de Koch, cuyos procedimientos y resultados son presentados en el anexo 3 (pruebas de patogenicidad) de este documento.

Utilizando la escala ordinal de severidad modificada de Vakalounakis *et al.*, 2005 (referenciado por Ortiz, 2011) presentada en la tabla 1, se evaluó la severidad de las dos cepas en los ensayos de pruebas de patogenicidad. Los resultados de estas pruebas mostraron que la cepa de *F. oxysporum* Map5 es más patogénica sobre las plantas de uchuva, con períodos de incubación más cortos que la cepa FU y una mortalidad del 100% de las plantas.

**Tabla 1-1.** Escala ordinal de severidad modificada de Vakalounakis *et al.* (2005) (referenciado por Ortiz, 2011).

CLASE	DESCRIPCIÓN
0	No hay síntomas
1	Ligera a moderada marchitez, clorosis
2	Severa marchitez, con decoloración en tallo, defoliación
3	Muerte de las plantas

La cepa Map5 de *F. oxysporum* fue conservada en medio PDA con adición de 1 gramo por litro de medio del antibiótico cloranfenicol a 27°C en el laboratorio de microbiología de la facultad de agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. Para la preparación del inóculo se siguió la metodología usada por Ortiz (2011), tomando 3 discos de medio PDA con micelio joven por cada 100 ml de extracto de malta líquido en un erlenmeyer de 250 ml. El medio se dejó en agitación constante a 125 rpm por 5 días a 25°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se realizó el conteo de las microconidias en una cámara de Neubauer, dando un total de 23.200.000 conidias ml<sup>-1</sup> para la cepa Map5. Con este resultado se preparó el inóculo teniendo en cuenta que la concentración óptima para realizar la inoculación de las plantas de uchuva es de 1x10<sup>6</sup> con ml<sup>-1</sup> (Ortiz, 2011).

Siguiendo el protocolo estandarizado por Ortiz (2011), se inocularon las raíces de las plantas sumergiéndolas en 30 ml de inóculo por 2 minutos. La modificación en el volumen

original que era de 15 ml, se realizó, dado que las plantas tenían una edad de 3 meses y el volumen de raíces era mayor que el que encontró Ortiz en el momento de la inoculación. La raíz de las plantas control y las que iban a ser inundadas sin la inoculación de *F. oxysporum* fueron sumergidas en agua destilada estéril. Como ya se mencionó, las plantas que serían inundadas después de la inoculación se mantuvieron 48 horas a capacidad de campo antes de someterlas al anegamiento.

### 1.2.5 Escalas de evaluación de síntomas

Los síntomas de estrés por inundación se evalúan de acuerdo a la escala modificada de Yeboah *et al.* (2008) (Tabla 2).

**Tabla 1-2.** Escala de síntomas para estrés por anegamiento, modificada de Yeboah *et al.* (2008) y tomado de Ezin *et al.* (2010).

ESCALA	DESCRIPCIÓN
5	Planta verde sana
4	Margen de las hojas onduladas
3	Hojas entre la base y la mitad onduladas
2	74-50% de hojas cloróticas de la punta hacia la mitad
1	100-75% de hojas cloróticas de la punta a la base
0	Planta muerta

Esta escala junto con la escala ordinal para la evaluación de severidad de *Fusarium* (modificada de Vakalounakis *et al.*, 2005) presentada en la tabla 1, se fusionaron, generando así una nueva tabla de síntomas para la evaluación de los tres tratamientos y el control de este ensayo. La escala de síntomas para ataque de *Fusarium* sp. y anegamiento, se presenta en la tabla 3.

**Tabla 1-3.** Tabla de síntomas de anegamiento y ataque de *Fusarium* sp. (modificada de Yeboah *et al.*, 2008 y Vakalounakis *et al.*, 2005). Fusión de las escalas de síntomas para estrés por anegamiento de Yeboah *et al.* (2008 y la escala ordinal de severidad de *Fusarium* sp. de Vakalounakis *et al.* (2005).

CLASE	DESCRIPCIÓN
5	Planta verde sana, no hay síntomas
4	Márgenes de las hojas apicales onduladas
3	Ondulamiento en todas las hojas de la planta y 50-75% de hojas cloróticas de la base hacia la mitad. Ligera a moderada marchitez.
2	75-100% de clorosis en hojas
1	Severa marchitez con decoloración en tallo, defoliación
0	Planta muerta

### 1.2.6 Parámetros de crecimiento

Se realizaron muestreos destructivos los días 0, 6, 8, 18, 24 y 31 después de la inoculación (ddi), tomando tres plantas por tratamiento como réplicas biológicas. En estas plantas se tomaron variables de peso fresco y seco de raíz, tallo y hojas tras someter el material a una temperatura de 75°C por 72 horas; se midió el área foliar usando el medidor de área foliar Portable area meter, model Li 3000A marca LICOR; longitud de raíz, altura de la planta, número de hojas y diámetro del cuello de raíz. Los datos de peso seco de la planta y área foliar fueron sometidos a un análisis funcional, usando el paquete estadístico SAS 9.0, generando análisis funcional de peso seco foliar y total y tasas de crecimiento.

### **1.2.7 Mediciones de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila**

Tras varios estudios que han analizado la respuesta fotosintética de las plantas bajo distintos escenarios de estrés biótico y abiótico se ha determinado que las mejores técnicas de medición del desempeño del aparato fotosintético incluyen el análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila-a del PSII, con mediciones simultáneas del intercambio de gases o imágenes térmicas (Baker, 2008).

Las mediciones de intercambio de gases para cada tratamiento se tomaron en 4 plantas marcadas desde el inicio del experimento y que fueron aleatorizadas en el espacio durante el período del ensayo. Estas mediciones se realizaron entre las 9:00 y las 11:00 de la mañana los días 0, 4, 6, 8, 12, 18, 24 y 31 ddi. La hora de medición se determinó con las curvas diarias realizadas previamente (anexo 4.), que revelaron que el punto de máxima fotosíntesis diaria en la uchuva es a las 10:00 a.m; adicionalmente se realizaron curvas de luz con el fin de determinar el punto de saturación luminoso.

La fluorescencia de la clorofila se midió con ayuda del fluorómetro no modulado (Handy pea de Hansatech, Inglaterra), mediante muestreo no destructivo adaptando las plantas a la oscuridad durante media hora, colocándolas en el cuarto oscuro del laboratorio de fisiología vegetal del departamento de biología. Se tomaron cuatro hojas por planta y dos puntos por hoja para realizar las mediciones a un flujo fotónico de 3.000  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  con un flash de luz de 30 segundos de duración.

## **1.3 Resultados**

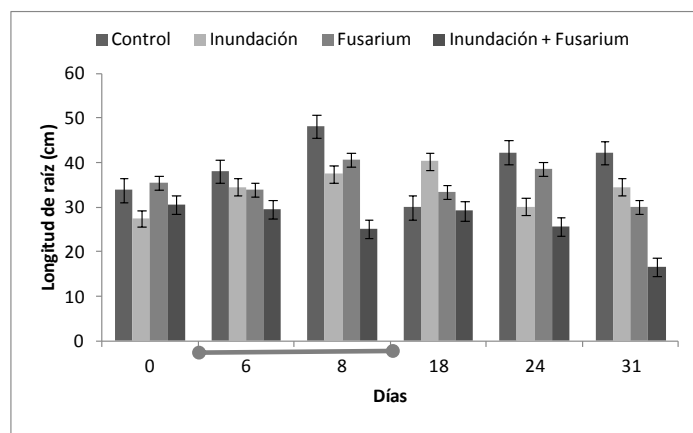
### **1.3.1 Variables de crecimiento**

Las plantas de uchuva sometidas a inundación y ataque por *F. oxysporum* fueron observadas a través del tiempo mediante muestreos destructivos que permitieron la medición de diferentes parámetros de crecimiento y la estimación de las tasas de crecimiento basados en un análisis funcional.



Dado que tanto el patógeno como el anegamiento afecta directamente la raíz de las plantas, variables como la longitud y el peso seco de raíz y el diámetro del cuello de raíz, nos permiten determinar el efecto de estos dos tipos de estrés y la respuesta de la raíz en cuanto a crecimiento.

Los resultados obtenidos en longitud de raíz son muy variables a través del tiempo de observación. Esta variación en los datos puede deberse principalmente al hecho de que por tratarse de un muestreo destructivo, las raíces sufren un severo daño mecánico por la eliminación del suelo en el que está contenido el sistema radical de la planta. Sin embargo, se encontró que la longitud de estas raíces al final del período de evaluación en los tratamientos con presencia de patógeno, es menor a la reportada al inicio del ensayo, con reducciones de 5 cm para el caso de la inoculación con el patógeno y reducciones de hasta 15 cm en las plantas inoculadas e inundadas, como se puede observar en la figura 1-1. De igual manera las reducciones en los tratamientos de inoculación y en el de inoculación e inundación para el día 31 ddi, las reducciones son de 10 y 24 cm respectivamente con respecto al control que alcanzó para esta fecha una longitud de 42,17 cm. Aunque la respuesta es variable a través del tiempo, las plantas control y con inundación sin el patógeno, mantienen una longitud con valores superiores a los tratamientos que contemplan la presencia del patógeno.



**Figura 1-1:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre la longitud de raíz de plantas de uchuva. La línea gris por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar.

Las diferencias estadísticas realizadas a través de las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 6, numeral 6.1), muestran que existe diferencia estadística entre el control y los tratamientos de inundación y el de inoculación con el patógeno frente al tratamiento de la inoculación más la inundación.

La acumulación de biomasa en la raíz de uchuva, medida como el peso seco de esta, es evidencia del crecimiento estable de las plantas control durante el periodo de evaluación del ensayo. En las plantas del tratamiento con el patógeno la disminución en peso es constante, alcanzando su pico máximo de acumulación hacia el día 8 ddi con 1,86 gramos de materia seca y disminuye en 0,65 g hacia el final del ensayo. En las plantas sometidas a inundación y ataque del patógeno hay una ganancia en peso en los primeros días del ensayo con una acumulación máxima de 1,66 gramos en promedio para el día 8 ddi, hasta el momento de ser retirada la condición de inundación, momento en el cual la disminución del peso es drástica con reducciones del 74%, manteniéndose constante hasta el final de la evaluación. En el tratamiento de inundación la biomasa de la raíz aumenta de 1,29 a 1,45 g de materia seca entre los días 0 a 8 ddi, hasta el momento de ser retirada el agua, para descender en un 26% a valores de 1,01 g al eliminar el exceso de este elemento y mantiene estable sus valores hasta el final del ensayo con variaciones en más o menos 0,10 g. Esta tendencia constante y en relativo aumento del peso seco de la raíz de las plantas inundadas, puede considerarse como una recuperación de las plantas de uchuva frente a un evento de inundación corto como el considerado en el ensayo, pero la recuperación de estas plantas inundadas por 6 días es mucho más rápida y evidente en la parte aérea, como se verá más adelante.

Las diferencias de medianas a través de la prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis (Anexo 6, numeral 6.2), mostraron que al igual que lo sucedido con la longitud de la raíz, el peso seco de las raíces también tuvo diferencias significativas entre el control, los tratamientos de inundación y el de inoculación frente al tratamiento de la inoculación con el patógeno más la inundación. En este último tratamiento, las raíces de las plantas debido al estrés generado por la hipoxia murieron y por el nivel de humedad al final del ensayo, estas se encontraban en descomposición. Por otra parte, las raíces de las plantas en inundación mostraron una leve oxidación de su corteza por la hipoxia temporal a la que se vieron sometidas, pero el corto periodo de anegamiento les permitió

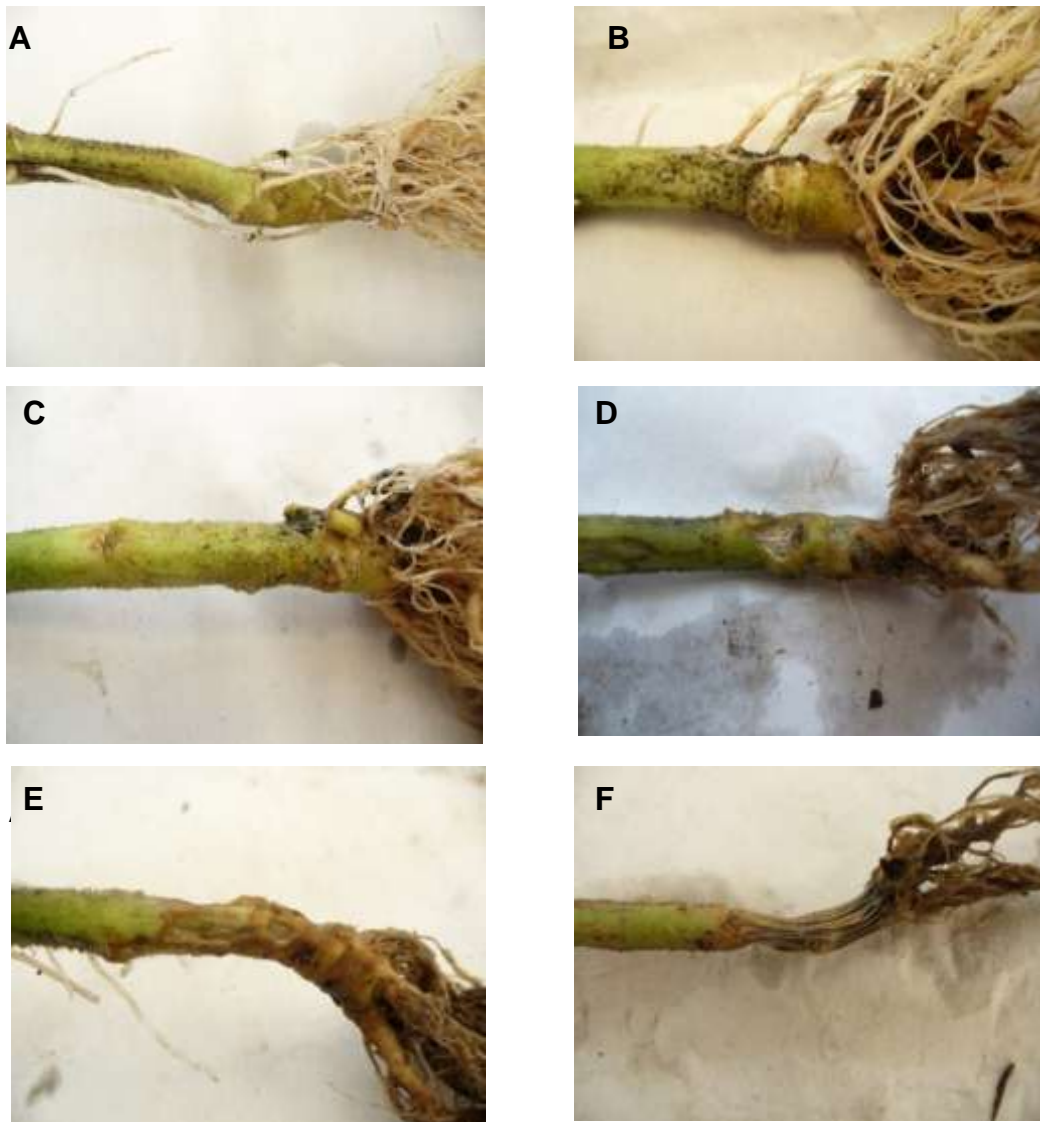
lentamente recuperar sus funciones y por ello las diferencias con el control no son significativas.

Adicional a los resultados obtenidos en biomasa de la raíz y longitud de ésta, se realizó la observación y medición del diámetro del cuello de raíz, siendo esta variable evidencia de la pudrición de tejidos sufrida en las plantas de uchuva a causa de la condición de inundación sumado a la presencia del patógeno.

El diámetro de cuello de raíz, que fue medido con la ayuda de un pie de rey, muestra una pérdida considerable de tejido en las plantas sometidas a inundación tras la inoculación con el patógeno, mostrando desde el día 18 después de inoculación (ddi) una pudrición leve de los tejidos y hacia el día 31 ddi una pudrición total y pérdida del cuello.

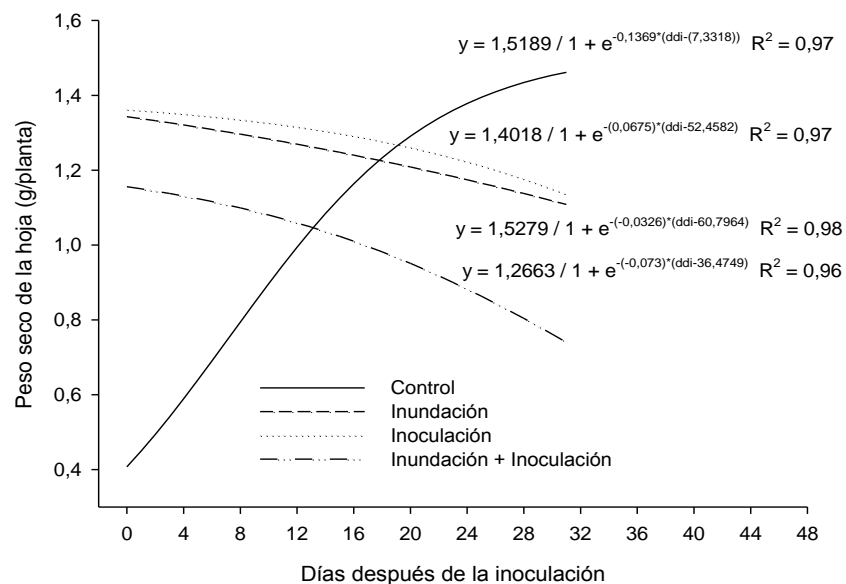
El análisis estadístico sobre esta variable arrojó diferencias significativas entre el control y los tratamientos de inundación y el de inoculación, frente al tratamiento de la inoculación más la inundación según las pruebas de comparación múltiple de Kruskal-Wallis (Anexo 6, numeral 6.3).

En la figura 1-2 puede apreciarse el avance de la pudrición del cuello de raíz en el tratamiento de anegamiento e inoculación con *F. oxysporum* y su comparación con los tratamientos control, inundación y el de inoculación con el patógeno, soportando gráficamente las diferencias significativas encontradas a través de las pruebas estadísticas. Las plantas inoculadas con el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* presentaron una alteración en la consistencia del cuello debido al necrosamiento de los haces vasculares, pero los síntomas externos en la planta no fueron tan evidentes como los del tratamiento que involucraba adicional al hongo el anegamiento. En los tratamientos de inundación continua por 6 días y el control absoluto, el diámetro de cuello de raíz no se vio afectado mostrando valores constantes durante el período de observación.



**Figura 1-2: Pérdida de tejido en cuello de raíz.** Las fotografías A, B y C, plantas control, plantas inoculadas con *F. oxysporum* y plantas inundadas, respectivamente; muestran el cuello sano sin síntomas externos de la enfermedad a los 31 ddi. Las fotografías D, E y F pertenecen a plantas del tratamiento con inoculación de *F. oxysporum* y posterior inundación, desde que empezó a ser visible la pudrición del cuello. Foto D, 18 días después de la inoculación (ddi); Foto E, 26 ddi; Foto F, 31 ddi.

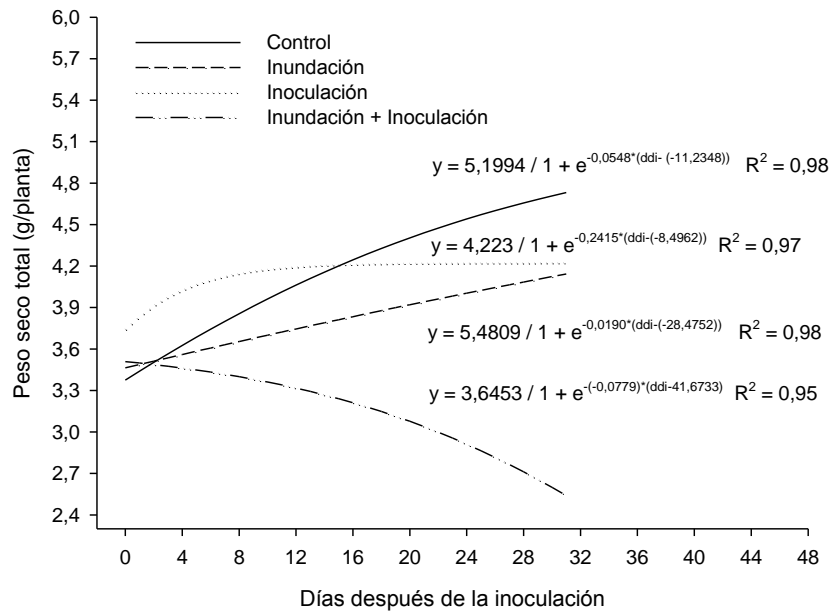
El peso seco de las hojas (Figura 1-3), muestra que las plantas control tuvieron una acumulación de biomasa lenta y constante a través del tiempo, con valores cercanos a 1,50 g de materia seca. Estas plantas siempre mantuvieron acumulaciones superiores a los demás tratamientos. Las plantas con inundación disminuyeron la acumulación de biomasa hasta el día 8 ddi cuando fue retirado el anegamiento, y a partir de allí se inició la recuperación de las plantas de uchuva. El valor final de biomasa alcanzado por las plantas de uchuva bajo inundación fue de 1,26 g, un valor igual al inicial en estas mismas plantas que correspondió a 1,27 g el día 0 ddi. Estos valores indican una detención del crecimiento y su posterior recuperación cuando las plantas fueron retiradas del anegamiento. Las plantas que fueron inoculadas con *F. oxysporum*, ya sean inundadas o no, mostraron una respuesta en aumento en peso seco en los primeros días del ensayo, pero es clara la disminución en esta variable a medida que avanza la enfermedad. La inoculación con *F. oxysporum* genera pérdidas del 20% en la acumulación de biomasa hacia el día 31 ddi, llegando a valores de 1,14 g con respecto al control que acumulo para esa fecha 1,48 g en sus hojas. El impacto de la inoculación sobre la eficiencia en acumulación de biomasa en las hojas se aumenta cuando existe una condición adicional de estrés como lo fue la inundación para el caso de este ensayo, generando pérdidas hasta del 50% en acumulación de materia seca.



**Figura 1-3:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre el peso seco de las hojas de plantas de uchuva.

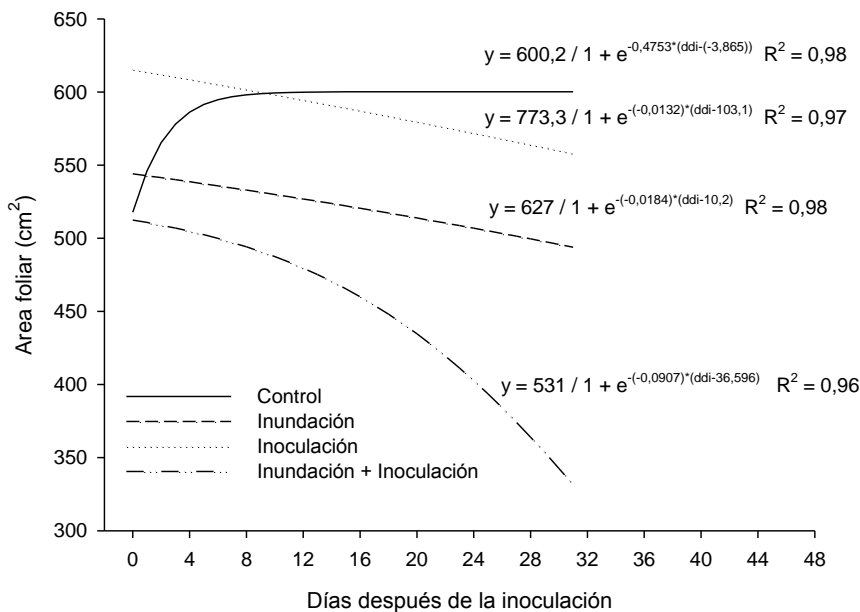
El aumento de biomasa en las plantas de uchuva a través del tiempo del ensayo en los diferentes tratamientos, observable en la figura 1-3, muestra que aunque el análisis estadístico (Anexo 6, numeral 6.4) para esta variable, tras confirmados los supuestos de homogeneidad y normalidad, no muestra diferencias estadísticamente significativas sobre los promedios de los tratamientos, deben notarse las claras diferencias en la tendencia de las curvas de esta figura. El control del experimento, mantuvo un crecimiento logarítmico positivo durante el periodo del ensayo. Las curvas de los demás tratamientos mostraron un comportamiento con tendencia negativa, siendo evidencia de una disminución en la acumulación de biomasa de las hojas.

Las mediciones de acumulación de biomasa en las hojas concuerdan con los valores de la acumulación de biomasa total de las plantas (figura 1-4). Las curvas de los tratamientos en esta variable de medición, siguen con la misma tendencia logarítmica encontrada en las curvas realizadas para las variables de peso seco de las hojas, mostrando que las plantas control mantienen un aumento de biomasa durante el periodo del ensayo alcanzando valores de 4,8 g aproximadamente, siendo superior a los demás tratamientos. El tratamiento de inundación mostró una tendencia de acumulación de biomasa similar a las plantas control pero con valores más bajos, siendo evidencia del impacto que sufrieron las plantas por el anegamiento. El tratamiento de la inoculación, muestra un aumento inicial del peso de sus plantas, pero la detención del mismo aproximadamente a los 12 ddi, tiempo que coincide con el periodo de penetración del patógeno según las observaciones anatómicas (capítulo 3). El tratamiento de la inoculación e inundación, muestra una tendencia negativa durante todo el periodo del ensayo, con disminuciones hasta del 50% en peso seco total con respecto a las plantas control, hacia el día 31 ddi.



**Figura 1-4:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre el peso seco total de plantas de uchuva.

El área foliar de las plantas (figura 1-5), muestra al igual que el peso seco, que las plantas control se mantienen constantes sugiriendo que no existe defoliación en dichas plantas, y que la producción de hojas es adecuada al crecimiento de la planta. Las plantas del tratamiento bajo inundación muestran la misma recuperación después de retirado el anegamiento que se ha venido notando en todas las variables medidas, con una curva de área foliar relativamente constante en el tiempo.



**Figura 1-5:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre el área foliar de plantas de uchuva.

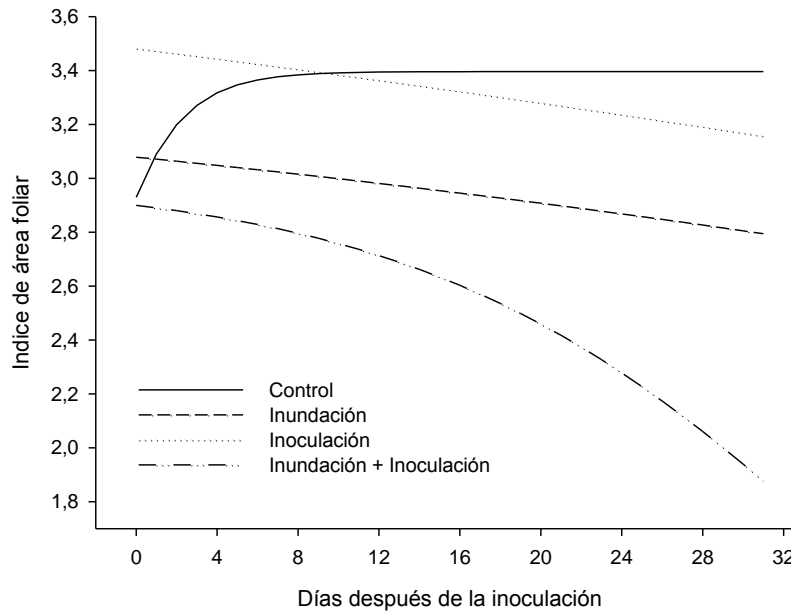
La defoliación que se hizo evidente en los tratamientos, es el síntoma final de una serie de procesos que inician con la pérdida de turgencia, clorosis y finalmente la caída de las hojas. Estos síntomas están incluidos dentro de la escala de síntomas para anegamiento y severidad de *Fusarium* sp. (Tabla 3) (modificada de Yeboah, *et al* 2008; Vakalounakis *et al.*, 2005).

Esta defoliación característica del estrés por anegamiento y síntoma foliar de la presencia de *F. oxysporum* en los haces vasculares de la planta, fue visible de manera temprana en el tratamiento de inoculación más inundación, por lo que las diferencias estadísticamente significativas realizadas a través de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 6, numeral 6.5) se mostraron entre el control y los tratamientos de inundación y el de inoculación, frente al tratamiento de inoculación e inundación.

Los valores máximos de área foliar en el control se encontraron alrededor de 560 a 600 cm<sup>2</sup>, siendo valores muy similares a los observados en las plantas que fueron inundadas y las plantas que fueron inoculadas con el patógeno, las cuales se encontraron de la misma manera oscilando en valores cercanos a los 600 cm<sup>2</sup>. La temprana aparición de

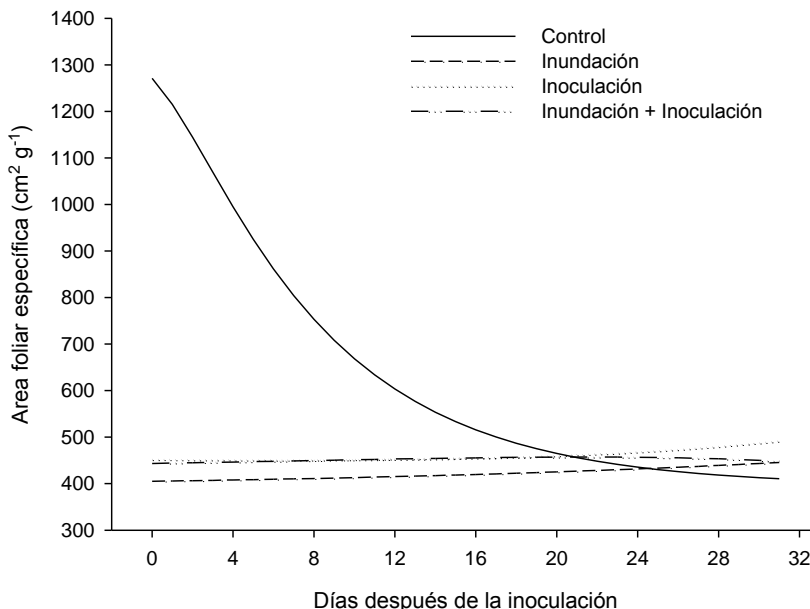


los síntomas de marchitez vascular en las plantas de uchuva sometidas a inundación tras la inoculación con el patógeno, fue la responsable de la defoliación de la planta que después del día 18 ddi, disminuyó su área foliar de 501,64 cm<sup>2</sup> a 417,31 cm<sup>2</sup>, continuando con esta disminución hasta el final del ensayo cuando redujo su área foliar a 327,66 cm<sup>2</sup> en promedio.



**Figura 1-6:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre el índice de área foliar de plantas de uchuva.

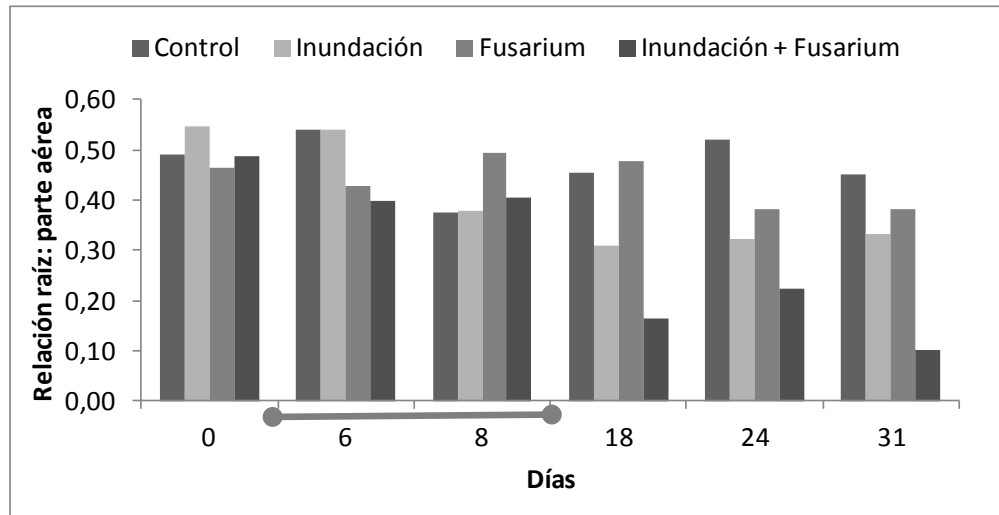
La tendencia de las curvas en la figura 1-6, correspondiente al índice de área foliar (área foliar por unidad de superficie de suelo), es muy similar a la tendencia de las curvas graficadas para el área foliar. Puede observarse que los valores más altos para este índice fueron alcanzados por las plantas control, con valores de 3,4 constantes desde el día 12 ddi. Para los tratamientos el descenso en el índice de área foliar es evidencia de la disminución en área foliar. Esta disminución es mucho más marcada en el tratamiento de inoculación e inundación, en el que el índice final fue de 1,9 aproximadamente.



**Figura 1-7:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre el área foliar específica de plantas de uchuva.

El área foliar específica que mide el grosor de la hoja y representa la superficie foliar por gramo de hoja, representado en la figura 1-7, muestra que el aumento de grosor en las plantas de uchuva control disminuyo con el tiempo debido a que el crecimiento foliar de estas plantas fue representado en expansión foliar. En los tratamientos de inundación, inoculación y en el tratamiento de los dos tipos de estrés, el área foliar específica se muestra constante a través del tiempo.

Finalmente, la relación raíz: parte aérea puede dar una visión de lo sucedido con la planta en su conjunto. Esta relación debe estar en valores cercanos a 1, siendo esta proporción la adecuada por encontrarse la planta en un balance que le permite la mejor captación de luz y un desarrollo radical óptimo para cumplir con sus labores de absorción de nutrientes y soporte. Las plantas control se mantuvieron en un rango alto, que aunque no está cercano a 1, tiene valores de 0,5 aproximadamente, mientras que en los demás tratamientos la disminución en esta relación es notoria (figura 1-8), indicando un mejor desarrollo de su parte aérea en relación a su raíz. El último tratamiento que involucra la inundación e inoculación mostró pudrición de su raíz y por tanto esta relación raíz:parte aérea tiende a ser muy baja.

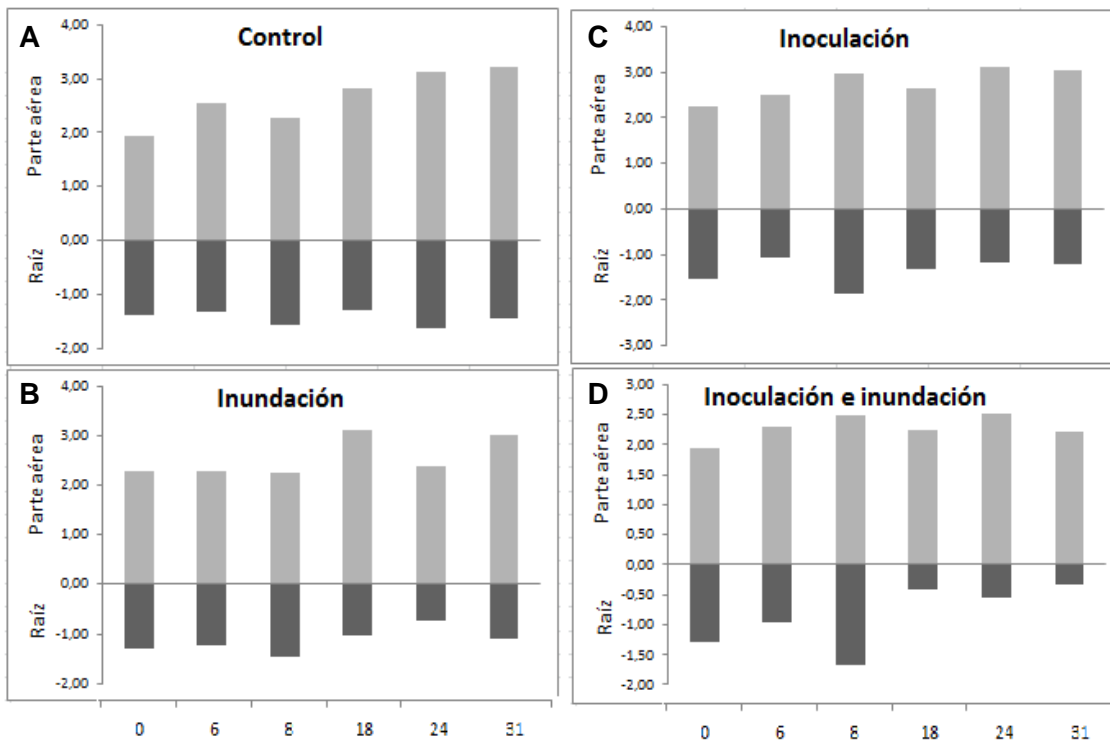


**Figura 1-8:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre la Relación raíz:parte aérea de plantas de uchuva. La línea gris por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar.

La figura 1-9A muestra la relación existente entre el desarrollo de la raíz en y la parte aérea de las plantas control, evidenciando un crecimiento constante y a una velocidad adecuada para el tiempo del ensayo guardando proporciones de 1 (raíz) a 3 (parte aérea).

En las plantas bajo inundación (figura 1-9B) se mantuvieron relaciones similares a las plantas control guardando proporciones de 1 a 3, con variaciones muy pequeñas con respecto al control con reducciones de 0,35 en la raíz y 0,20 en la parte aérea hacia el día 31 ddi. La relación raíz parte aérea mostrada en la figura 1-6 era de 0,45 para las plantas control al día 31 y de 0,33 en las plantas bajo inundación para el mismo periodo de evaluación.

Las plantas que fueron inoculadas con el patógeno *F. oxysporum*, mantuvieron relaciones entre 0,47 para el día 0 ddi hasta 0,38 en el día 31 ddi (figura 1-8), mostrando la reducción en esta proporción que sufrieron las plantas a causa de la inoculación con el patógeno. Estos valores también pueden estar siendo alterados debido al método de muestreo que al tratarse de una destrucción total de la planta, el momento de retirar el suelo de las raíces de las plantas pudo generar daños en el sistema.



**Figura 1-9:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre la Relación raíz:parte aérea discriminado por tratamiento en plantas de uchuva.

La figura 1-9C deja notar que las proporciones entre la raíz y la parte aérea de las plantas inoculadas es similar a las plantas bajo inundación dado que la afectación producida por el patógeno en el sistema radical es mínima por tratarse de su ruta de entrada a la planta pero no del órgano que el hongo ataca como principal objetivo.

Por el contrario las plantas con inoculación e inundación (figura 1-9D), mostraron reducciones drásticas en su relación raíz:parte aérea desde el día 18 ddi. Al inicio del ensayo se guardaban proporciones de 1,29 a 2,94 que indicaban un desarrollo normal para las plantas de uchuva en esta etapa vegetativa, como lo indican igualmente las proporciones de las plantas control mostradas anteriormente (figura 1-9A), hacia el día 18 ddi las reducciones en la relación raíz:parte aérea alcanzó proporciones de 0,43 a 2,26 disminuyendo hacia el día 31 ddi a proporciones de 0,32 a 2,23. La marcada reducción

de los valores principalmente en la parte radical sugieren un daño severo sobre este sistema, resultado de la pudrición generada por la condición de hipoxia.





















### **1.3.2 Evolución de los síntomas visuales de estrés por anegamiento y ataque de *Fusarium oxysporum***

Los primeros síntomas de estrés que para el caso de plantas inoculadas con el patógeno se establece como el período de incubación del hongo, y para las plantas inundadas como la evidencia del estrés por anegamiento, se establece dentro de la escala (Tabla 3) como el ondulamiento de las hojas y la clorosis de las hojas bajas (clase 4).

En la tabla 4 se muestra la evolución de la escala de síntomas por anegamiento y severidad de *Fusarium* sp. en los tres tratamientos y el control del ensayo. Las fotografías muestran cómo las plantas que fueron inundadas por 6 días consecutivos inician su recuperación después de ser retirada la condición de anegamiento, alcanzando nuevamente su estado sanitario y fisiológico óptimo (clase 5) al final del ensayo.

El período de incubación (clase 4) en el tratamiento de inoculación con *F. oxysporum*, empezó a ser evidente alrededor del día 18 ddi. En el último tratamiento que involucra los dos tipos de estrés biótico y abiótico, el período de incubación del patógeno se reduce a 8 ddi, tiempo que coincide con la eliminación de la condición de anegamiento. Al día 31 ddi, el tratamiento con la inoculación de *F. oxysporum* se encontraba en la clase 3 de la escala de síntomas por estrés y severidad de *F. oxysporum*, mientras que el último tratamiento de los dos tipos de estrés se encontraba en clase 1 de la escala; 3 días después de esta fotografía las plantas pasaron a clase 0 (planta muerta).

**Tabla 1-4.** Evolución de la escala de síntomas de los tratamientos considerados

DDI	TRATAMIENTOS			
	Control	Inundación	<i>F. oxysporum</i>	Inundación + <i>F. oxysporum</i>
0 (ddi)				
CLASE	5	5	5	5
8 (ddi)				
CLASE	5	4	5	4
18 (ddi)				
CLASE	5	5	4	2
24 (ddi)				
CLASE	5	4	4	1
31 (ddi)				
CLASE	5	5	3	1

### 1.3.3 Mediciones de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila a

En la mayoría de los casos de estrés, los procesos fotosintéticos se ven alterados. Para el caso de anegamiento el efecto sobre la tasa de asimilación neta y los demás procesos involucrados como conductancia estomática y transpiración radica en el déficit de oxígeno en la raíz, que genera un aumento en la respiración de las plantas e induce procesos fermentativos (Pociecha *et al.*, 2008).

Para el caso de este ensayo, la presencia de un patógeno de suelo genera en la planta además un descenso en el contenido de agua a nivel celular, que disminuye las tasas fotosintéticas por limitación en la absorción de agua y nutrientes.

La infección de patógenos vasculares como *F. oxysporum* se ve favorecida bajo distintas condiciones de estrés que permiten que la planta sea más vulnerable a los ataques patogénicos (Chekali *et al.*, 2011).

La presencia simultánea de los dos tipos de estrés involucrados en este trabajo (inundación más inoculación de *F. oxysporum*), aumenta el impacto sobre la tasa de asimilación y muy probablemente genera daños irreversibles a nivel celular.

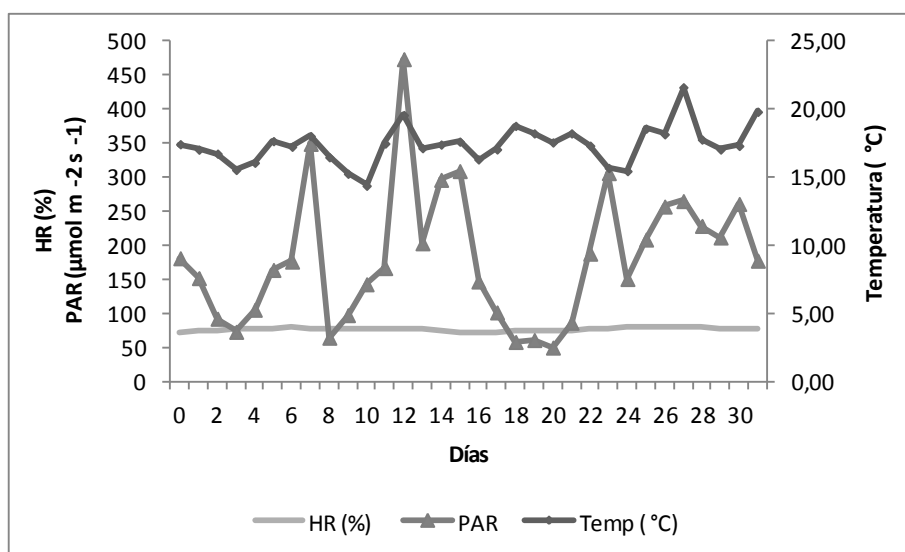
Para entender el impacto de los dos tipos de estrés analizados sobre la eficiencia fotosintética de plantas de uchuva, se realizaron curvas de luz, curvas diarias de fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración, concentraciones de CO<sub>2</sub> intracelular y fluorescencia de la clorofila a.

Las curvas de luz (Anexo 4, numeral 4.1) realizadas sobre plantas sanas de uchuva permiten establecer que para las condiciones del invernadero del departamento de biología la fotosíntesis máxima es de 11,68  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , alcanzado con un flujo fotónico de 600  $\mu\text{mol de fotones m}^2 \text{ s}^{-1}$ .

Para este experimento se realizaron curvas diarias de fotosíntesis (Anexo 4. Numeral 4.2) con el fin de encontrar el momento del día en el que las plantas de uchuva presentan

su máxima tasa de asimilación. De esta manera se estableció un rango del día entre las 10:00 a.m y las 11:00 a.m con mayor eficiencia fotosintética, con un valor de  $5,54 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  de fotosíntesis máxima alcanzada con un flujo fotónico que oscilaba alrededor de  $340 \mu\text{mol de fotones m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Entonces para las mediciones de fotosíntesis los días establecidos dentro del ensayo, se definió un rango entre las 9:00 a.m y las 12:00 m.

Las condiciones climáticas de temperatura ambiental, humedad relativa y radiación fotosintéticamente activa del invernadero para el rango del día en el que se realizaron las mediciones fisiológicas, entre las 9:00 a.m y la 12:00 m, se presentan en la figura 1-8.

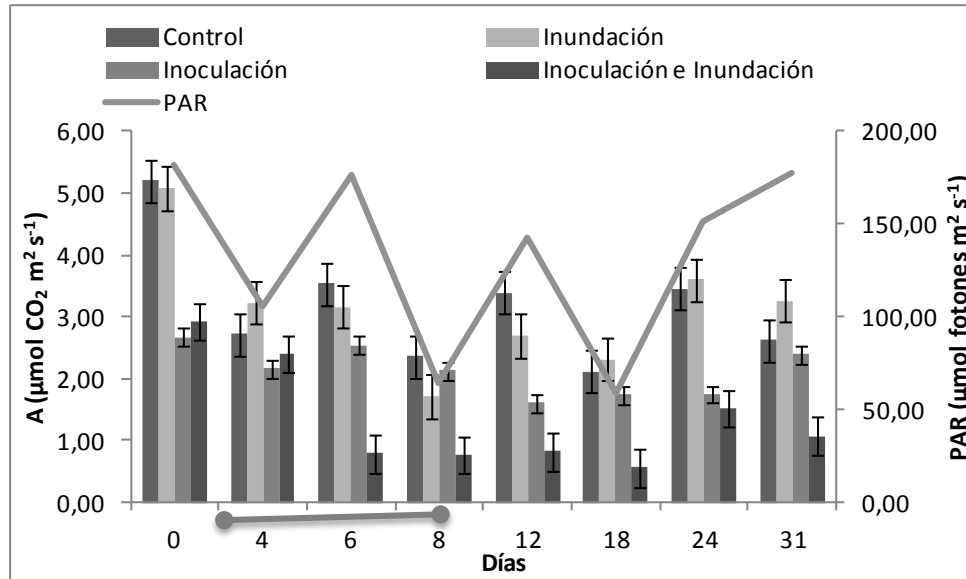


**Figura 1-10:** Humedad relativa (HR), radiación fotosintéticamente activa (PAR) y temperatura en el invernadero durante el periodo del ensayo. En el eje principal se encuentran los datos de HR (%), y PAR ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). En el eje secundario se encuentran los datos de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Las mediciones de tasa de asimilación, arrojaron resultados contrastantes entre los tratamientos que involucran la inoculación con el patógeno *F. oxysporum* y los que no, como se observa en la figura 1-11. Los valores de la tasa de asimilación en el tratamiento de Inundación y el control coinciden con la tendencia de los valores de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante el momento de la medición. Los tratamientos de *F. oxysporum* y el tratamiento combinado de inundación y *F. oxysporum*,



mantuvieron valores en su tasa de asimilación estables pero siempre por debajo de los otros dos tratamientos, indicando el daño causado al aparato fotosintético por parte del patógeno y del estrés combinado.



**Figura 1-11:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre la tasa de fotosíntesis de las plantas de uchuva. En el eje principal los valores de fotosíntesis máxima A ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) de los tratamientos y control. En el eje secundario los valores de radiación fotosintéticamente activa (PAR  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). La línea azul por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar.

La disminución inicial observada en todos los tratamientos se debe al estrés causado por el manejo de la raíz de la planta, realizado con el objetivo de permitir la inoculación con el patógeno mediante la inmersión de las raíces en la suspensión conidial o la inmersión en agua destilada para el caso de las plantas control e inundadas.

Dada la influencia que tienen las variables climáticas sobre las tasas de asimilación y demás variables de intercambio gaseoso, se centrará la discusión comparando la eficiencia de las plantas entre tratamientos.

El análisis estadístico de la variable de fotosíntesis (Anexo 7, numeral 7.1), muestra que las diferencias significativas se encuentran entre los tratamientos de inundación y el

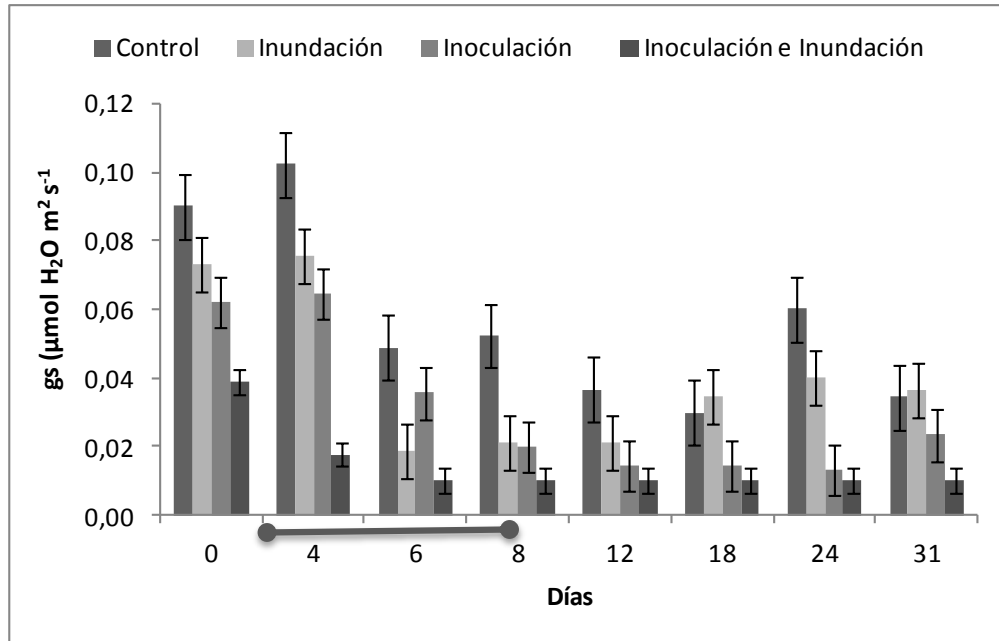
control frente a los tratamientos de las plantas inoculadas con el patógeno, y que además existen diferencias entre estos dos últimos tratamientos.

Los resultados obtenidos en el tratamiento de inundación no muestran diferencias con el control debido a la recuperación que estas plantas presentaron luego de haber sido retirada la condición de anegamiento, mostrando al final del ensayo valores de tasas de asimilación incluso superiores a las plantas control.

En el caso de las plantas inoculadas con *F. oxysporum*, la tendencia de respuesta ante la radiación fotosintéticamente activa también puede notarse en cierta etapa de la enfermedad hasta el día 8 ddi. Después de este día la planta no responde a los incrementos de radiación mostrando una reducción en las tasas fotosintéticas del 50% aproximadamente, en los días 12 a 24 ddi. El día 31 ddi el flujo fotónico de la PAR fue bastante elevado generando un aumento en las tasas de asimilación de las plantas infectadas. Pese a esta respuesta la reducción de la asimilación en la etapa final del ensayo fue del 10% con respecto a las plantas control.

El estrés combinado de la inundación y la infección con el patógeno redujo las tasas de asimilación desde el día 6 ddi hasta en un 77,53% con respecto al control, manteniéndose el bajo rendimiento hasta el día 31 ddi entre un 60 a 75% de reducción. Los resultados obtenidos en las variables de crecimiento donde se mostró que el período de incubación en las plantas inundadas e inoculadas fue menor al de las plantas simplemente inoculadas, se confirma con estas mediciones de fotosíntesis ya que la disminución en la eficiencia del aparato fotosintético en presencia del patógeno se da hacia el día 8 ddi, mostrando síntomas visuales hacia el día 18 ddi; y la reducción en tasas de asimilación en las plantas que además del patógeno se encuentran en estrés hídrico por exceso es hacia el día 6 ddi mostrando síntomas visuales inmediatamente el día 8 ddi (tabla 4). Tanto la conductancia estomática (Figura 1-12) como la transpiración (Figura 1-13) son menores en los tratamientos que involucran la inoculación con el patógeno. Sigue siendo clara la tendencia que se ha notado en todas las variables medidas; la recuperación del tratamiento de inundación después de retirada esta condición, y la disminución en todas las funciones vegetales en el tratamiento de inoculación con *F. oxysporum* y posterior inundación a los 6 ddi. La disminución de

conductancia estomática y transpiración en el tratamiento de inoculación con *F. oxysporum* se da a los 6 ddi coincidiendo con el comportamiento observado en la tasa de asimilación neta.



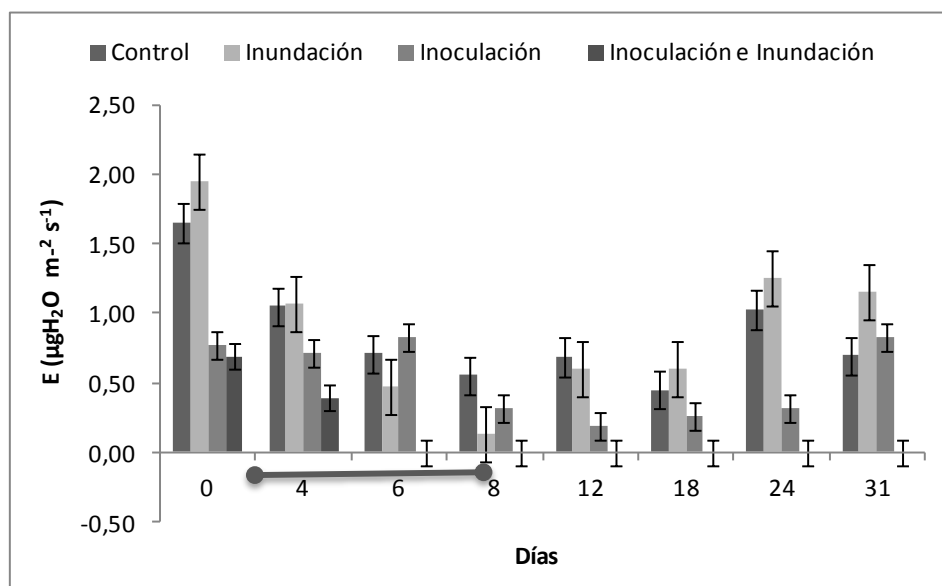
**Figura 1-12:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre conductancia estomática de las plantas de uchuva. La línea gris por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar.

Así como las tasas de asimilación en el tratamiento de inundación + *F. oxysporum* disminuyó a los 6 ddi, la conductancia estomática (figura 1-12) mostró el mismo comportamiento con una disminución drástica desde el día 6 ddi hasta el final. El tratamiento de inoculación con *F. oxysporum* mostró una reducción en conductancia desde el día 4 de manera constante hasta el día 24 ddi, para el día 31 ddi la respuesta positiva de la conductancia estomática en este tratamiento se debe a la elevada radiación de ese día que estimuló las tasas de asimilación y por tanto de la conductancia.

El tratamiento de inundación muestra lo que se ha venido confirmando a través de todo el ensayo, que finalizado el período de anegamiento las plantas se recuperan satisfactoriamente alcanzando niveles similares al control.

Para estas mediciones de conductancia estomática las diferencias estadísticamente significativas según las pruebas de comparación de medianas de Kruskal-Wallis (Anexo 7, numeral 7.2) se dan sobre los tratamientos de inundación + *F. oxysporum*, contra el control y los tratamientos de inundación e inoculación, así como de estos dos últimos tratamientos contra el control.

Las diferencias entre los tratamientos de inundación y el de inoculación no se presentaron de manera significativa debido a que las plantas inoculadas presentan un período de incubación tardío y el avance de los síntomas fue lento, mostrando baja respuesta en la conductancia estomática; además las plantas inundadas se recuperaron después del anegamiento comportándose en promedio similar a las plantas inoculadas.



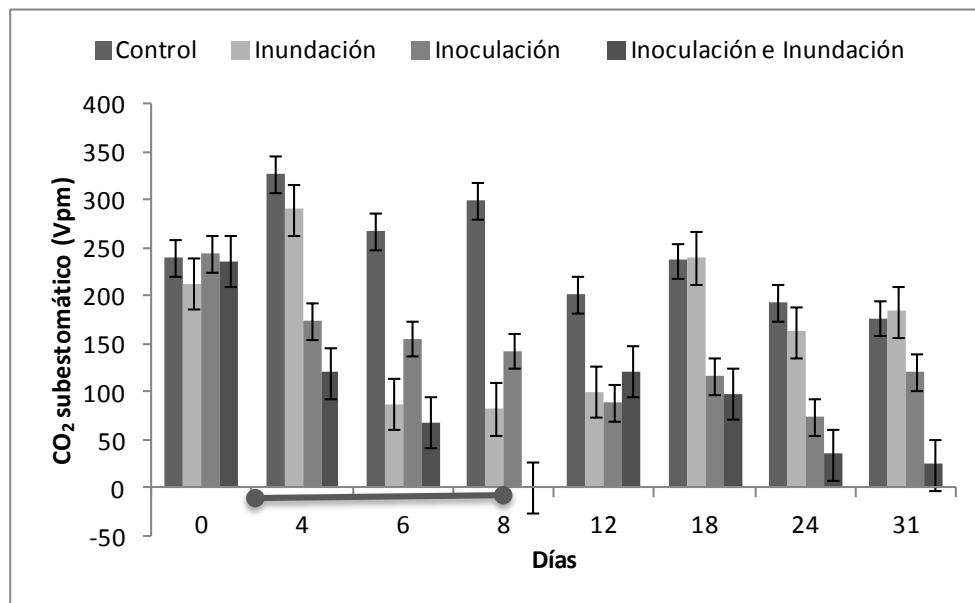
**Figura 1-13:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre la transpiración de las plantas de uchuva. La línea gris por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar.

La transpiración de las plantas de uchuva (figura 1-11) siguió la misma tendencia mostrada en la conductancia estomática con los distintos tratamientos evaluados. Las plantas inoculadas con el patógeno disminuyen sus tasas transpiratorias desde el día 8 ddi hasta el día 24 ddi, momento en el cual la transpiración aumentó en el día 31 ddi debido a la alta radiación presente ese día que como ya se ha anotado generó una

respuesta positiva en todas las plantas; excepto en las plantas del tratamiento con la combinación de la inoculación y la inundación que para este momento ya se encontraban en la clase 0 de la escala de síntomas que corresponde a planta muerta y como se nota en la figura 1-13 las tasas de transpiración disminuyeron desde el día 4 ddi y desde el día 6 ddi se mantuvieron por debajo de 0.

Por el fuerte efecto que generó la combinación de estreses sobre la transpiración de las plantas, las diferencias significativas estadísticamente se dan sobre este tratamiento en comparación con los otros dos tratamientos y el control, según las pruebas de comparación de medias de Kruskal-Wallis (Anexo 7, numeral 7.3).

El  $\text{CO}_2$  subestomático (Figura 1-14) responde con un patrón a través del tiempo del ensayo similar al seguido en las mediciones de tasas de asimilación, transpiración y conductancia estomática, con concentraciones de este gas mayores en las plantas control. Las plantas que fueron inundadas disminuyen drásticamente sus valores hasta el día 8 ddi, cuando se inicia un leve incremento alcanzando valores similares a los del control en el día 18 ddi y manteniéndose hasta el final del experimento.



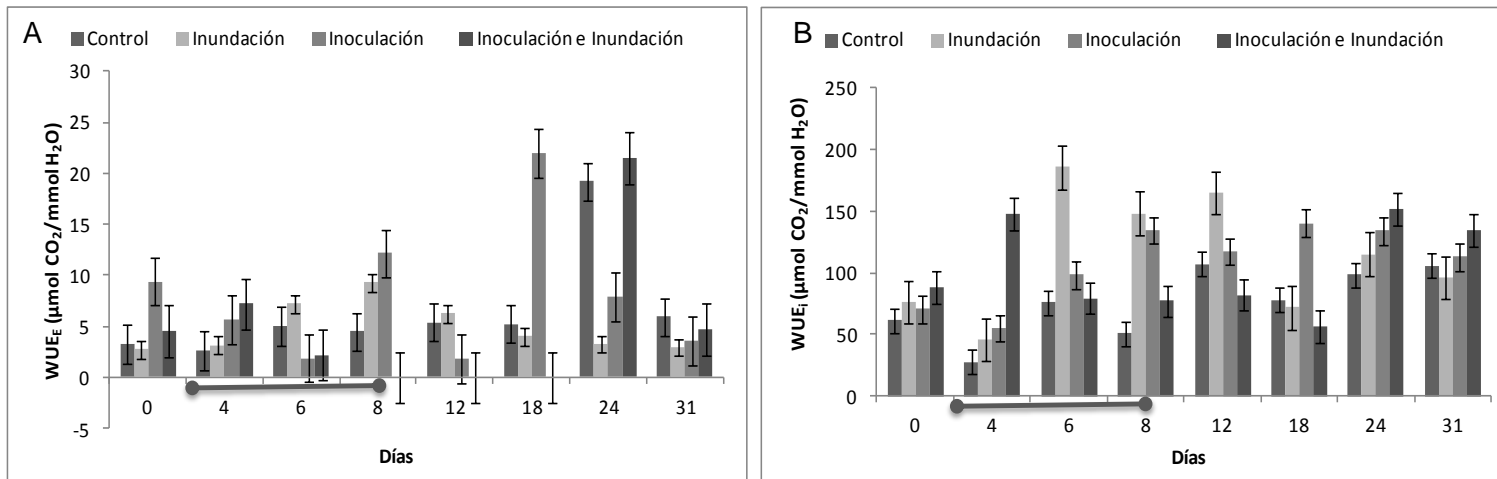
**Figura 1-14:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre  $\text{CO}_2$  subestomático (Ci) de las plantas de uchuva. La línea gris por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar.

Para el caso del tratamiento con la inoculación del patógeno se observó disminución relativamente lenta en los valores de la concentración  $C_i$ , a medida progresaba el tratamiento. En el tratamiento con la combinación de factores estresantes se observó disminución rápida en los niveles de  $CO_2$  subestomático hasta el día 8 ddi cuando fue retirada la inundación, luego de esto las plantas intentan aumentar las concentraciones de  $CO_2$  pero vuelven a disminuir rápidamente debido al daño irreversible que produjeron las condiciones de estrés al metabolismo de las plantas.

Las diferencias estadísticamente significativas (Anexo 7. Numeral 7.4) en estos valores se dieron entre los tratamientos de inundación + inoculación, frente al control y los tratamientos con estrés unitario. Las diferencias de medianas de Kruskal-Wallis permitieron observar que el tratamiento combinado difirió claramente del resto de tratamientos, y que las bajas diferencias entre los tratamientos de inundación y el de inoculación se dan precisamente por la respuesta tardía de las plantas al patógeno y por la rápida recuperación de estas plantas de uchuva a la inundación, haciendo que las medianas de los tratamientos no presentaran diferencias estadísticas.

Dentro del análisis del intercambio de gases debe incluirse la medición de la pérdida de agua como vapor, luego de la absorción e internalización del  $CO_2$  en el mesófilo de la hoja. Este fenómeno de pérdida de vapor de agua se da cuando la planta abre sus estomas para la asimilación del  $CO_2$  del aire para la fotosíntesis.

El uso eficiente del agua extrínseco ( $WUE_E$ ) es la relación entre la tasa fotosintética y la tasa transpiratoria e indica los moles de  $CO_2$  fijados respecto a los moles de  $H_2O$  perdidos por la superficie foliar. El uso eficiente del agua intrínseco ( $WUE_i$ ), se halla a partir de la relación entre la tasa fotosintética y la conductancia estomática e indica el grado de apertura que deben realizar los estomas para la fijación de  $CO_2$  (Pérez y Melgarejo, 2011).



**Figura 1-15:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre el uso eficiente del agua de las plantas de uchuva. A. Uso eficiente del agua extrínseco  $WUE_E$ . B. Uso eficiente del agua intrínseco  $WUE_i$ . La línea gris por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación. Las barras sobre las columnas indican la desviación estándar.

Las plantas control mostraron un  $WUE_E$  constante con valores entre 3 y 5  $\mu\text{moles de CO}_2/\text{mmol de H}_2\text{O}$ . Los datos de  $WUE_E$  coinciden con los datos obtenidos de  $WUE_i$ , indicando una apertura estomática media para la captación de  $\text{CO}_2$ .

Las plantas bajo inundación a pesar de encontrarse en valores similares a las plantas control durante el periodo del ensayo, mostraron un pico al día 8 ddi con un valor de 12,8  $\mu\text{moles de CO}_2/\text{mmol de H}_2\text{O}$ . Este valor indica un aumento en el  $WUE_E$  que coincide con el retiro la inundación del sistema. El  $WUE_i$  de las plantas que se encontraban en inundación mostraron valores altos de 167,76  $\mu\text{moles de CO}_2/\text{mmol de H}_2\text{O}$ , al día 6 ddi indicando menor grado de apertura estomática.

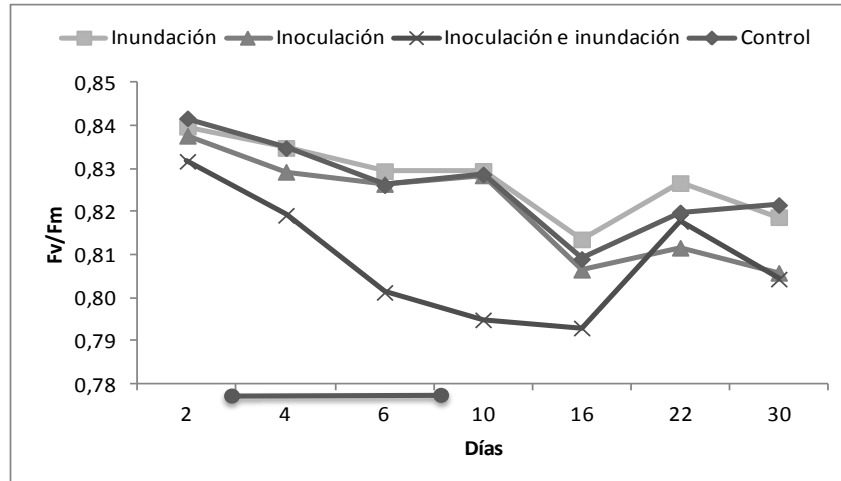
Las plantas inoculadas con el patógeno *F. oxysporum*, mantuvieron un  $WUE_E$  en aumento hasta el día 12 ddi alcanzando valores de 8,46  $\mu\text{moles de CO}_2/\text{mmol de H}_2\text{O}$ , disminuyendo en los días posteriores cuando empezaron a ser evidentes los síntomas de clorosis y epinastia hasta valores de 2,89  $\mu\text{moles de CO}_2/\text{mmol de H}_2\text{O}$ . Para este

tratamiento los valores de  $WUE_i$  estuvieron en aumento constante desde el día 8 ddi hasta alcanzar valores de 131,33  $\mu\text{moles de CO}_2/\text{mmol de H}_2\text{O}$ .

Para el caso del tratamiento con inoculación de *F. oxysporum* y la inundación los valores de  $WUE_E$  fueron imperceptibles desde el día 6 ddi, dado que desde este momento los valores de transpiración fueron de 0  $\mu\text{g H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Corroborando este comportamiento los valores de  $WUE_i$  desde este punto del ensayo alcanzaron los mayores valores comparados con los demás tratamientos, siendo evidencia de la pequeña apertura estomática de estas plantas.

La eficiencia cuántica del PSII ( $F_v/F_m$ ), cuyos valores a través del tiempo de ensayo pueden observarse en la figura 1.16, nos dan cuenta de si las plantas se estresan o no frente a los respectivos tratamientos. La  $F_v/F_m$  para los tratamientos individuales control e inundación se mantuvieron por encima de 0,81, y con la misma tendencia durante los diferentes tratamientos; contrario a lo sucedido con los tratamientos que involucraban inoculación con el patógeno, en los cuales los valores de  $F_v/F_m$  disminuyeron por debajo de 0,81, especialmente en el tratamiento combinado anegamiento más *Fusarium*. Se observa que las plantas presentan estrés cuando son sometidas al patógeno y mayormente cuando se combina con otro tipo de estrés como el de inundación.





**Figura 1-16:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre la Eficiencia cuántica máxima potencial del PSII ( $F_v/F_m$ ) de las plantas de uchuva. La línea gris por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación.

Como se observó en los parámetros de intercambio de gases tales como fotosíntesis (A), Conductancia estomática ( $g_s$ ) y transpiración (E), la variación en plantas de uchuva en los que la respuesta al estrés tanto por inundación como por la inoculación con el patógeno se observa desde el día 6 ddi, evidencia que estos son parámetros de respuesta rápida que presentan alta sensibilidad tanto al estrés como a las condiciones ambientales y que en las plantas con el doble impacto biótico y abiótico esta respuesta en las variables de intercambio de gases fue mucho más rápida (4 ddi) por su mayor sensibilidad.

Al observar la figura 1-16 y comprobando las observaciones con las diferencias estadísticas encontradas a través de las comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis (Anexo 7, numeral 7.5), se puede notar que el único tratamiento que difiere significativamente es el tratamiento en donde se consideró la combinación de la inoculación con el patógeno y la inundación. Al ser la  $F_v/F_m$  del PSII una variable de respuesta tardía las diferencias sobre las medianas de los demás tratamientos no mostraron grandes diferencias, mientras que la disminución temprana en el tratamiento de combinación de estrés permitió generar un impacto acelerado y las diferencias estadísticas fueron notorias.

## 1.4 Discusión de resultados

El efecto negativo que presentó el patógeno y la condición de inundación sobre las variables medidas en las plantas de uchuva, indican que esta planta, al igual que otras solanáceas, es sensible a la condición de anegamiento presentando una inhibición en el crecimiento y reducción en la acumulación de materia seca (Ezin *et al.*, 2008). Adicional a esto la presencia del patógeno bajo este escenario de estrés abiótico, adelantó el período de incubación de *F. oxysporum* e igualmente de los demás síntomas del proceso infeccioso.

El exceso de humedad en el suelo lleva a un déficit de oxígeno causando alteraciones respiratorias en las raíces cuyas consecuencias pueden notarse en la parte aérea (Pociecha *et al.*, 2008), afectando negativamente los valores de peso seco de raíz y aéreo, longitud de raíz y área foliar (Ezin *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2010). Las plantas de uchuva que fueron inundadas presentaron menor crecimiento tanto a nivel radical como aéreo, menor área foliar y por consiguiente una disminución en acumulación de biomasa, pero se recuperó rápidamente cuando la condición de anegamiento fue retirada oportunamente.

La determinación del área foliar y del área foliar específica de las plantas tiene gran importancia en el análisis del crecimiento, dado que en las hojas se sintetizan los carbohidratos que van a repartirse entre los diferentes órganos. La capacidad de fotosíntesis de las plantas está directamente relacionada con la superficie foliar expresada como índice de área foliar (Cuellar y Herrera, 2010; Miranda *et al.*, 2010). En las mediciones realizadas en las plantas sometidas a los tratamientos considerados, se observó claramente como tanto los factores estresantes bióticos y abióticos disminuyeron el aumento en área foliar y área foliar específica. Puede suponerse que los fotoasimilados producidos por la planta fueron movilizados hacia rutas metabólicas de respuesta al estrés como la producción de prolina y azúcares reductores y hacia respuesta de defensa de las plantas ante el patógeno.

Estudios previos realizados como ensayo preliminar de este trabajo (datos no mostrados), en donde se mantuvo la inundación en plantas de uchuva de 4 meses de edad por 0, 4, 8, 15 y 30 días continuos sin la presencia de ningún patógeno, revelaron que la planta es capaz de soportar la inundación por más de 15 días continuos generando raíces adventicias, pero una vez es retirada la inundación la planta muere a los tres días haciéndose imposible su readaptación a condiciones normales de suelo a capacidad de campo. Las plantas retiradas de la inundación a los 8 días tampoco lograron recuperarse, mientras que las plantas sometidas a 4 días mostraron un desarrollo normal igual a las plantas control (0 días de inundación).

Estudios realizados por Ezin *et al.* (2008), en los que se compararon 4 genotipos de tomate en cuanto a su tolerancia con medición de parámetros fisiológicos y de crecimiento frente al estrés por inundación, manteniendo inundadas las plantas por 0, 2, 4 y 8 días continuos, mostraron que todos los genotipos de tomate toleran la condición de inundación hasta 4 días mostrando recuperación después de ser retirada el agua, mientras que las plantas sometidas a 8 días no pueden recuperarse tras ser retirado el anegamiento. Aldana y García (2012) concluyeron que en plantas de uchuva inundadas por más de 4 días continuos no se recuperan sus funciones metabólicas ni fisiológicas.

Los antecedentes permitieron fijar el período de inundación óptimo para el presente ensayo en seis días continuos para poder observar la recuperación de las plantas, debido a que el objetivo principal de este trabajo fue comparar la fisiología de la planta en condición de inundación, y con esta misma condición sumando la presencia del patógeno.

Al haber contado con un período de inundación para las plantas en el que permitimos una recuperación posterior de ellas, las diferencias estadísticas que logramos obtener de este tratamiento de inundación frente al control no son significativas.

Esta misma situación se presenta con las plantas inoculadas con *F. oxysporum.*, en donde el período de incubación presentado fue de 18 ddi y el colapso de las plantas según observaciones realizadas por Ortiz (2011), se da aproximadamente a los 33 ddi. Durante este período el avance de los síntomas de marchitez vascular se dan de manera

paulatina y por esta razón las diferencias no fueron tan significativas estadísticamente aunque al observar los datos si existen diferencias en el crecimiento vegetal.

Las diferencias estadísticas son realmente significativas al observar los datos obtenidos en el último tratamiento en el que confluyen la inundación y el ataque patogénico frente al control. El período de incubación del patógeno se reduce a 8 ddi y el colapso generalizado se alcanzó entre los 24 y los 31 ddi. Podemos concluir con este tratamiento que la presencia del patógeno favoreció que la condición de hipoxia presentada en las raíces por el anegamiento se convirtiera en una condición permanente hasta generar la pudrición de las raíces, siendo la disminución en su peso seco y longitud de la raíz evidencia no solo de la detención en el crecimiento sino también de la pudrición de las raíces.

El rápido avance de la enfermedad puede deberse a que bajo la condición de inundación y dada la susceptibilidad de los hongos a esta condición, el patógeno *F. oxysporum*, ascendió aceleradamente por el tallo causando el colapso de los haces vasculares de una manera mucho más drástica que bajo condiciones no estresantes. En un análisis paralelo a este ensayo se describen los cambios en la dinámica poblacional de la comunidad microbiana en suelos asociados a cultivos de uchuva, en donde se concluye que las bacterias son mucho más tolerantes a la condición de anegamiento que los hongos (Castillo y Hoyos-Carvajal, 2013). Es probable que la presión ejercida sobre el patógeno *F. oxysporum* por parte de la inundación haya inducido un fenómeno de evasión en el patógeno que consistió en el avance acelerado de las estructuras fúngicas a través de los haces vasculares, anticipando la aparición de síntomas y el colapso de las plantas.

Adicional a esto la prevalencia de las bacterias en el sistema y la evasión que también pudieron presentar otros hongos presentes en el suelo como *Phytium* sp., y *Phytophthora* sp., entre otros, pudieron ser los responsables de la pudrición del cuello de las plantas en este tratamiento de inundación e inoculación con el patógeno.

Como se reporta en la literatura, el micelio del patógeno avanza por los haces vasculares de la planta y genera una proliferación de conidias y macroconidias que los taponan

(Cruz, 2013). Adicional a esto la producción de gomas por parte de la planta para evitar el avance de la enfermedad evitan el ascenso de agua y nutrientes por los vasos xilemáticos generando un estrés hídrico por déficit en la planta. De esta manera la planta junto con el cierre estomático producto de la hipoxia por inundación, detiene todas sus funciones de absorción e inevitablemente muere (Chekali *et al.*, 2011; Cruz, 2013). La defoliación acelerada de la planta y la disminución en el peso seco aéreo son también evidencia de la agresividad de este escenario para las plantas de uchuva.

La disminución en los contenidos de oxígeno en los poros del suelo, producto de la inundación, limita la respiración aeróbica en las plantas y promueve un ambiente de anaerobiosis en el que el potencial redox del suelo y el pH cambian, y las concentraciones de iones tóxicos y etileno se incrementan. A raíz de esto las plantas alteran su metabolismo y procesos fisiológicos, generando un rápido déficit de energía, y los procesos dependientes de este tipo de respiración son suprimidos (Li *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2010; Rao y Li, 2003). Debido a la hipoxia en la raíz de las plantas de uchuva y a la supresión de los procesos respiratorios el crecimiento vegetal se detuvo. Estos mismos resultados son observables en otros trabajos con solanáceas como el tomate, en los que el crecimiento de la planta se vio afectado por la condición de anegamiento (Ezin *et al.*, 2008; Rao y Li, 2003).

La reducción en las tasas de asimilación al día 8 ddi (figura 1-11) así como la respuesta negativa en conductancia estomática (figura 1-12) y transpiración (figura 1-13), en el tratamiento con inoculación del patógeno, permite concluir que el efecto del patógeno sobre la fotosíntesis se da mucho antes de la visualización de los síntomas externos tales como clorosis y ondulamiento de las hojas.

Debido a la disminución de la expansión y división celular a causa del estrés hídrico generado por la presencia del patógeno, las plantas responden cerrando estomas y por tanto disminuyendo las tasas fotosintéticas, acelerando la senescencia y removilizando sus reservas de fotoasimilados (Boomsma y Vyn, 2008; (Kozlowski y Pallardy, 1997). Fue por esta razón que las plantas con síntomas de marchitez vascular, mostraron una respuesta negativa en sus variables tanto fisiológicas como agronómicas y en aquellas plantas donde la marchitez vascular incrementó su severidad en presencia de inundación; la disminución en las tasas de asimilación fue más rápida e irreversible.

La disminución en los valores de conductancia estomática y transpiración, que provocaron la disminución en la fotosíntesis hasta en un 50%, fue generada en los tratamientos de inoculación con el patógeno, combinación de factores estresantes y en los primeros días del tratamiento de inundación cuando las plantas se encontraban anegadas dando cuenta del daño causado al aparato fotosintético por las condiciones estresantes.

Las especies sensibles a la inundación presentan una disminución en la conductancia estomática, transpiración y fotosíntesis, pero la concentración de CO<sub>2</sub> intracelular se mantiene estable por un mayor período de tiempo de estrés (Yin *et al.*, 2010). En las plantas bajo tratamiento de inundación y en el de la inoculación con el patógeno, la disminución en estas variables de transpiración y apertura estomática, correlacionado con la disminución en los datos obtenidos en la concentración subestomática de CO<sub>2</sub> indican que la disminución en las tasas de asimilación fueron causadas por interrupciones en el intercambio gaseoso.

En el tratamiento con la mezcla de la inoculación con *F. oxysporum* y la inundación, a pesar de las variaciones en las concentraciones de CO<sub>2</sub> subestomático se observó disminución desde el día 4 ddi, aumento al día 12 ddi y disminución nuevamente hasta el final del ensayo, mostrando que la limitación en la fotosíntesis se da a nivel del intercambio gaseoso (Yin *et al.*, 2010).

El comportamiento de las concentraciones de CO<sub>2</sub> intracelular, transpiración y conductancia estomática, en las plantas inoculadas con el patógeno, presentan variaciones similares a las presentadas en plantas sensibles a la inundación. Esta respuesta es atribuida a que tanto al inundación, como la presencia de patógenos de tipo vascular como *F. oxysporum*, generan en las plantas disminuciones en la apertura estomática y por tanto de las variables de intercambio gaseoso consideradas en las mediciones de este ensayo. Se había dicho que los síntomas de la marchitez vascular, por la biología del patógeno, son similares a los presentados durante un estrés hídrico por déficit (Chekali *et al.*, 2011), con clorosis foliar, disminución de la turgencia y muerte. En los casos de estrés hídrico por anegamiento los síntomas aéreos son similares, pues los estomas presentan su cierre inmediato, generando disminuciones en las tasas de

transpiración y conductancia estomática igual a lo sucedido durante un estrés hídrico por déficit. En definitiva la respuesta de las plantas a la presencia del patógeno y a la inundación son similares a las respuestas inducidas por sequía, cuando la planta se ve imposibilitada en la absorción de agua y nutrientes.

Debido a que la planta realiza un balance entre  $\mu\text{moles CO}_2$  ganado/ $\text{mmol H}_2\text{O}$  perdida a través de variaciones en la apertura estomática, aquellas condiciones bióticas o abióticas que generen balances desfavorables, como alta temperatura e irradiancia, alto déficit de presión de vapor entre mesófilo y atmósfera, aporte limitado de agua por el suelo que puede darse tanto en condiciones de sequía como de inundación o conductividad eléctrica muy alta en la solución de agua del suelo, tenderán al incremento en la restricción difusiva del agua con el cierre estomático parcial o total (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 2008).

Puede demostrarse que incluso bajo condiciones ambientales favorables una planta C3 como es el caso de la uchuva, pierde por los estomas aproximadamente 100 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  por molécula de  $\text{CO}_2$  asimilado (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 2008).

Los resultados obtenidos en las variables del intercambio de gases, muestra que las plantas control y las plantas bajo inundación presentan un comportamiento estable de su sistema, lo que puede comprobarse con los valores alcanzados en el  $\text{WUE}_E$  los cuales se mantuvieron en valores de 4  $\mu\text{moles de CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$  hasta el final del ensayo, siendo este un uso eficiente del agua estable para plantas de uchuva, mientras que en plantas inoculadas este  $\text{WUE}_E$  disminuyó a valores de 2,89  $\mu\text{moles de CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$  hacia el día 31 ddi. Este comportamiento junto con la disminución en el intercambio de gases y la menor tasa fotosintética de este momento indican una muy baja asimilación y fijación de  $\text{CO}_2$ , dadas las condiciones estresantes la apertura estomática se redujo.

El efecto del tratamiento de inoculación e inundación fue más drástico en las plantas de uchuva. El  $\text{WUE}_E$  disminuyó a valores de 0  $\mu\text{moles de CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$  causado por la reducción en la transpiración foliar a valores igualmente de 0  $\mu\text{g H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Este cierre estomático también impacta negativamente la difusión de CO<sub>2</sub> lo cual se traduce en aumento en la actividad fotorespiratoria de la planta. Lo que puede notarse a través de mediciones de la eficiencia cuántica del PSII.

Los daños en el aparato fotosintético deben ser analizados de igual manera desde el punto de vista del funcionamiento del PSII, por lo que las mediciones en la fluorescencia de la clorofila permiten dilucidar lo ocurrido en la captación de energía radiante en el complejo de la antena cosechadora de luz (LCH) y de esta manera se puede entender el comportamiento del aparato fotosintético ante la inundación y la inoculación con *F. oxysporum*.

La fluorescencia de la clorofila da cuenta de la habilidad de las plantas para tolerar diferentes tipos de estrés y permite ver el daño causado por el estrés al aparato fotosintético. Según la literatura bajo eventos de estrés, la Fv/Fm del PSII se ve disminuida siendo este efecto el responsable de la disminución en las tasas de fotosíntesis por cambios en la eficiencia de los procesos de disipación no fotoquímicos asociados al LHC. Se presume que las plantas bajo inundación más inoculación o solamente inoculadas con el patógeno recurren a procesos de fotoinhibición que disipan el exceso de energía que no pueden procesar fotoquímicamente (Waldhoff *et al.*, 2002).

Esta fotoinhibición puede notarse claramente en las primeras etapas del estrés por anegamiento más inundación, ya que como puede notarse en la figura 1-13 la disminución en la Fv/Fm en estos dos tratamientos se da hasta el día 16 ddi, momento en el cual este parámetro inicia una recuperación. Este comportamiento indica una respuesta de fotoprotección al aparato fotosintético por su disminuida capacidad de asimilación tras la afectación por los diferentes tipos de estrés contemplados. Con esta recuperación en la fluorescencia de la clorofila del PSII al final del ensayo se presume que la afectación sobre la fotosíntesis se da sobre la efectividad en el intercambio de gases ya que no afecta la transferencia de energía entre el LCH y el Centro de Reacción del PSII.

El análisis realizado permite concluir que en los tratamientos de inundación y en el de inoculación con el patógeno, el daño en el aparato fotosintético se da por limitaciones en el intercambio gaseoso, sin afectar la eficiencia cuántica del PSII. En las plantas bajo



tratamiento de inundación e inoculación con el patógeno, la disminución en las tasas de asimilación se divide en dos: durante la primera etapa del estrés las limitaciones se dan por cambios en la eficiencia cuántica del PSII, como respuesta fotoprotectora al aparato fotosintético, y en la etapa avanzada de la condición estresante la limitación en la fotosíntesis se da a nivel del intercambio gaseoso. Se pudo corroborar que las mediciones sobre la  $F_v/F_m$  sirven de indicador del efecto de un factor estresante (Waldhoff *et al.*, 2002).



## **2. Respuesta bioquímica de plantas de uchuva (*P. peruviana* L.), bajo condición de anegamiento y ataque de *F. oxysporum***

### **2.1 Introducción**

Distintas condiciones de estrés ambiental, y dentro de ellas las inundaciones, generan impactos negativos sobre las plantas que inducen cambios en la expresión genética, balances hormonales y aumentos en el contenido de metabolitos específicos. Estas alteraciones en plantas susceptibles generan reducción en el crecimiento vegetal, disminución en las tasas de fotosíntesis y finalmente la muerte (Arbona *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011).

La condición de anegamiento continuo genera en la rizósfera de la planta anaerobiosis, limitando la disponibilidad de oxígeno para las raíces y para el sistema en general.

En el presente trabajo adicional a esta condición de anaerobiosis generada por la inundación, se determinó el efecto del patógeno *F. oxysporum* el cual a través del xilema genera taponamientos en los haces vasculares que redundan en déficit hídrico para la planta.

La baja disponibilidad de oxígeno o hipoxia bloquea la respiración de las raíces llevando a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y superóxido ( $O_2$ ), que en la mayoría de los casos causan estrés oxidativo causando daños en membranas, o en otras macromoléculas. A bajas concentraciones las ROS funcionan como moléculas de señalización que permiten regular procesos celulares, mantener el poder oxidativo y reductor de la célula y las respuestas adaptativas frente a condiciones estresantes. Las ROS, son bastante reactivas y causan daños severos en las membranas por peroxidación de lípidos (Li *et al.*, 2010; Munné-Bosch y Peñuelas, 2003).

Para evitar el efecto de las ROS, la planta utiliza mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Es de esperarse que, especies vegetales tolerantes al estrés hídrico presenten una mayor actividad antioxidante, con producciones altas de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX), creando un balance entre la formación de ROS y la detoxificación. La actividad APX y CAT se acumula rápidamente en estados tempranos de estrés y mantiene niveles altos en estados avanzados en plantas tolerantes, lo cual supone que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es rápidamente eliminado (Yin *et al.*, 2010).

El cierre estomático producto de la condición de déficit hídrico en la planta ocasiona muchas de las limitaciones metabólicas y de las respuestas vegetales como disminución en la síntesis de Adenosin trifosfato (ATP) y en la regeneración de ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) o en condiciones más severas se presenta fotoinhibición (Flexas y Medrano, 2002).

Como mecanismo de defensa al estrés abiótico las plantas realizan procesos de ajuste osmótico para mantener el turgor y volumen celular con el fin de conseguir un continuo funcionamiento de su aparato fotosintético, a través de la síntesis de solutos intracelulares. Algunos metabolitos como prolina, glicin-betaína y ectoína, y los azúcares (fructosa, sacarosa, mio-inositol, trehalosa y fructanos) son agentes osmóticos u osmoprotectantes que permiten este ajuste osmótico en las plantas (Yang *et al.*, 2011).

En muchos estudios se ha asociado el aumento en los contenidos de prolina a la capacidad tolerante de algunas especies vegetales ante eventos de estrés abiótico, tales como sequía, salinidad, altas temperaturas e inundación (Arbona *et al.*, 2010; Freitas de Campos *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, en muchos casos esta tolerancia no es debida al papel que desempeña la prolina en el ajuste osmótico, sino al rol que desempeña como agente protector frente a daños oxidativos eliminando las ROS (Freitas de Campos *et al.*, 2011).

Tanto el estrés hídrico, como la invasión patogénica generan en la planta estrés oxidativo. Este tipo de estrés está caracterizado por la producción de ROS. En plantas

tolerantes los contenidos de prolina aumentan considerablemente, manteniendo el turgor celular y protegiendo las estructuras celulares ante el daño oxidativo.

La reducción de oxígeno producto de las inundaciones lleva además a una limitación en la disponibilidad de moléculas aceptoras en el proceso final de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, generando una disminución en la proporción ADP:ATP. Cuando las células presentan esta crisis energética optan por acelerar la actividad glicolítica y la fermentación para generar ATP y NAD<sup>+</sup> respectivamente (Bailey-Serres y Voeseneck, 2008). Esta inducción en el metabolismo fermentativo, que puede ser de tipo alcohólico o láctico, es una estrategia que permite mantener la capacidad de síntesis de ATP. La ruta de fermentación alcohólica es preferida por las plantas tolerantes a la inundación (Yin *et al.*, 2010).

Estos procesos de respiración oxidativa causan daños metabólicos a través de las rutas fermentativas, como sobreacumulación de etanol o la producción y almacenamiento de acetaldehído que alteran la semipermeabilidad del protoplasto, o la acumulación de lactato que produce una acidificación del citoplasma llevando a la destrucción del tonoplasto y de las estructuras mitocondriales (Li *et al.*, 2010).

Se ha documentado que las plantas sensibles a la hipoxia presentan una fermentación láctica muy temprana y en las plantas tolerantes este proceso es más claro en estados avanzados de la inundación. La acumulación de alcohol es menos tóxica que la acumulación de ácido láctico y por ello una mayor actividad de la fermentación alcohólica es indicador de la habilidad de la planta para sobrevivir a la hipoxia sin sufrir daño celular importante (Li *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2010).

La reducción en el contenido de los azúcares, como sustrato para la vía glicolítica, son también un efecto de la inundación. Estas reducciones en los contenidos de azúcares dependen de la especie y de la duración de la inundación. La reducción en el contenido de azúcares solubles en el sistema son un indicativo de tolerancia al estrés, debido a un más alto suplemento energético (Yang *et al.*, 2011).

## 2.2 Metodología

### 2.2.1 Diseño de experimentos y muestreo

Para el análisis de la respuesta bioquímica de las plantas de uchuva bajo estrés por anegamiento y ataque de *F. oxysporum*, se realizó el montaje en invernadero usando las mismas condiciones y el mismo diseño experimental descrito en el numeral 1.2.2 (diseño de experimentos y muestreos del capítulo anterior). El diseño fue completamente al azar con 3 réplicas y 3 tratamientos más control absoluto. Los tratamientos son inoculación con *F. oxysporum* cepa Map5, inundación de las plantas por 6 días consecutivos, y plantas inoculadas con *F. oxysporum* cepa Map5 e inundadas 48 horas después de la inoculación con el patógeno. Del material vegetal colectado de las 20 plantas por tratamiento en los muestreos destructivos, se tomó muestra de hoja y raíz por separado, se conservó a -80°C y luego se maceró con nitrógeno líquido para las determinaciones bioquímicas de contenidos de prolina y azúcares reductores. Estos muestreos se realizaron los días 0, 8, 18 y 31 después de la inoculación (ddi).

### 2.2.2 Contenidos de prolina en hoja y raíz

Esta determinación se realizó siguiendo el método de Bates *et al.* (1973) y modificado por Melgarejo *et al.* (2010). Este método tiene como fundamento la descarboxilación de los aminoácidos que realiza la ninhidrina como agente fuertemente oxidante. La molécula de amoniaco formada reacciona con una segunda molécula de ninhidrina protonada para producir un pigmento, del cual sólo el átomo de nitrógeno pertenece al aminoácido.

Para la determinación del contenido de prolina se realizó primero la curva de calibración (Anexo 5a) en la que se interpolan los datos obtenidos de las muestras de las plantas. El método de Bates *et al.* (1973), indica que el material vegetal que debe ser macerado para la determinación del contenido de prolina es de 0.5 g, pero tras ensayos previos en donde se probaron pesos de 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,02 y 0,01 g, se tomó la decisión de usar un peso de material vegetal macerado de 0,015 g para el tejido foliar y 0,2 g para el tejido de raíz. El tejido macerado se dispuso en un tubo de reacción tipo falcon de 15 ml, y en cada tubo se agregaron 5,0 ml de solución extractora de ácido sulfosalicílico 3%

(p/v). Se agitó a temperatura ambiente y en agitador horizontal por 60 minutos y se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos a 10°C. Se tomó 1,0 ml de sobrenadante, haciéndolo reaccionar con 1,0 ml de ninhidrina y 1,0 ml de ácido acético glacial tibio. Tras un calentamiento en baño María por 1 hora se enfrió bruscamente sobre hielo-agua. Una vez a temperatura ambiente se adicionó 3,0 ml de tolueno. La absorbancia se leyó a 520 nm en el espectrofotómetro BioRad SmartSpec™ 3000, usando como blanco tolueno.

### 2.2.3 Contenido de azúcares reductores en hoja y raíz

Esta determinación se realiza siguiendo el método de Nelson (1944)-Somogyi (1952) y modificado por Melgarejo *et al.* (2010). En esta reacción se forma un complejo entre el tartrato de sodio y potasio y el  $\text{Cu}^{2+}$  a pH menor a 7,0, el cual es capaz de oxidar azúcares que contengan extremo reductor. La reducción cuantitativa del  $\text{Cu}^{2+}$  para la generación de óxido cuproso  $\text{Cu}_2\text{O}$ , reacciona formando un complejo que puede ser leído a 660nm.

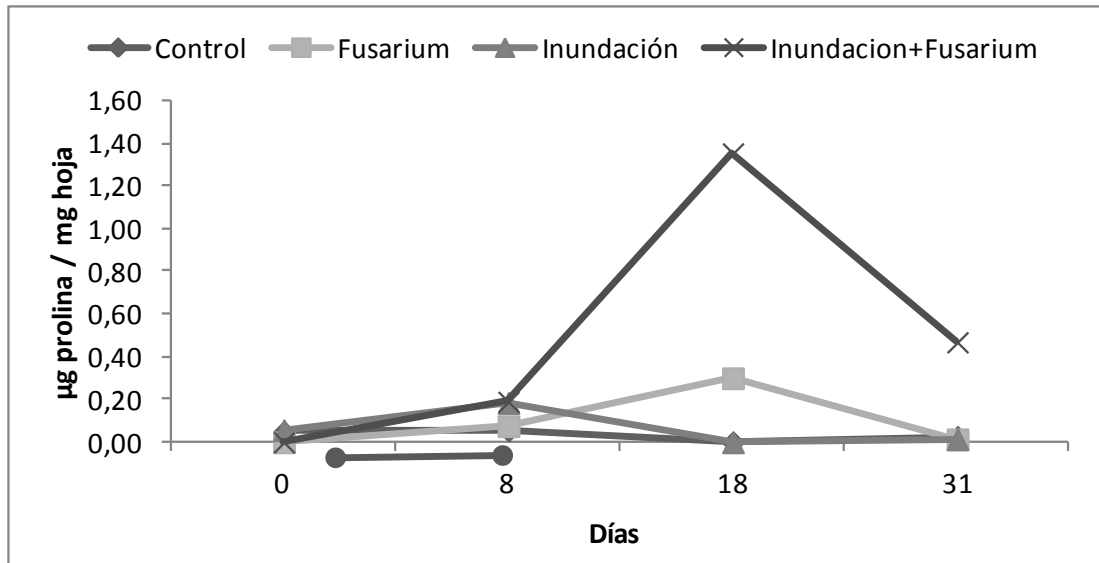
Para la determinación del contenido de azúcares reductores se realizó primero la curva de calibración (Anexo 5c) en la que se interpolan los datos obtenidos de las muestras de las plantas. Los ensayos previos en donde se probaron 150 y 100 mg de material fresco macerado, confirmó que para tejido foliar y radical el peso adecuado de material macerado era de 150 mg, correspondiendo con lo recomendado por Somogyi - Nelson. El tejido macerado con nitrógeno líquido se dispuso en un tubo de reacción tipo falcon de 15 ml, y en cada tubo se agregaron 4,0 ml de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,0. Se agitó a temperatura ambiente y en agitador horizontal por 60 minutos y se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos a 12°C. En un tubo eppendorf de 2,0 ml se mezclaron 240  $\mu\text{L}$  del buffer acetato de sodio y 30  $\mu\text{L}$  del extracto. Sobre cada mezcla, se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo Somogyi I y 50  $\mu\text{L}$  del reactivo Somogyi II. Tras Agitación en vórtex por 20 segundos se calentó en agua (85-90 °C) por 1 hora. Finalmente se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de reactivo de Nelson y se leyó la absorbancia a 660 nm en el espectrofotómetro BioRad SmartSpec™ 3000, comparándolo contra el blanco de la reacción.

## 2.3 Resultados

Debido a que la infección por *F. oxysporum* en las plantas genera un taponamiento de los haces vasculares y produce en la planta una sintomatología similar a la presentada bajo eventos de estrés por déficit hídrico, se midieron los contenidos de prolina, un aminoácido que actúa como agente regulador del ajuste osmótico celular.

Los niveles de prolina presentes en las hojas de las plantas de uchuva bajo estudio (figura 2-1), mostraron que esta especie vegetal es una planta sensible a la inundación y a la infección por *F. oxysporum*. La respuesta de las plantas bajo inundación muestra un ligero aumento de la producción de prolina hacia el día 8 ddi, momento en el que se retiró la condición de anegamiento y a partir de allí los niveles bajaron a causa de la ausencia de estrés en las plantas. En las plantas inoculadas con el patógeno se evidencia un ligero aumento de los contenidos de prolina hacia el día 18 ddi con 0,39 µg de prolina/mg de tejido de hoja con respecto al control, mientras que el aumento en las plantas inoculadas e inundadas fue de 1,47 µg de prolina/mg de tejido de hoja. Estos aumentos se dan como respuesta de las plantas ante el evento de estrés oxidativo causado tanto por el estrés hídrico como por el ataque del patógeno. El impacto del estrés sobre el metabolismo de las plantas fue severo y causó una disminución drástica de estos niveles de prolina hacia el día 31 ddi, dejando a la planta vulnerable al estrés oxidativo, coincidente con los daños observados en la sintomatología foliar de las plantas.



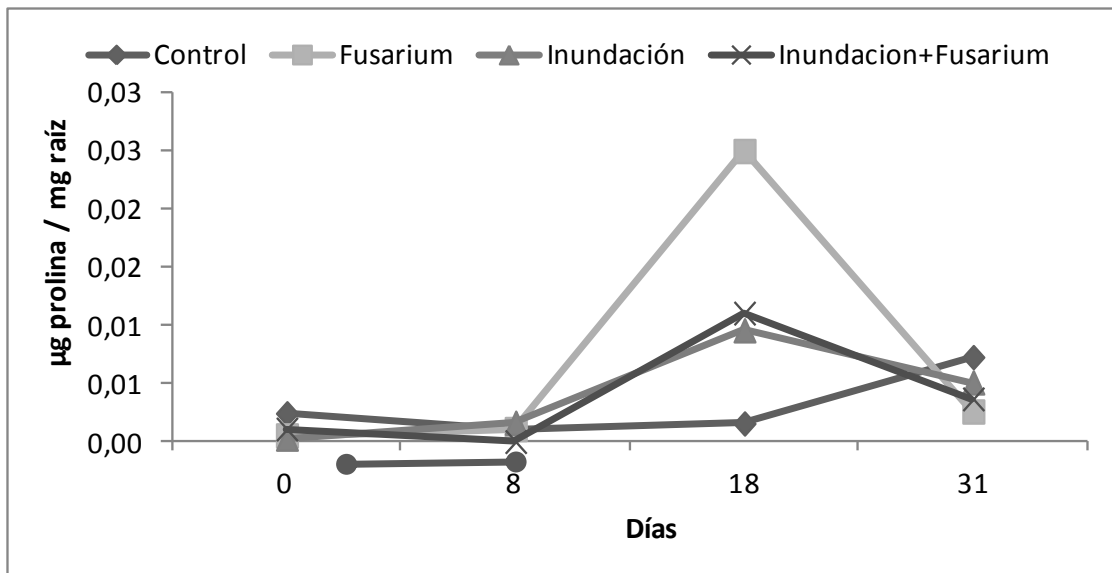


**Figura 2-1:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre el contenido de prolina en las hojas de plantas de uchuva. La línea azul por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación.

Aunque las diferencias estadísticas no son significativas (Anexo 8, numeral 8.1) por tratarse de pruebas realizadas sobre los promedios de los tratamientos, existen diferencias puntuales en el día 18 y 31 ddi en el tratamiento de la inundación más la inoculación con respecto a los demás tratamientos.

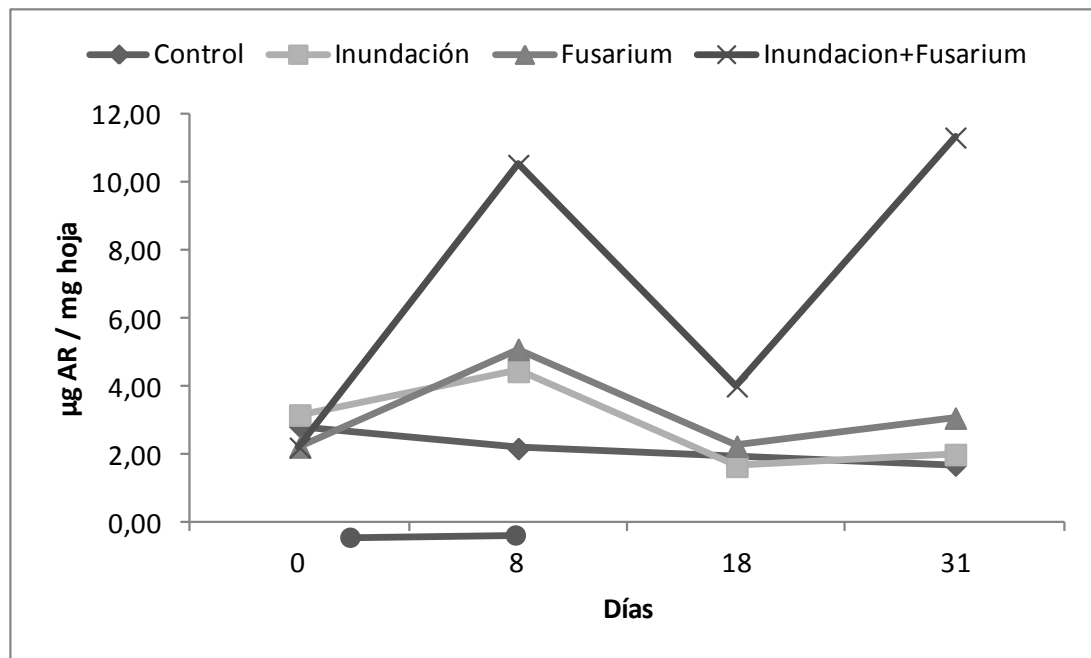
La figura 2-2, muestra las variaciones en los contenidos de prolina en las raíces a través del período del ensayo. El día 18 ddi, el tratamiento de inoculación con *F. oxysporum*, mostró un aumento significativo en los niveles de prolina en la raíz con 0,029 µg de prolina/mg de raíz, por encima del valor obtenido en las plantas control. Los tratamientos de inundación y el de inundación más la inoculación con el patógeno aunque también aumentaron su contenidos de prolina hacia el día 18 ddi, no fueron tan drásticos como el tratamiento de solo inoculación. Todos los tratamientos mostraron un descenso significativo en el período final del ensayo, alcanzando niveles inferiores a los encontrados en las plantas control.

Aunque no existen diferencias significativas estadísticamente (Anexo 8, numeral 8.2), pueden observarse pequeñas diferencias en los contenidos de prolina de las raíces, principalmente en las plantas inoculadas con *F. oxysporum*.



**Figura 2-2:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre el contenido de prolina en las raíces de plantas de uchuva. La línea azul por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación.

Las mediciones realizadas para conocer las variaciones en los contenidos de azúcares reductores (AR) en hojas de las plantas de uchuva (figura 2-3), muestran aumentos en los niveles de estas sustancias en dos picos para el tratamiento de inoculación e inundación siendo el primero reportado el día 8 ddi con aumentos de 8,36 µg de AR/ mg de hoja por encima del control y el segundo el día 18 ddi con aumentos de 2,05 µg de AR/ mg de hoja. Estos mismos picos pueden observarse de forma bastante sutil en los tratamientos de inundación y en el de la inoculación con el patógeno aunque sin diferencias significativas (Anexo 8, numeral 8.3).



**Figura 2-3:** Efecto de la inundación por 6 días continuos y de la inoculación con *F. oxysporum* sobre el contenido de azúcares reductores en plantas de uchuva. La línea azul por debajo del eje x indica los datos tomados durante el período de inundación.

## 2.4 Discusión de resultados

Los diferentes tipos de estrés considerados en este trabajo, convergen en un estrés hídrico por déficit, que afecta las plantas a nivel morfológico y fisiológico, generando en las células efectos tales como acumulación de prolina. Ante tales eventos, las plantas responden deteniendo el crecimiento de todos sus órganos, cerrando estomas, disminuyendo las tasas fotosintéticas, acelerando la senescencia, aumentando el aborto floral, incrementando la proporción raíz/parte aérea y removilizando sus reservas de fotoasimilados (Boomsma y Vyn, 2008).

Las plantas tolerantes al déficit hídrico tienen la capacidad de acumular mayor cantidad de prolina en sus células y los niveles de respuesta dependen de la presión ejercida por el estrés (Arbona *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Freitas de Campos *et al.*, 2011). Bajo este panorama podemos concluir que las plantas de uchuva son plantas sensibles a la condición de déficit hídrico interno causado por la limitación en absorción de agua y

nutrientes producto del taponamiento de haces vasculares por parte de *F. oxysporum* y al cierre estomático generado por la inundación y la presencia del patógeno.

En la figura 2-1 y 2-2 se pueden observar los aumentos en los niveles de acumulación de prolina tanto en hojas como en raíces. Las acumulaciones de prolina en las plantas de uchuva se dan como respuesta a las condiciones de estrés hasta el día 18 ddi, momento en el que el nivel de estrés aumenta, limitando todas las respuestas bioquímicas y fisiológicas de la planta, por lo que posteriormente los niveles de prolina descienden, dejando a la planta expuesta al daño oxidativo por ROS y a la pérdida total del agua en los tejidos.

La acumulación que realizan las raíces de las plantas de uchuva son incipientes comparadas con las acumulaciones que realizan en las hojas. Mientras que las hojas de plantas inoculadas alcanzan valores de 0,3 µg de prolina/ mg de tejido, en las raíces alcanzaron solamente 0,025 µg de prolina/ mg de tejido. A pesar de ser este tratamiento de inoculación con el patógeno el que obtuvo los niveles más altos de prolina a nivel radical, a nivel foliar no mostró este mismo comportamiento.

En las hojas el efecto del estrés hídrico por exceso y del patógeno es más evidente logrando las mayores acumulaciones de prolina al día 18 ddi, en plantas sometidas a estos dos tipos de estrés, con acumulaciones de hasta 1.4 µg de prolina/mg de hojas. Al contrastar los niveles de acumulación de prolina alcanzados en las hojas de las plantas de uchuva inoculadas y en las plantas inoculadas e inundadas, se observa claramente que la capacidad de acumulación de prolina en los tejidos no depende exclusivamente de la especie vegetal, sino que también incide el tipo de estrés y la presión ejercida por este sobre el sistema vegetal (Arbona *et al.*, 2010).

La inundación por 6 días continuos en plantas de uchuva ocasionó un leve incremento en los niveles de acumulación de prolina, pero al ser retirada la condición estresante, las plantas disminuyeron este osmolito dentro de su sistema, mostrando una recuperación de las plantas, tal como pudo observarse en la respuesta fisiológica mostrada en el capítulo anterior.

Pero las acumulaciones de prolina no son la única estrategia que usan las plantas como mecanismo de ajuste osmótico celular. Los aumentos en los contenidos de azúcares también son consecuencia del impacto de diferentes tipos de estrés que generan estrés osmótico, tales como el estrés hídrico ya sea por déficit o por exceso y el estrés por salinidad. Como ya se ha dejado claro a través del presente documento, el patógeno considerado en este ensayo, el hongo *F. oxysporum*, tapona los haces vasculares impidiendo el paso de agua y nutrientes, lo que redundará en estrés hídrico por déficit.

La acumulación de azúcares en plantas tolerantes a la condición de déficit hídrico, actúa como un osmolito compatible que permite mantener el ajuste osmótico celular. Pero la glucosilación de estos azúcares en especial en los azúcares reductores (AR) provocan la alteración de las proteínas (Hong Bo *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2010).

La reacción de glucosilación puede revertirse cuando se encuentra en etapas iniciales, pero los períodos de esta reacción son muy cortos, mientras que las etapas finales de la glucosilación transcurren más lentamente y son irreversibles. Se postula que la glucosilación está implicada en los procesos de envejecimiento celular.

Las acumulaciones de AR en las hojas de las plantas de uchuva (Figura 2-3), sometidas a estrés por inundación o a la inoculación con el patógeno, no mostraron una respuesta significativa con respecto al control. Los aumentos en los contenidos de AR observados en estos dos tratamientos al día 8 ddi, responden a un estrés hídrico inicial provocado en las plantas inundadas por el cierre estomático producto del exceso de agua e hipoxia en la raíz y en las plantas inoculadas por la resistencia provocada por las raíces al evitar el ingreso del hongo. Los descensos posteriores a este período inicial de estrés se ocasionan porque probablemente el nivel de estrés ocasionado en las plantas no fue el suficiente para inducir la respuesta en acumulación de AR.

Por el contrario, la respuesta observada en las plantas de uchuva sometidas a estrés por inundación e inoculación con el patógeno, generaron un fuerte estrés en las plantas, ocasionando grandes acumulaciones de AR en las hojas. El primer pico de acumulación que muestran las plantas de uchuva, responden a un ajuste osmótico que realiza la planta a causa del déficit hídrico por el impedimento en la absorción y transporte de agua. Respondiendo a la ruta de la glucosilación, la disminución de estos niveles de AR en las hojas hacia el día 18 ddi se ocasionan por la glucosilación de los AR, siendo este

evento partícipe de la pérdida de turgencia de las hojas, la clorosis, la defoliación y el estrangulamiento del cuello.

Las mediciones de AR en raíces, así como de la acumulación de azúcares totales (AT) en hojas y raíces, fueron obtenidas en los mismos períodos y sobre las mismas plantas pero los datos no se muestran por no ser concluyentes para este trabajo.







### **3. Respuesta anatómica y morfológica de plantas de uchuva (*P. peruviana* L.), bajo condición de anegamiento y ataque de *F. oxysporum***

#### **3.1 Introducción**

La inundación genera en las plantas disminuciones en la disponibilidad de oxígeno, de manera directa desde las raíces y de forma indirecta desde la parte aérea de la planta. En estas plantas que sufren hipoxia o anoxia en casos avanzados de estrés, se generan tres etapas de respuesta en las plantas. La primera de ellas produce cambios en la asimilación del carbono inhibiendo los procesos fotosintéticos y las relaciones funcionales entre las raíces y la parte aérea. La segunda etapa involucra procesos bioquímicos de fermentación y acumulación de sustancias de ajuste osmótico y antioxidantes o sustancias que actúan como tales; y en la tercera etapa se generan cambios morfológicos y anatómicos (Wei *et al.*, 2013).

Esta respuesta final al anegamiento en las plantas tolerantes, forman raíces adventicias, aerénquima y lenticelas hipertrofiadas. Por medio de estas estructuras se aumenta la capacidad de capturar oxígeno y transportarlo a los tejidos que lo demandan (Yin *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2013). Los cultivos tolerantes al anegamiento poseen un aerénquima perfectamente desarrollado, lo que les permite mantener los contenidos de O<sub>2</sub> necesario para sus procesos y absorber los nutrientes necesarios. En otras especies vegetales, la formación de raíces adventicias garantiza la captura de O<sub>2</sub> desde el aire y gracias a ello la absorción de nutrientes. En tomate, única solanácea en la que se han encontrado reportes del efecto de la inundación, se han reportado la producción de raíces adventicias y se cree que desde estas se estarían produciendo hormonas que estimulan el crecimiento de la planta (Ezin *et al.*, 2010).

Por otro lado, cuando las plantas se encuentran siendo colonizadas por algún tipo de patógeno, muestran alteraciones en sus estructuras celulares por destrucción de las paredes celulares e invasión de micelio en los espacios inter e intracelulares, entre otros. En el caso de *Fusarium* sp., aunque los mecanismos de colonización cambien de acuerdo a la patogenicidad de la cepa y al tipo de planta en consideración, este hongo en general coloniza las capas epidermales de la raíz y avanza hasta alcanzar los haces vasculares, penetrando las células corticales, creciendo en los espacios intercelulares y rompiendo algunas células en su paso. Observaciones al microscopio de este micelio en los espacios intercelulares han dado cuenta de la presencia además de algunas microconidias (Jaroszuk-Scisel *et al.*, 2008).

El hongo utiliza el xilema como un sistema de transporte para propagarse y distribuirse por la planta no solamente mediante el crecimiento rápido de sus hifas sino también con la de microconidias (Cruz *et al.*, 2011).

El crecimiento del hongo dentro del sistema vascular de la planta produce en esta una respuesta física que intenta impedir el avance del patógeno, para lo cual genera geles, gomas y tilosas, que funcionan como barreras para detener la evolución de la infección (Cruz *et al.*, 2011).

Por esta razón y como se ha venido discutiendo a través del documento, se observan algunos síntomas similares a los generados en condición de déficit hídrico. La agresividad de la infección depende de las condiciones ambientales en las que se desarrolle la interacción y de la edad de la planta, ampliando o disminuyendo el período de incubación del patógeno (Agrios, 2005).

Con el objetivo de contribuir con el reconocimiento de la respuesta fisiológica de uchuva en ambientes con estrés tanto biótico como abiótico y de su respuesta en ambientes reales en donde las dos condiciones de estrés pueden generarse de forma simultánea, se realizó un seguimiento histológico del cuello de las plantas de uchuva a través del período de ensayo, observando los cambios anatómicos sufridos en la planta por

inundación, invasión de *F. oxysporum* y la combinación de estos, comparado con plantas sanas y sin estrés.

## **3.2 Metodología**

### **3.2.1 Material vegetal**

Junto con las plantas de uchuva ecotipo Colombia de 2 meses de edad, que se encontraban sometidas a los ensayos respectivos de inundación, inoculación, inundación más inoculación y el control, para las mediciones fisiológicas, agronómicas y bioquímicas de las que anteriormente se presentaron los resultados en los capítulos 1 y 2; se contó con seis plantas por tratamiento, dichas plantas fueron procesadas mediante técnicas histológicas para la observación de los cambios morfo-anatómicos de los tejidos del cuello de raíz, los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ddi.

De estas plantas se tomaron igualmente explantes de tejido de cuello para realizar el aislamiento del agente patogénico sospechoso. La razón para no realizar ni los aislamientos ni los cortes de la zona radical de las plantas, radica en que este tejido por encontrarse en algunos de los tratamientos bajo agua, contenía una carga bacteriana alta y el aislamiento del patógeno así como los cortes del tejido se dificultan bastante por contaminación y destrucción de las paredes celulares.

### **3.2.2 Marcha histotécnica**

En los muestreos destructivos se tomó aproximadamente un centímetro de cuello de raíz. Estos trozos de material fueron inmediatamente fijados en el reactivo Bouin por 24 horas (h), en una proporción de 1:20 entre el material vegetal: fijador. Una vez fijados los tejidos se realizó la deshidratación de los tejidos por medio de inmersiones en etanol a concentraciones de 70, 80, 90, 96 y 96%, por 24 h en cada una de las concentraciones de

alcohol. Por último, los tejidos se pasaron por un proceso final de deshidratación en terbutanol por 24 h y parafina pura por 24 h más. Finalmente, los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina.

Los cortes de los tejidos se realizaron en un micrótopo de rotación tipo Minot modelo 820 marca Spencer (American Optical, Delhi), con cortes cada 0,3 mm de tejido.

Luego del montaje de los cortes en las láminas, se realizó el proceso de tinción por contraste con safranina y fast-green. Esta técnica de tinción considera los siguientes pasos: 1) Dos pases sucesivos en Xilol durante 10 min cada uno; 2) dos pases por etanol 96%, 5 min cada uno; 3) lavado con agua corriente por 2 min; 4) Safranina por 24 horas; 5) Alcohol pícrico, 10 min; 6) lavado en agua corriente durante 5 min; 7) alcohol amoniacal por 2 min; 8) lavado con agua corriente 5 min; 9) etanol al 96%, 5 min; 10) fast-green, 10 seg; 11) esencia de clavos, 2 min; 12) etanol al 96%, 5 min; 13) isopropanol, 5 min; 14) xilol, 10 min; 15) montaje con resina y cubreobjetos (Ortiz, 2011). Las observaciones se realizaron con microscopía de luz en un microscopio marca Spencer en aumentos de 4 a 100x.

Los cortes observados al microscopio que presentaban posibles estructuras fúngicas en sus células vasculares (conidias y micelio), fueron sometidas a una tinción adicional con la técnica de tinción PAS (ácido peryódico o tinción de Schiff), para la observación detallada de las estructuras fúngicas.

La tinción ácido peryódico – reactivo de Schiff (PAS) realizada, fue tomada del protocolo de tinción de Cook (1974) citado por Ortiz (2011). El proceso de la técnica de tinción PAS consiste en: 1) dos pases de Xilol, 5 min cada uno; 2) dos pases por etanol al 96%, 5 min cada uno; 3) lavado con agua corriente; 4) Las láminas se colocan en un puente de coloración y se adicionan gotas de ácido peryódico al 0.7% durante 5 min, directamente sobre los cortes; 5) Lavar con agua corriente; 6) Agregar gotas del reactivo de Schiff durante 15 min; 7) lavar con agua corriente; 8) fast-green por 2 seg; 9) esencia de clavos, 2 min; 10) dos pases en alcohol al 96%, 5 min cada uno, 11) isopropanol, 5 min y 12) xilol, 10 min (Ortiz, 2011).

### 3.2.3 Aislamientos del patógeno del material vegetal

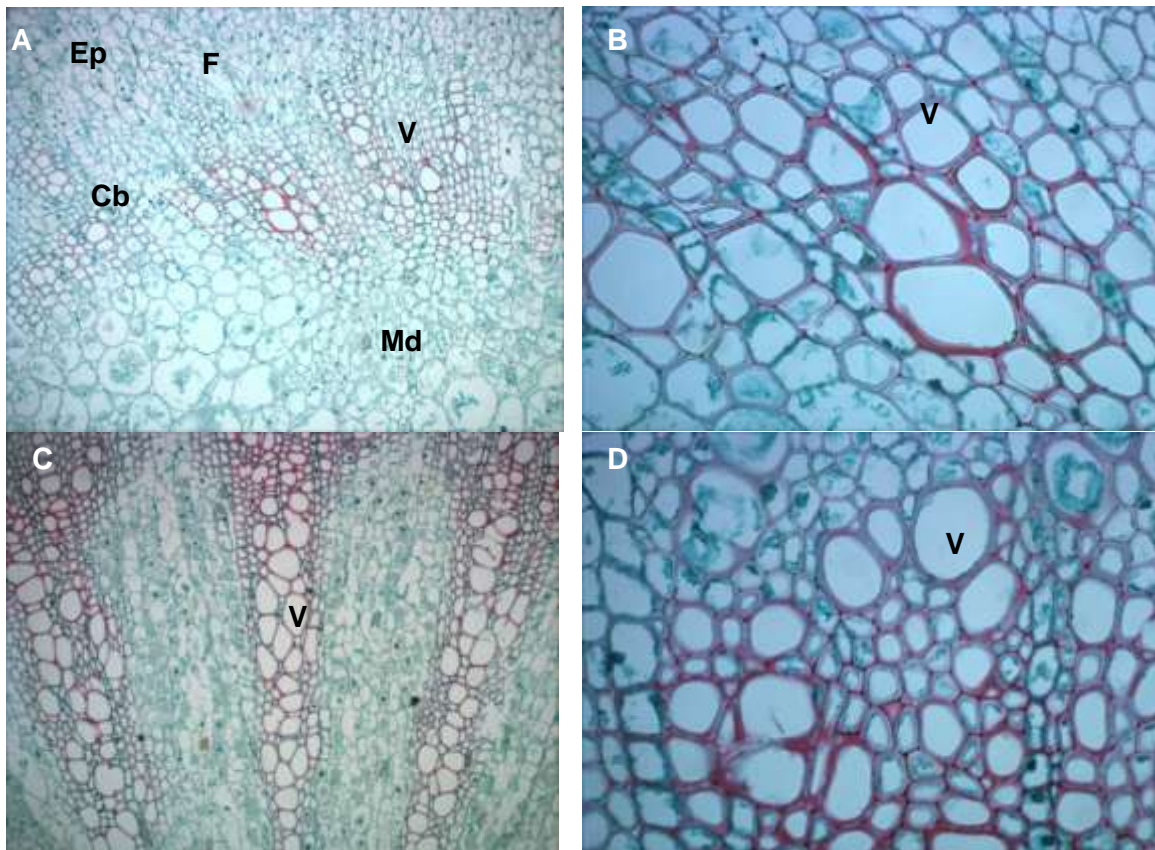
De las porciones de tejido de las plantas de uchuva que se tomaron para la realización de la marcha histotécnica, se tomó una parte de este tejido para ser sembrado en medio de cultivo en medio de cultivo y comprobar la presencia de *F. oxysporum*, previamente inoculado en las plantas tratamiento cuyo proceso se describió en el capítulo 1, en el numeral 1.2.4 de la metodología.

El tejido pasó por un proceso de desinfección que consistió en lavado con agua corriente, hasta retirar todas las impurezas visibles y luego en condiciones estériles inmersión del tejido en hipoclorito de sodio al 2% por 1 min, inmersión en etanol al 70% por 30 segundos y un triple lavado con agua destilada estéril. Los tejidos se secaron con papel absorbente estéril y se colocaron los trozos en cajas de petri con medio de cultivo PDA con cloranfenicol (1 g/L). Tras incubación por 7 días a 37°C se observa si hay crecimiento micelial y se confirman las estructuras de *F. oxysporum*.

## 3.3 Resultados

### 3.3.1 Marcha histotécnica

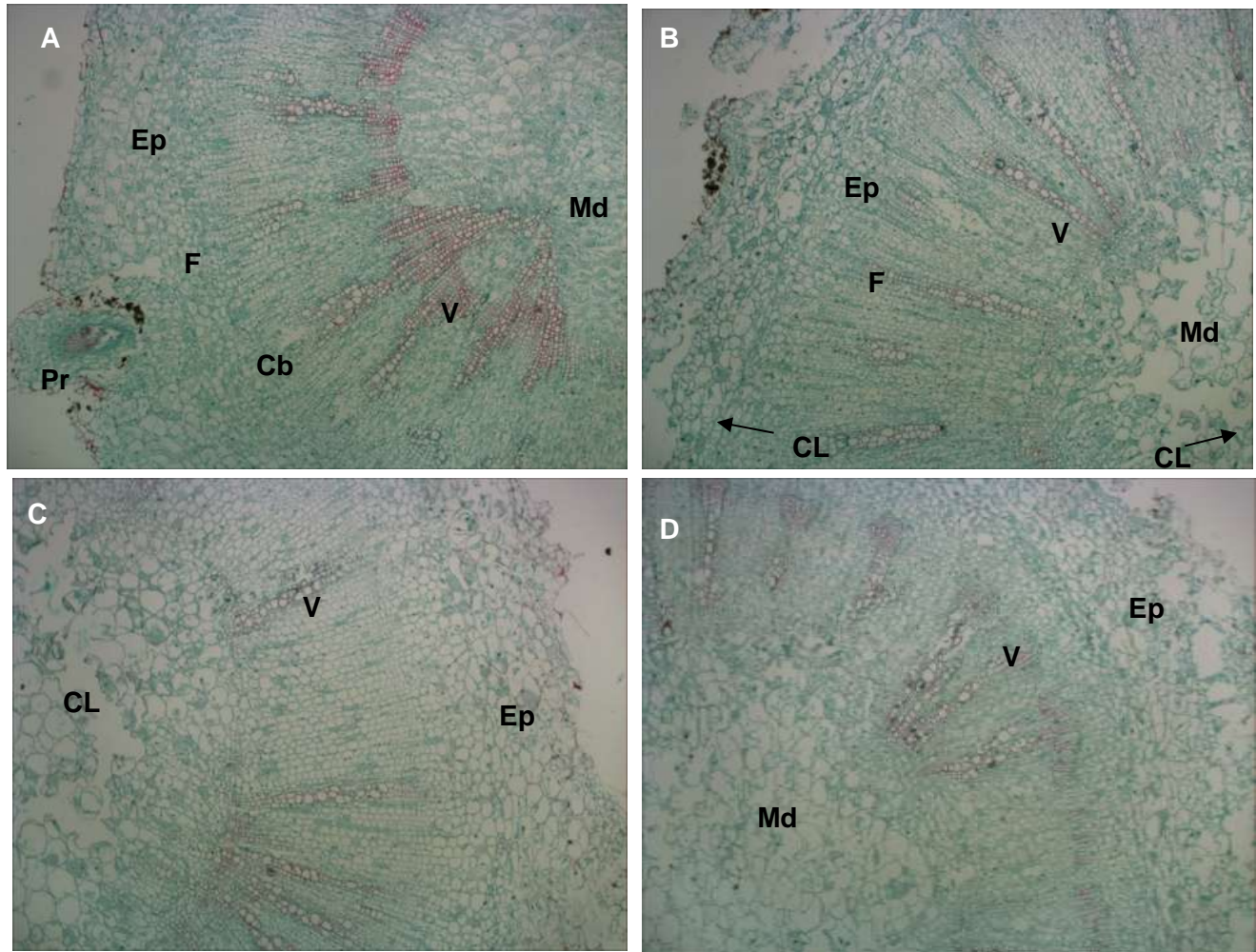
La figura 3-1 muestra los cortes transversales realizados sobre el cuello de raíz de las plantas control, siendo clara la distribución celular típica de una planta dicotiledónea. Las fotografías, permiten observar claramente vasos xilemáticos, tejidos floemáticos y células del parénquima y de la médula sanas, paredes celulares completas y sin presencia de estructuras fúngicas.



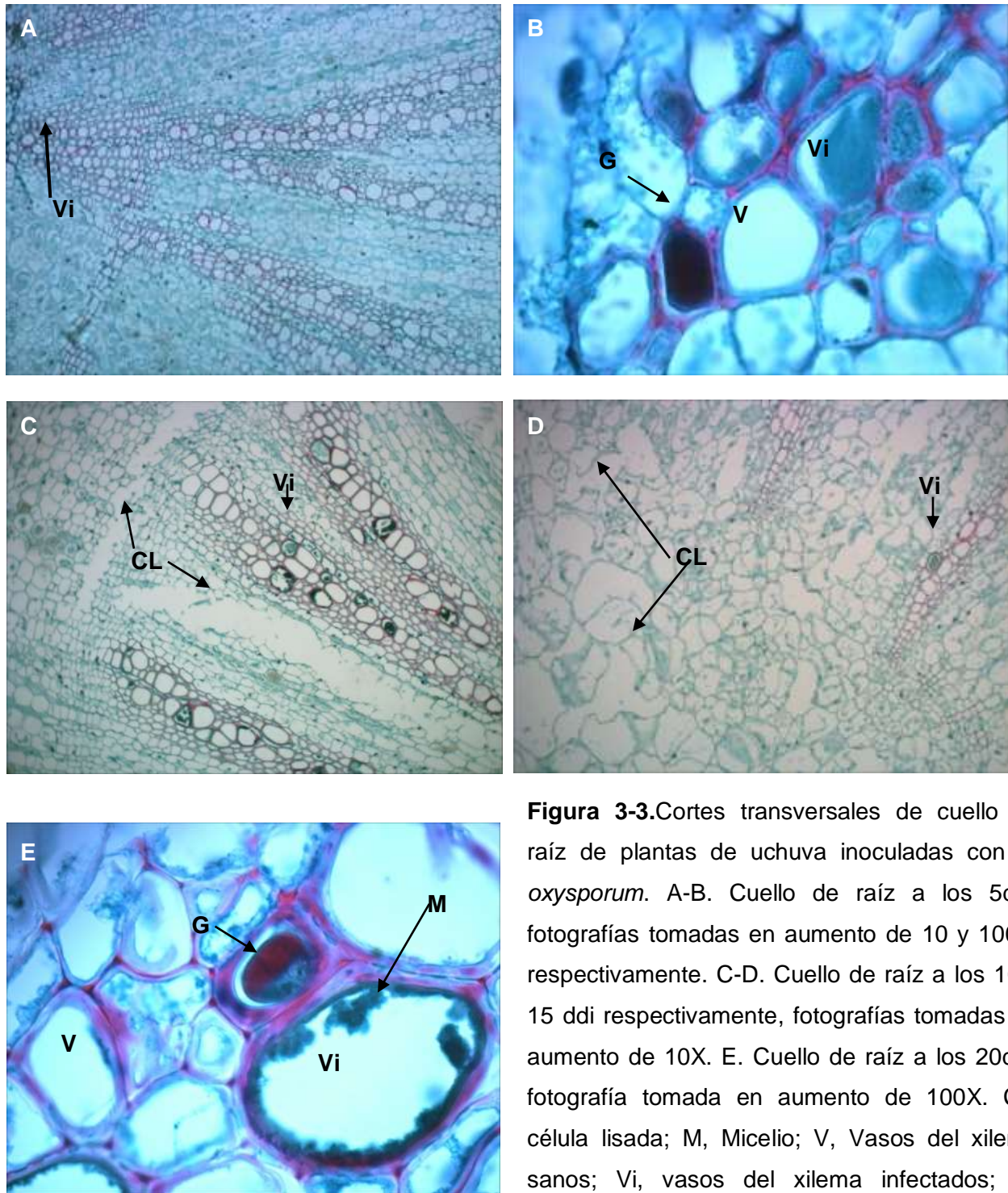
**Figura 3-1.** Cortes transversales de cuello de raíz de plantas de uchuva usadas como testigo. A-B. Cuello de raíz a los 5 ddi, en aumento de 10X y 40X respectivamente. C-D. Cuello de raíz a los 30 ddi, en aumento de 10X y 40X, respectivamente. Ep, Epidermis; Cb, zona de cambium; Md, Médula; V, Vasos del xilema; F, floema. Técnica de tinción Contraste con safranina y fast-green.

En la figura 3-2 se aprecian los cortes transversales del cuello de raíz realizados a las plantas de uchuva que fueron inundadas por seis días consecutivos. En los días 10 y 20 ddi (fotografías B y C) puede notarse la lisis de las células de la médula, evento clásico ante situaciones de anegamiento, que buscan crear espacios porosos dentro del sistema vegetal permitiendo el flujo de oxígeno. Hacia el día 30 ddi (fotografía D), la lisis se detuvo y se observa una médula en reconstitución, al igual que en la corteza. A pesar de la inundación los vasos del xilema no muestran taponamientos.





**Figura 3-2.** Cortes transversales de cuello de raíz de plantas de uchuva inundadas por seis días consecutivos. A. Cuello de raíz a los 5 ddi. B. Cuello de raíz a los 10 ddi. C. Cuello de raíz a los 20 ddi. D. Cuello de raíz a los 30 ddi. Fotografías tomadas en aumento de 4X. Ep, Epidermis; Cb, zona de cambium; Md, Médula; F, floema; V, Vasos del xilema; Pr, Primordio de raíz; CL, Células lisadas. Técnica de tinción Contraste con safranina y fast-green.



**Figura 3-3.** Cortes transversales de cuello de raíz de plantas de uchuva inoculadas con *F. oxysporum*. A-B. Cuello de raíz a los 5 ddi, fotografías tomadas en aumento de 10 y 100X, respectivamente. C-D. Cuello de raíz a los 10 y 15 ddi respectivamente, fotografías tomadas en aumento de 10X. E. Cuello de raíz a los 20 ddi, fotografía tomada en aumento de 100X. CL, célula lisada; M, Micelio; V, Vasos del xilema sanos; Vi, vasos del xilema infectados; G, Gomas. Técnica de tinción Contraste con safranina y fast-green



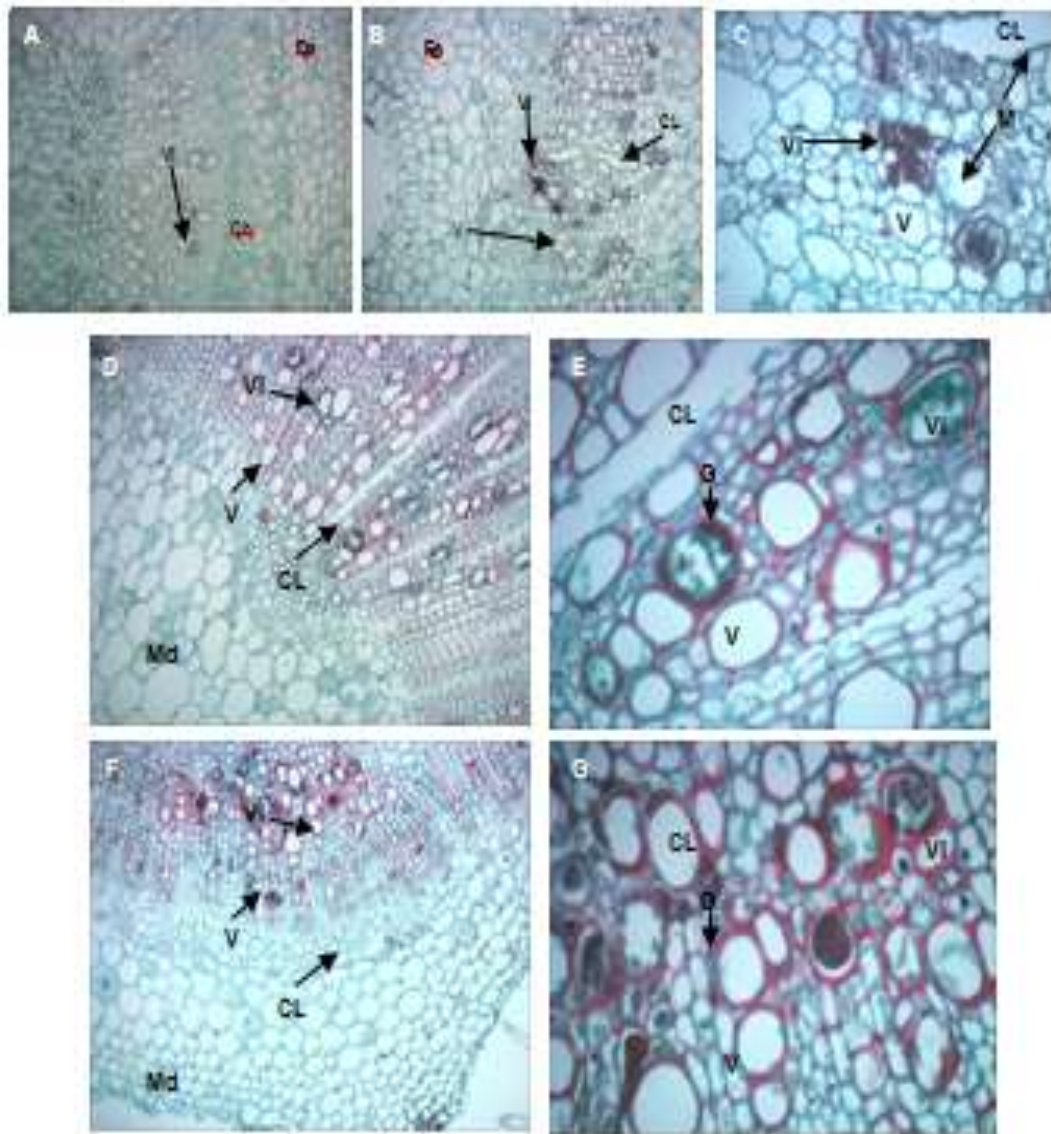
La figura 3-3 muestra los cortes transversales del cuello de raíz de las plantas de uchuva inoculadas con el hongo *F. oxysporum*. Estas fotografías muestran la secuencia de infección desde el día 5 ddi hasta el día 20 ddi. Las fotografías A y B, muestran fotografías a 10 y 100X, respectivamente de la misma porción del corte observado, en donde se aprecia la infección inicial, con producción de gomas por parte de la planta y crecimiento micelial al interior de las células del xilema.

La fotografía C, de esta misma figura, muestra un corte fotografiado en aumento de 10X en donde pueden observarse muchos más haces vasculares taponados por el micelio del hongo y células del haz vascular y del floema lisadas a causa de la penetración del patógeno, que avanza desde la corteza hasta alcanzar los vasos del xilema.

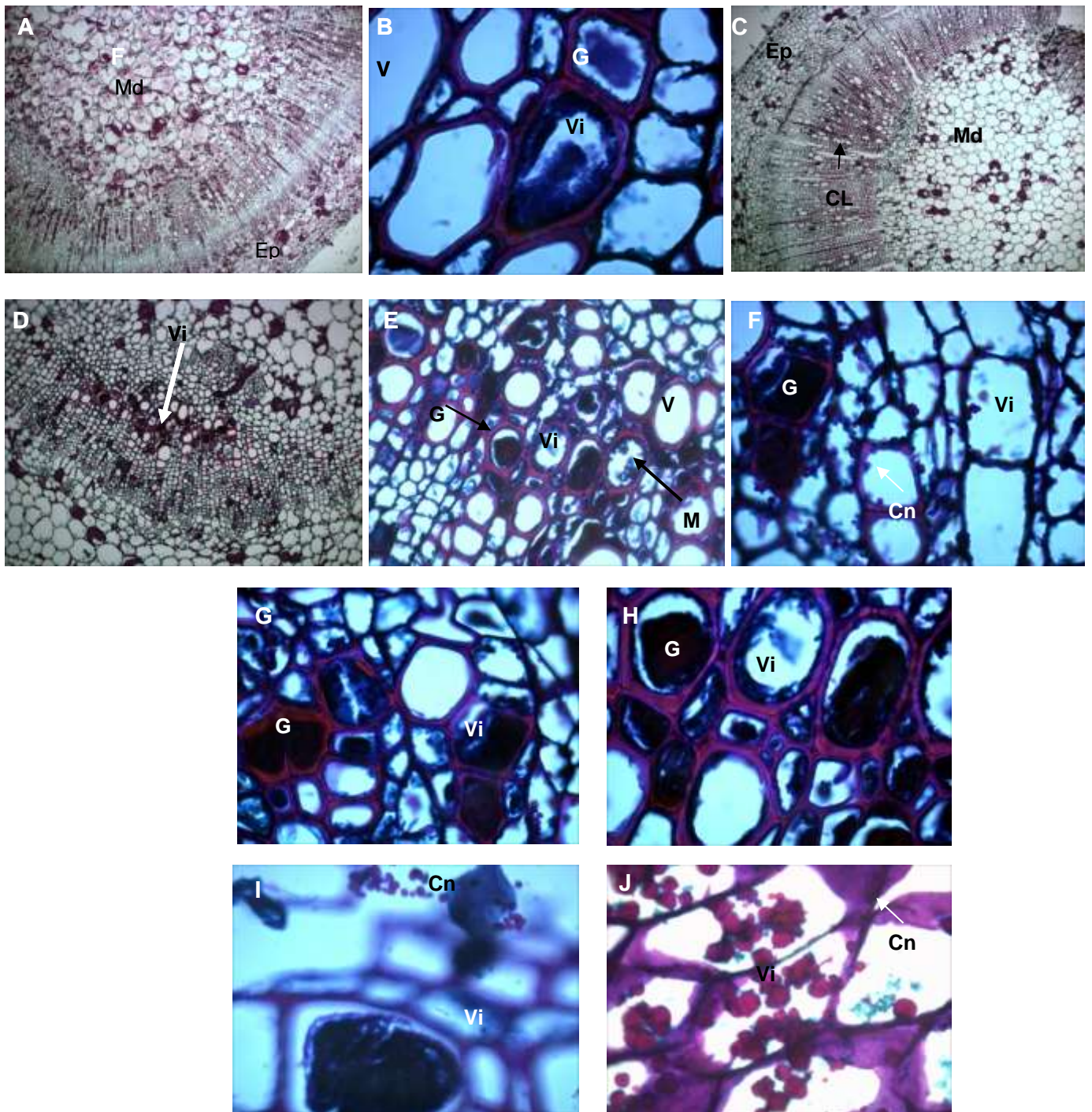
En la fotografía D, se pueden observar células de la medula lisadas y vasos del xilema infectados, a los 15 ddi. La última fotografía de la figura 3-3, muestra en un aumento de 100X como se forman gomas al interior de los vasos del xilema y en la célula adyacente el crecimiento micelial que sigue en aumento a través del sistema vascular de las plantas de uchuva.

Como ya se observó en los resultados del seguimiento fisiológico y bioquímico sobre las plantas de uchuva infectadas por *F. oxysporum*, la infección de este patógeno se ve favorecida por las condiciones limitantes del medio. En el caso de este trabajo la inundación generada en las plantas después de haber sido inoculadas con el hongo permitió una infección más acelerada, reduciendo los períodos de incubación y como puede observarse en las fotografías de las figuras 3-4 y 3-5, un crecimiento micelial y producción conidial dentro de la planta más agresivo y precoz.

Las fotografías A-C de la figura 3-4, muestran cómo los vasos del xilema fueron rápidamente taponados en un período de 5 días, del día 10 (fotografía A) al 15 ddi (fotografías B y C). El crecimiento micelial, la producción de gomas y la lisis celular fueron significativos en esta etapa. En las fotografías D y E, se puede observar la propagación del micelio a través de la planta, taponando nuevos haces vasculares y rompiendo las células del cambium y del floema para abrirse paso hacia nuevos vasos del xilema. Estos sucesos de taponamiento siguen avanzando hasta el día 20 ddi (fotografías F y G), con mucha más producción de gomas y crecimiento del micelio.



**Figura 3-4.** Cortes transversales de cuello de raíz de plantas de uchuva inoculadas con *F. oxysporum* e inundadas. A. Cuello de raíz a los 10ddi, 10X. B-C. Cuello de raíz a los 15 ddi, en 10 y 40X, respectivamente. D-E. Cuello de raíz a los 20ddi, en 10 y 40X, respectivamente. F-G. Cuello de raíz a los 30 ddi, en 10 y 40X respectivamente. Vi, Vasos del xilema infectados; Ep, epidermis; Cb, Zona de cambium; CL, célula lisada; V, vasos del xilema sanos; M, Micelio; Md, medula; G, Gomas. Técnica de tinción Contraste con safranina y fast-green



**Figura 3-5.** Cortes transversales de cuello de raíz de plantas de uchuva inoculadas con *F. oxysporum* e inundadas. A. Cuello de raíz a los 5 ddi, 4x. B. Cuello de raíz a los 20 ddi, en 100X. C. Cuello de raíz a los 25 ddi, en 4X. D. Cuello de raíz a los 30 ddi, en 10X. E-F. Cuello de raíz a los 30 ddi, en 40X. G-H. Cuello de raíz a los 30 ddi, en 40X. I-J. Cuello



de raíz a los 30 ddi, en 100X. Ep, epidermis; Md, medula; Vi, Vasos del xilema infectados; V, vasos del xilema sanos; CL, célula lisada; M, Micelio; G, Gomas; Cn, conidias. Técnica de tinción PAS.

Las fotografías de la figura 3-4 fueron teñidas con la técnica de contraste con safranina y fast-green y fueron estos cortes los que se sometieron a la tinción con la técnica PAS.

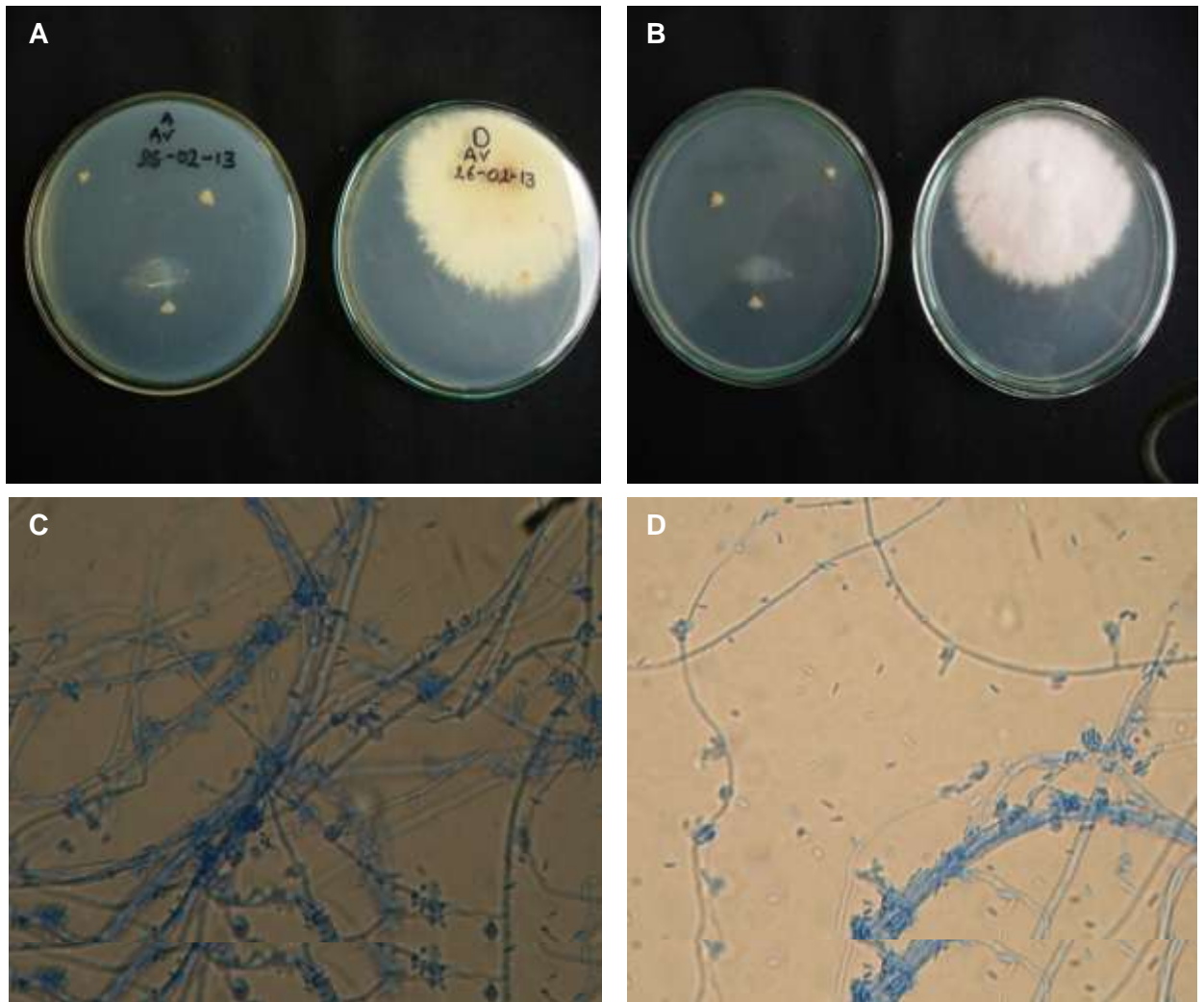
En la figura 3-5 se observan las fotografías de los cortes de cuello de raíz de las plantas de uchuva sometidas a la inundación tras la inoculación con el hongo *F. oxysporum*, teñidas con la técnica PAS. En estas fotografías puede observarse al igual que en la figura 3-4 el avance del taponamiento de los haces vasculares por el crecimiento de micelio por parte del hongo y la generación de gomas por parte de la planta, desde el día 5 hasta el día 30 ddi. Es de utilidad en esta figura observar las fotografías F a J, en las que gracias a la tinción PAS se observan las microconidias del hongo colonizando las células de la planta.

### **3.3.2 Aislamientos del patógeno del material vegetal**

Como ya se mencionó, con los muestreos destructivos realizados para la marcha histotécnica, se tomó una porción del cuello de raíz para realizar las indexaciones en PDA con cloranfenicol (1 g/L) y de esta manera confirmar la presencia de *F. oxysporum*, dentro del tejido de las plantas de uchuva.

Tras la desinfección con hipoclorito de sodio al 2% y etanol al 70%, se colocaron trozos del material vegetal en el medio de cultivo y después de la incubación se confirmó la presencia del hongo, siendo este crecimiento positivo para los aislamientos realizados sobre el material del tratamiento de la inoculación con el patógeno y con el de la inoculación más la inundación (figura 3-6).

Los aislamientos de los tratamientos testigo y el de inundación no mostraron crecimiento micelial en las cajas de petri.



**Figura 3-6.** Crecimiento micelial de los aislamientos de los tratamientos testigo (izquierda) y del tratamiento Inundación + inoculación (derecha). A. Anverso. B. Reverso. C-D. Microconidias y micelio del hongo *F. oxysporum*, fotografías tomadas en aumento de 10X .

La descripción macroscópica de la colonia confirma la morfología de *F. oxysporum*, con micelio blanco algodonoso de crecimiento radial, en colores beige a rosados (fotografías A y B). Tras esta descripción se realizaron improntas que confirman las estructuras microscópicas de este hongo (fotografías C y D). Las conidias observadas son

microconidias hialinas, unicelulares, sin septos, de forma elíptica a cilíndrica y ligeramente curvas.

### 3.4 Discusión de resultados

El seguimiento a los cambios morfo-anatómicos sufridos en las plantas a causa de distintos tipos de estrés ya sea biótico o abiótico son de gran importancia para dar soporte a la sintomatología externa que se aprecia durante el desarrollo de la enfermedad o el estrés.

Para el caso del presente ensayo, es de importancia resaltar la alteración anatómica que sufrieron las plantas cuando se encontraban en presencia del hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. Como se había venido recalando, la condición de anegamiento favoreció la patogenicidad de *F. oxysporum*, presentando síntomas más tempranos y de mayor agresividad.

Recordemos que el período de incubación del patógeno, admitido como la aparición de los primeros síntomas de marchitez vascular en las plantas, se observó hacia el día 18 ddi en las plantas que se encontraban únicamente inoculadas. En las plantas que además de la inoculación fueron inundadas, este período de incubación se redujo a 8 ddi. En estos mismos tratamientos la respuesta en disminución de tasas fotosintéticas se observó con una anticipación de 4 días a la aparición de los síntomas aproximadamente.

Relacionando estos períodos de incubación y la afectación sobre el aparato fotosintético, con lo observado a nivel histológico, podemos concluir que la limitación en las tasas fotosintéticas responde de manera simultánea a la infección del patógeno. En las plantas inoculadas esta disminución en la fotosíntesis se observó hacia el día 8 ddi (Figura 1.9), lo que coincide con la infección de los haces vasculares y la lisis celular. Aunque la infección inició un poco antes, en este punto es donde empieza a verse afectada la circulación de agua y nutrientes a través del xilema a causa del taponamiento (figura 3-3,C).

En el caso de las plantas inoculadas e inundadas, la disminución en las tasas fotosintéticas se empieza a generar hacia el día 4 ddi (figura 1.9) y el taponamiento de

los haces vasculares inicia desde el día 5 ddi, con respuesta inmediata de la planta produciendo gomas dentro de los vasos del xilema (figura 3-5, A y B).

De esta manera se confirma que la severidad de los patógenos está determinada por las condiciones ambientales a las que está expuesta la planta.

En cuanto a las observaciones sobre las plantas inundadas, puede concluirse que a pesar de ser la uchuva una planta sensible a la inundación, en este ensayo durante el período de inundación se inició un proceso de lisis celular en la medula del cuello de la raíz, que permite suponer la formación de algún tipo de aerénquima que pretendía aumentar la capacidad de capturar oxígeno y transportarlo a los tejidos que lo demandan (Yin *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2013, Ezin *et al.*, 2010).

Una vez retirada la condición de anegamiento, las plantas detuvieron este proceso de lisis y continuaron con el intercambio gaseoso normal de la planta, tal como se observó en las figuras 1.9 y 1.10, en los que la fotosíntesis y la conductancia estomática de las plantas inundadas alcanzaron los niveles obtenidos en las plantas control.

Adicional a esta observación es importante anotar que en las plantas inundadas no se presentó ningún tipo de taponamiento vascular, demostrando que los síntomas de déficit hídrico que presentaron estas plantas durante el período de inundación, corresponde a un impedimento de absorción de agua producido por la condición estresante.





## 4. Conclusiones

El seguimiento fisiológico, bioquímico y anatómico realizado sobre las plantas de uchuva sometidas a estrés por anegamiento y *F. oxysporum*, permiten entender de una manera más clara el avance de la enfermedad y puede dar herramientas para el diseño de la estrategia de manejo a estos problemas fitosanitarios y climáticos que tanto impacto generan sobre los cultivos de uchuva y sobre otras solanáceas de gran importancia como el tomate y la papa.

La susceptibilidad presentada por las plantas de uchuva a la condición de anegamiento y ataque de *F. oxysporum*, puede notarse en la detención en el crecimiento tanto de la parte aérea como de las raíces. Este efecto varía de acuerdo a la presión y al tipo de estrés generado, de esta manera el efecto producido a causa de la inundación o del patógeno por separado, se presenta en un periodo más tardío de lo que se presenta en los dos tipos de estrés combinados.

Existe para cada especie vegetal un periodo de inundación crítico después del cual la recuperación es muy difícil o nula. En uchuva tras estudios previos realizados por Aldana y García (2012), demostraron que este periodo crítico se fija en 6 días de anegamiento continuo. En las plantas sometidas a esta condición durante el presente ensayo la recuperación fisiológica, bioquímica y anatómica es clara. El daño causado sobre el aparato fotosintético de las plantas y sobre los tejidos en esta condición de inundación, no generó daños irreversibles en el sistema. Por el contrario en plantas que adicional a la inundación se encuentran inoculadas por el patógeno *F. oxysporum*, la recuperación es imposible.

La presencia y severidad de los patógenos vegetales en épocas de alta humedad y precipitación es mayor. Siendo *F. oxysporum* un patógeno de suelo que sobrevive por largos periodos de tiempo latente en el sistema, las condiciones de humedad propician el

desarrollo de la enfermedad. Esta situación fue evidente en el desarrollo de este ensayo, mostrando períodos de incubación más largos en plantas que estaban a capacidad de campo y una reducción en este período de incubación además de una severidad muy alta de la enfermedad en plantas que estaban sometidas a inundación.

La reducción en las funciones biológicas de la planta fueron claras tanto en observaciones de crecimiento, como en mediciones fisiológicas y bioquímicas. En los tratamientos que incluían la inoculación con el patógeno, la reducción en las tasas fotosintéticas fue considerable y la acumulación de prolina especialmente en las hojas fue evidencia del estrés al que se sometieron las plantas.

Muchas de estas respuestas son similares a las reportadas para plantas que son sometidas a períodos de estrés hídrico por déficit. Esta similitud se da por la forma de acción del patógeno, que al usar los haces vasculares como eje conductor de sus microconidias, producen taponamientos principalmente en los vasos xilemáticos. La respuesta de defensa de las plantas también contribuye a esta sintomatología de estrés hídrico pues la producción de tilosas y gomas taponan de la misma manera los vasos, impidiendo el paso de agua y nutrientes.

La disminución en la capacidad de absorción de agua y en la movilidad de agua y nutrientes a través del sistema, genera cambios en los procesos fotosintéticos. Los elevados contenidos de agua en la zona radical en plantas inundadas y la presencia del patógeno en los haces vasculares genera un déficit de oxígeno que conlleva a aumentos en la respiración y limitaciones en la fotosíntesis por la inducción de cierres estomáticos. Estos efectos al igual que los síntomas visuales se generan de manera diferencial de acuerdo a la presión de estrés y a la sensibilidad de las plantas a la condición. La reducción en tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> en plantas inoculadas fue de hasta del 50%. Pero cuando se adiciona al sistema un estrés de tipo abiótico como la inundación la capacidad infectiva del patógeno aumenta causando reducciones en las tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> de hasta el 80%.

La infección de patógenos vasculares como *F. oxysporum* se ve favorecida bajo distintas condiciones de estrés que permiten que la planta sea más vulnerable a los ataques patogénicos.

Las respuestas a nivel fisiológico son anteriores a la visualización de los síntomas externos. La disminución en las tasas de asimilación y en los niveles de conductancia estomática y transpiración son observables de 2 a 4 días antes de la aparición de los primeros síntomas, que corresponden a clorosis de las hojas basales y ondulamiento de las hojas apicales.

Las mediciones sobre la fluorescencia de la clorofila-a permiten concluir que existe un efecto fotoprotector sobre las plantas inoculadas e inundadas en las primeras etapas del estrés y por ello los valores en la eficiencia máxima potencial del fotosistema II disminuyen. La reducción final en este parámetro sobre las plantas del tratamiento de estrés combinado muestra que la afectación sobre el sistema fotosintético de estas plantas se genera directamente sobre la eficiencia del funcionamiento de la antena cosechadora de luz.

Los tratamientos de inundación e inoculación por separado, mostraron a través de las mediciones sobre las variables de intercambio gaseoso y de la fluorescencia de la clorofila-a, que la disminución en las variables fotosintéticas de estas plantas se genera por cambios en la eficiencia del intercambio gaseoso a través de todo el periodo del ensayo. Mientras que en las plantas sometidas a estrés biótico y abiótico hay dos etapas claras de variaciones sobre las tasas de asimilación, iniciando con una limitación sobre el intercambio gaseoso y acción fotoprotectora sobre la LCH y una segunda etapa con daños directos sobre la cadena de transporte de electrones y la capacidad de asimilación fotoquímica.

Durante estas variaciones fisiológicas se presentaron simultáneamente cambios en la acumulación de osmolitos compatibles como prolina y azúcares reductores tanto en hojas como en raíces. Existen acumulaciones iniciales de prolina y AR en las plantas de uchuva ante eventos de estrés por inundación y por inoculación con *F. oxysporum*.

La prolina se acumula hasta cuando la planta puede soportar la condición estresante y su posterior disminución da cuenta de la susceptibilidad de la planta al estrés tanto por anegamiento, marchitez vascular o la combinación de estos dos tipos de estrés abiótico y biótico.

Este mismo comportamiento se evidencia en las acumulaciones de AR, donde los aumentos en los niveles de estos osmolitos son generados por una baja utilización de estos recursos para la consecución de ATP a través de las rutas fermentativas.

Existen cambios generados en la planta a nivel anatómico que se correlacionan directamente con las respuestas fisiológicas y bioquímicas. Las plantas con presencia del patógeno presentan vasos xilemáticos taponados tanto por microconidias y micelio del hongo, como por gomas y tilosas generados por la misma planta. Una vez iniciado el ataque patogénico los cambios anatómicos son evidentes y la propagación de estos síntomas vasculares impacta de forma directa las tasas de asimilación de CO<sub>2</sub>.

De la misma manera sucede con las plantas que son sometidas a los dos tipos de estrés, siendo la reducción de las tasas de asimilación de CO<sub>2</sub>, y el taponamiento de vasos xilemáticos y destrucción de las células de la médula y corteza simultáneas en su respuesta.

De esta manera puede verse como la respuesta de las plantas de uchuva al anegamiento y al ataque patogénico varía de acuerdo a la presión de estrés ejercida sobre el sistema y deja en evidencia la susceptibilidad de las solanáceas a la inundación y marchitez vascular.

El seguimiento fisiológico y anatómico de las variaciones producidas en las plantas de uchuva ante estrés biótico y abiótico, da herramientas clave para la generación de estrategias de manejo a estos dos eventos y permite ampliar el rango de posibilidades para el mejoramiento genético que busca encontrar resistencia a la infección por *F. oxysporum*.





# A. Anexo 1: Análisis físico-químico de suelo

REPORTE DE ANÁLISIS DE SUELO No. 779-2012

Página 1 de 1



LABORATORIO DE SUELOS FACULTAD DE AGRONOMÍA

<b>Remitente:</b> Liliana Hoyos	<b>Finca:</b> Invernaderos UN	<b>Lote:</b> A
<b>E-mail:</b> limhoyosca@unal.edu.co	<b>Propietario:</b> UNC	<b>Recibido:</b> 22/08/12
<b>Dirección:</b> Agronomía	<b>Municipio:</b> Bogotá D.C.	<b>Reportado:</b> 20/07/12
<b>Teléfono:</b> 19128	<b>Dpto:</b> Cundinamarca	<b>Recibo No.:</b> Pendiente ATI
<b>Ciudad:</b> Bogotá D.C.	<b>Cultivo:</b>	

## RESULTADOS

pH	CE dS/m	CO	N	Ca	K	Mg	Na	AI	CICE	CIC
		%		meq / 100g						
4,9	5,3	4,26	0,90	7,68	1,12	3,67	1,27	0,87	14,6	38,2

ns: no solicitado

P	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Ar	L	A	Textura
mg / kg							%			
60,6	179	0,30	70,4	5,01	7,33	3,00	7	23	70	FA

Los resultados corresponden únicamente a las muestras suministradas por el usuario y analizadas en el laboratorio

## NIVELES GENERALES DE REFERENCIA

Elemento	Clima	Alto	Medio	Bajo
N	Frío	>0.50	0.25-0.50	<0.25
	Medio	>0.25	0.15-0.25	<0.15
	Cálido	>0.20	0.10-0.20	<0.10

Elemento	Alto	Medio	Bajo
P	>40	20-40	<20
K	>0.35	0.15-0.35	<0.15
Ca	>6	3,0-6,0	<3
Mg	>2.5	1.5-2.5	<1.5

Analista:

*[Firma]*

Directora:

*[Firma]*

## Anexo 2: Análisis microbiológico de suelo.

Una muestra de suelo de 200 gramos fue ingresada a la clínica de plantas de la facultad de agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, con el objetivo de confirmar la presencia de colonias de *Fusarium* spp.. El 29 de Agosto de 2012 se recibió el siguiente informe del proceso y los resultados:

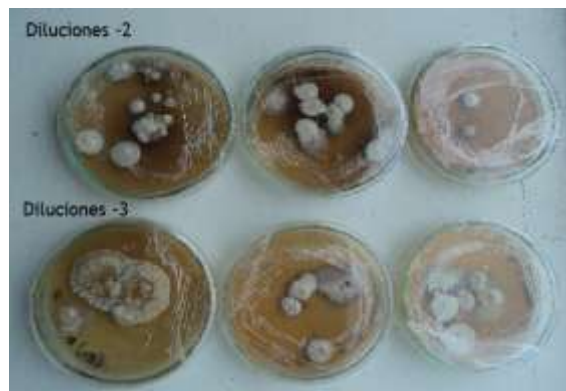
1. Se realizaron diluciones -2 y -3, partiendo de 100 gramos de suelo por 900 ml de agua destilada.
2. Se tomaron 50  $\mu$ l de cada una de estas diluciones y se colocaron en agar Komada, un medio de cultivo selectivo y diferencial para especies de *Fusarium* spp.
3. Una vez crecieron las colonias se toma el promedio del número de colonias en todas las cajas de la misma dilución y este promedio se multiplica por el inverso de la dilución.

De esta manera en la dilución -2:

(6,3) (103)

(6300 UFC \* 1000  $\mu$ l) / 50  $\mu$ l

12,6 x 10<sup>4</sup> UFC / g de suelo



En la dilución -3:

(9,3) (102)

(933,3 UFC \* 1000  $\mu$ l) / 50  $\mu$ l

18.667UFC / g de suelo



Resultado: En la muestra de suelo suministrada, proveniente de un invernadero de la sabana de Bogotá se confirma la presencia de *Fusarium* spp. Con una cantidad promedio de 72.333,5 UFC/g de suelo.

Conclusión: Luego de confirmada la presencia de *Fusarium* spp., pero notando que ninguna de las plantas de uchuva sembradas en este sustrato mostró síntomas de fusariosis, se concluye que las especies de *Fusarium* spp encontradas en el suelo no son patogénicas para uchuva y que este suelo puede ser usado en el ensayo, sin riesgo para las plantas ni para la veracidad de los resultados referentes a la enfermedad que será inducida.

## Anexo 3: Pruebas de patogenicidad

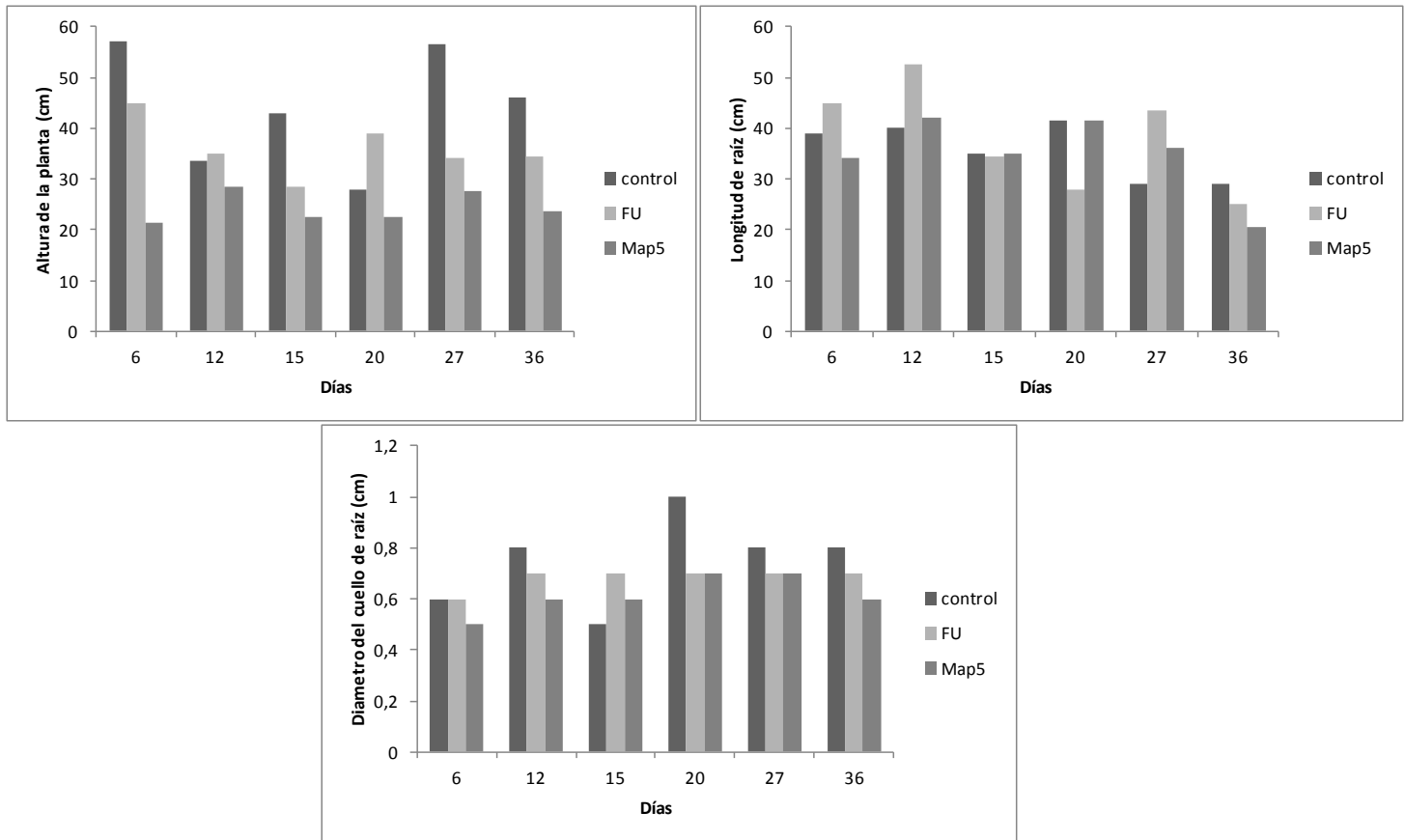
Se probaron dos cepas de *F. oxysporum*. Una de ellas proporcionada por el laboratorio de microbiología de la corporación colombiana de investigación agropecuaria CORPOICA. Esta cepa está denominada como Map5 y fue aislada de plantas de uchuva con marchitez vascular en cultivos del municipio de Sylvania (Cundinamarca, Colombia). La segunda cepa denominada FU, aislada de cultivos de uchuva con marchitez vascular del municipio de Ventaquemada (Boyacá, Colombia), fue proporcionada por la clínica de plantas de la facultad de agronomía, Universidad Nacional de Colombia.

Estas dos cepas se mantuvieron en medio PDA con cloranfenicol, a 37°C, en el laboratorio de microbiología de la facultad de agronomía. Se tomaron tres discos de cada cepa por erlenmeyer de 250 ml con medio extracto de malta líquido, según la metodología seguida por Ortiz (2011). Los erlenmeyers se colocaron a 25°C en agitación constante a 125 rpm por 5 días y en oscuridad.

Pasados los 5 días, se tomó 10 µl de la suspensión conidial y se realizó el conteo en cámara de Neubauer para calcular las diluciones necesarias para alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  conidias/ml.

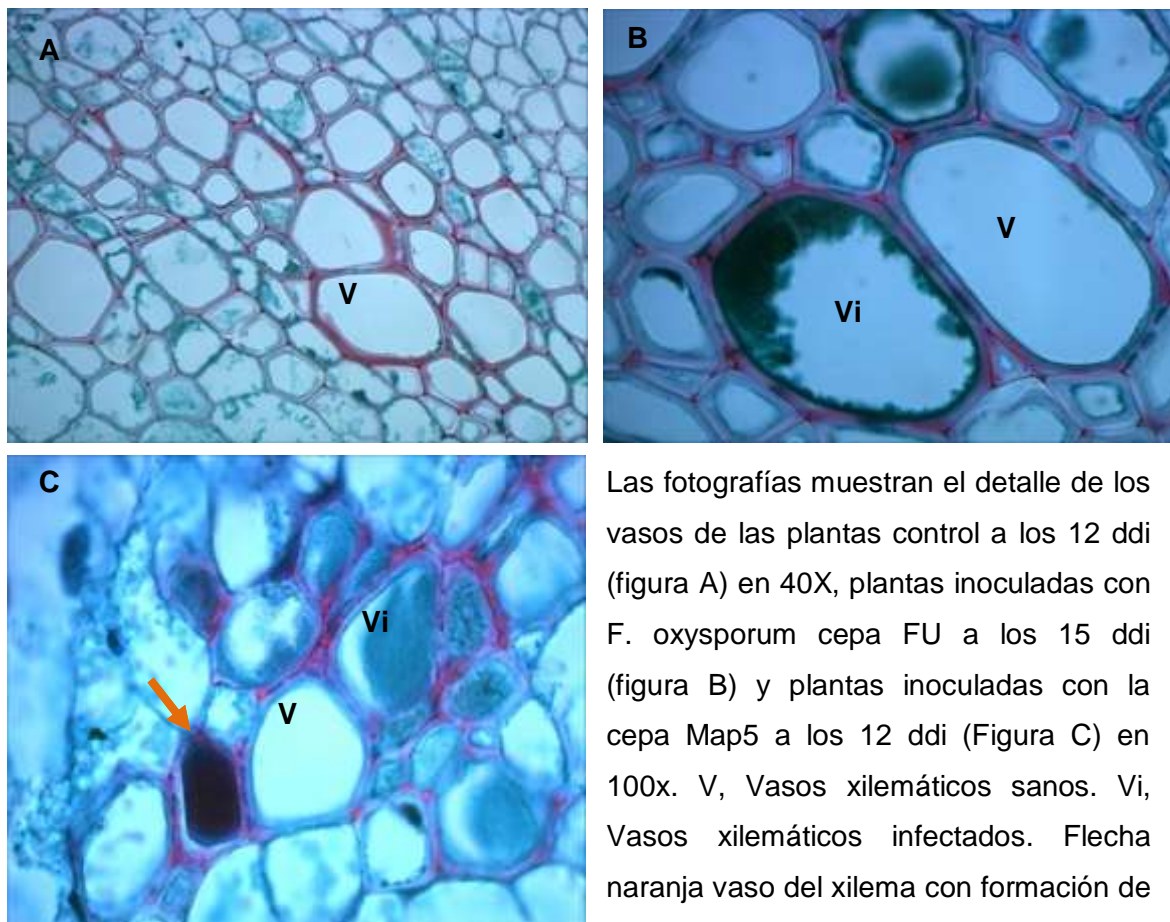
La inoculación de las plantas se realizó por medio de inmersión de raíces sin herida, para lo cual se retiró la planta del sustrato y se sumergieron sus raíces en 50 ml de suspensión durante 2 minutos. Las plantas fueron sembradas en el mismo suelo en el que se estableció el ensayo final.

Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo bajo un diseño completamente al azar con tres tratamientos, el control absoluto y la inoculación con la cepa FU y la cepa Map5. Las variables medidas consistieron en mediciones de Longitud de raíz, diámetro del cuello de raíz y Altura de la parte aérea. El seguimiento fotográfico y los cortes de histotecnica fueron las observaciones más importantes.



Las gráficas de las tres variables medidas dan prueba del desarrollo de la enfermedad en la parte externa de la planta. El comportamiento de las variables es similar y muestran una reducción más significativa en altura y longitud de raíz en las plantas inoculadas con la cepa Map5 de *F. oxysporum*. Las plantas inoculadas con la cepa FU también mostraron síntomas significativos pero la cepa Map5 tiene mayores diferencias con respecto a las plantas control.

Los datos mostrados en la gráfica inferior, indican que el cuello de raíz mantuvo un diámetro relativamente constante, pero es importante notar que el diámetro de las plantas inoculadas con la cepa Map5 son menores debido a la menor altura de la planta y hacia el final del período de evaluación por el avance de la marchitez vascular, que genera pérdida del tejido.



Las fotografías muestran el detalle de los vasos de las plantas control a los 12 ddi (figura A) en 40X, plantas inoculadas con *F. oxysporum* cepa FU a los 15 ddi (figura B) y plantas inoculadas con la cepa Map5 a los 12 ddi (Figura C) en 100x. V, Vasos xilemáticos sanos. Vi, Vasos xilemáticos infectados. Flecha naranja vaso del xilema con formación de gomas.

Las microfotografías muestran que el desarrollo de la enfermedad en plantas inoculadas con *F. oxysporum* cepa Map5, tienen una dispersión más acelerada de las microconidias a través de los haces vasculares y genera una respuesta de la planta más temprana generando gomas y tilosas en los vasos xilemáticos como defensa contra el avance del patógeno.

Con estos resultados se permitió concluir que la cepa más patogénica es la cepa Map5 y por tanto fue esta cepa la usada en el ensayo final.

## Anexo 4. Curvas de luz y diarias

Usando el medidor de gases por infrarrojo IRGA marca LIPro+ se realizaron las mediciones de fotosíntesis para generar las curvas de luz y diarias presentadas a continuación.

### 4.1 Curvas de luz

Los datos obtenidos en las curvas de luz, fueron analizados con los modelos de Mitscherlich y Michaelis Menten (citados y ejemplificados por Melgarejo *et al* 2010). En la tabla 1 de este anexo se presentan los datos de esta curva, tomados en condiciones del invernadero de fisiología vegetal del departamento de Biología.

PFD	F	PFD	F
1800	11.06	200	5.59
1600	10.72	100	3.15
1400	11.29	50	1.4
1200	11.41	40	0.85
1000	11.73	30	0.56
800	11.82	20	0.2
700	11.74	10	-0.22
600	11.69	0	-0.29
400	11.53		

**Tabla 1.** Valores de fotosíntesis (F, en  $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fijados), obtenidos en la curva de luz de las plantas de uchuva entre valores de flujo de fotones (PFD,  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) de 1800 a 0.

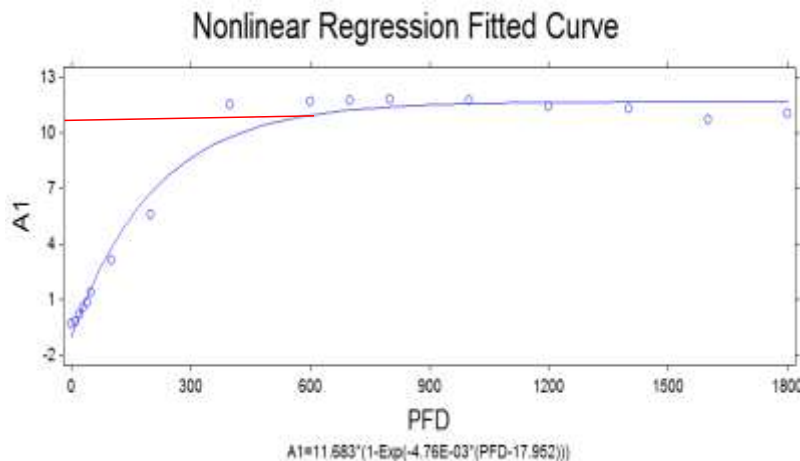
Los datos de las curvas de luz analizados con el paquete statistics 9.0 con el modelo monomolecular de Mitscherlich, permite estimar los parámetros con los que se interpretan los valores de fotosíntesis máxima para las plantas de uchuva que bajo las condiciones del invernadero, es de  $11,68 \mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Parámetro a), la eficiencia fotosintética de estas plantas es de  $4,76 \cdot 10^{-3} \text{ mol de CO}_2 / \text{mol de fotones}$  (Parámetro b) y el punto de compensación lumínica (PCL) es de  $17,95 \mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Parámetro c), tal como se puede observar en la figura 1 de este anexo.

**Modelo monomolecular de Mitscherlich**

MODEL: A1 = a*(1-Exp(-b*(PFD-c)))						
Parameter	Estimate	Std Error	Lower 95% C.i.	Upper 95% C.i.		
<b>Fotosíntesis máxima</b>	11,683	0,3089	11,020	12,345		
<b>Eficiencia fotosintética</b>	4,76E-03	6,36E-04	3,39E-03	6,12E-03		
<b>Punto de compensación lumínico</b>	17,952	57,810	55,530	30,351		
Residual SS (SSE)		8,127	<b>Parameter Correlations</b>			
Residual MS (MSE)		0,5805		<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>
Standard Deviation		0,7619	<b>a</b>	1		
Degrees of Freedom		14	<b>b</b>	-0,555	1	
AICc		-1,213	<b>c</b>	-0,0868	0,3206	1
<b>Pseudo R-Squared</b>		<b>0,9822</b>				

**Figura 1.** En la tabla superior de esta gráfica se observan los estimados y el error estándar del modelo. En la tabla inferior izquierda se encuentran los residuales del modelo y el ajuste del mismo (R<sup>2</sup>). Por último en la tabla inferior derecha la correlación de los parámetros a, b y c.

La gráfica ajustada al modelo monomolecular de Mitscherlich se muestra en la figura 2, en la que puede verse gráficamente el valor de la fotosíntesis máxima (Línea roja) y la pendiente de la primera parte de la curva (hasta el punto de fotosíntesis máxima) el cual es el valor de la eficiencia de la fotosíntesis.



**Figura 2.** Regresión lineal de los datos obtenidos para la curva de luz realizada en el invernadero de fisiología del departamento de Biología ajustada al modelo de Mitscherlich.

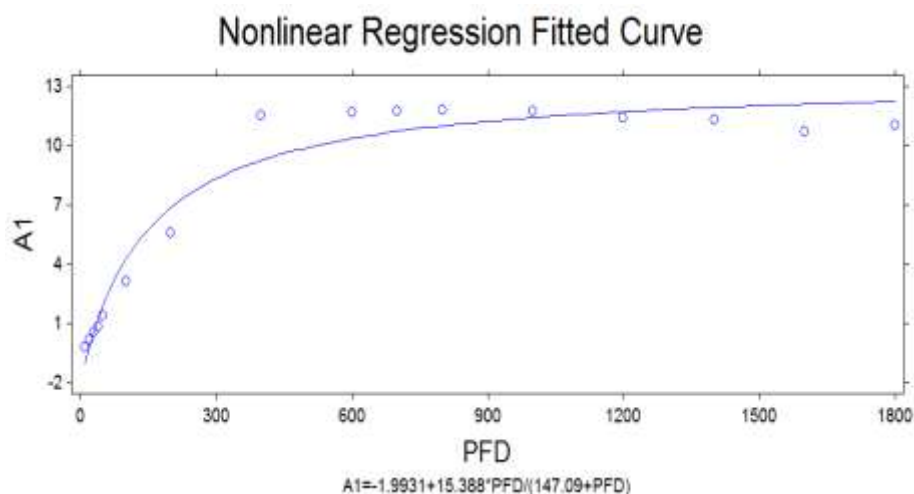
### Modelo de Michaelis Menten:

Con los mis mismos datos consignados en la tabla 1 se ajusta el modelo hiperbólico de Michaelis Menten con la ayuda del software Statistics 9.0, obteniendo los datos de la figura 3.

MODEL: A1 = c+a*PFD/(b+PFD)				
			Lower	Upper
Parameter	Estimate	Std Error	95% C,i,	95% C,i,
<b>Fotosíntesis máxima</b>	<b>15,388</b>	0,902	13	17
<b>Constante de saturación por luz</b>	<b>147,09</b>	49,350	40,478	253,71
<b>Tasa de respiración</b>	<b>-1,9931</b>	1,0207	-4,1981	0,2119
<b>Punto de compensación luminico</b>	<b>21,886321</b>			
<b>Eficiencia fotosintética</b>	<b>0,0306</b>			
Residual SS (SSE)	16,535			
Residual MS (MSE)	12,719			
Standard Deviation	11,278			
Degrees of Freedom	13,000			
AICc	12,163			
<b>Pseudo R-Squared</b>	<b>0,959</b>			

Figura 3. En la tabla superior de esta gráfica se observan los coeficientes y el error estándar del modelo. En la tabla inferior se encuentran los residuales del modelo y el ajuste del mismo (R<sup>2</sup>).

Con los datos obtenidos del modelo de Michaelis Menten se obtienen los valores de los parámetros observados en la tabla 2. Se interpreta que la fotosíntesis máxima para las plantas de uchuva bajo estas condiciones de invernadero es de 15,39  $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , la constante de saturación de luz es de 147,09  $\mu\text{moles de fotones m}^2 \text{ s}^{-1}$ , la tasa de respiración de -1,99  $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , el PCL es de 21,89  $\mu\text{moles de CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  y la eficiencia fotosintética de estas plantas es de 0,031 mol de  $\text{CO}_2$ /mol de fotones. La respectiva curva se observa en la figura 4.



**Figura 4.** Regresión lineal de los datos obtenidos para la curva de luz realizada en el invernadero de fisiología del departamento de Biología ajustada al modelo de Michaelis Menten.

La gráfica ajustada al modelo hiperbólico de Michaelis Menten mostrada en la figura 4, muestra la pendiente de la primera parte de la curva (hasta el punto de inflexión de la curva) que es el valor de la eficiencia de la fotosíntesis.

### Conclusión:

Teniendo en cuenta los valores de  $R^2$  de los dos modelos, se concluye que aunque el ajuste de los dos modelos es bueno, el modelo que mejor se ajusta a los datos obtenidos en la curva de luz realizada en condiciones de invernadero en plantas de uchuva, es el modelo monomolecular de Mitscherlich con un  $R^2$  de 0,98 frente a un  $R^2$  de 0,95 del modelo hiperbólico de Michaelis Menten.

### 4.2 Curvas diarias de fotosíntesis

Estas mediciones se realizaron entre las 8:00 y las 18:00 horas cada dos horas, bajo condiciones del invernadero del departamento de biología y sobre plantas sanas, usando tres plantas y haciendo 6 mediciones en cada una de ellas por cada punto de medición.

**Tabla 2.** Datos de fotosíntesis promediados por intervalo de tiempo por planta y promedio de plantas.

HORA	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Promedio
09:00	4,898	4,693	4,845	4,812
11:00	5,080	5,850	5,677	5,536
13:00	4,612	1,915	1,152	2,559
15:00	2,737	1,565	1,005	1,769
17:00	0,143	0,102	-0,225	0,007



Se concluye que el rango del día para mayor fotosíntesis de las plantas de uchuva bajo condiciones de invernadero es entre las 10:00 y las 11:00 am, con un valor de fotosíntesis de  $5,54 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ .

La curva obtenida se presenta en figura 5.

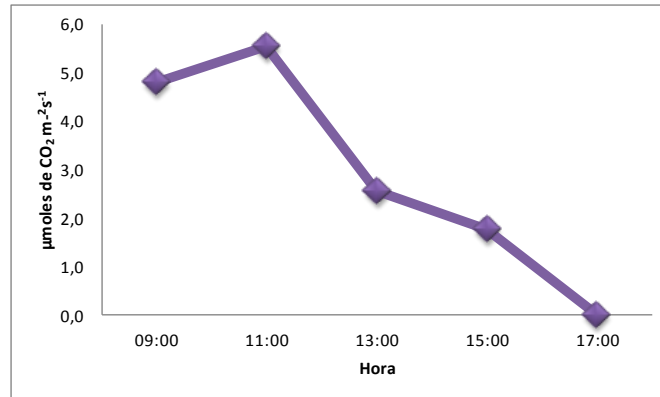


Figura 5. Curva diaria de fotosíntesis para plantas de uchuva bajo condiciones del invernadero del departamento de biología

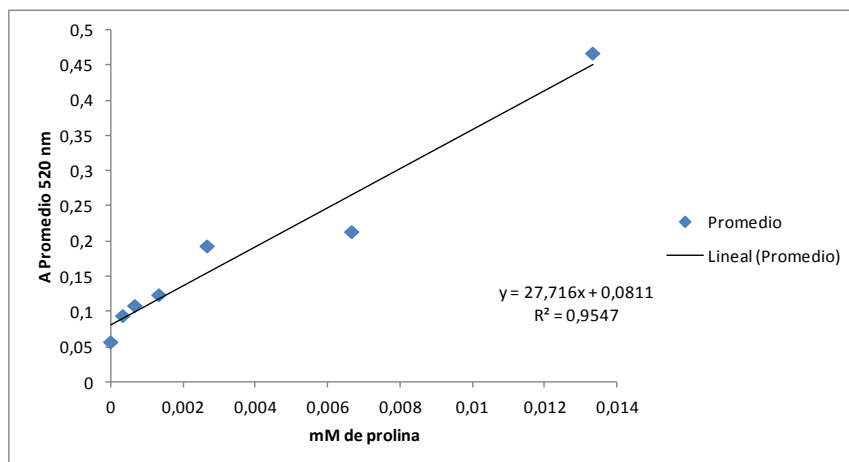
## Anexo 5. Curvas de calibración

### 5.1 Curva de calibración para las determinaciones de los contenidos de prolina

Patrón	mM de prolina	A promedio 520 nm
0	0	0,019
25	0,000333	8,365
50	0,000667	16,703
100	0,001333	33,375
200	0,002667	66,732
500	0,006667	166,740
1000	0,013333	333,494

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,977100998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,954726361
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	<b>0,945671633</b>
Error típico	0,032207782
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	de cuadrados	de los cu	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	0,10938	0,10938	105,4	0,000150538	
Residuos	5	0,00519	0,00104			
Total	6	0,11456				

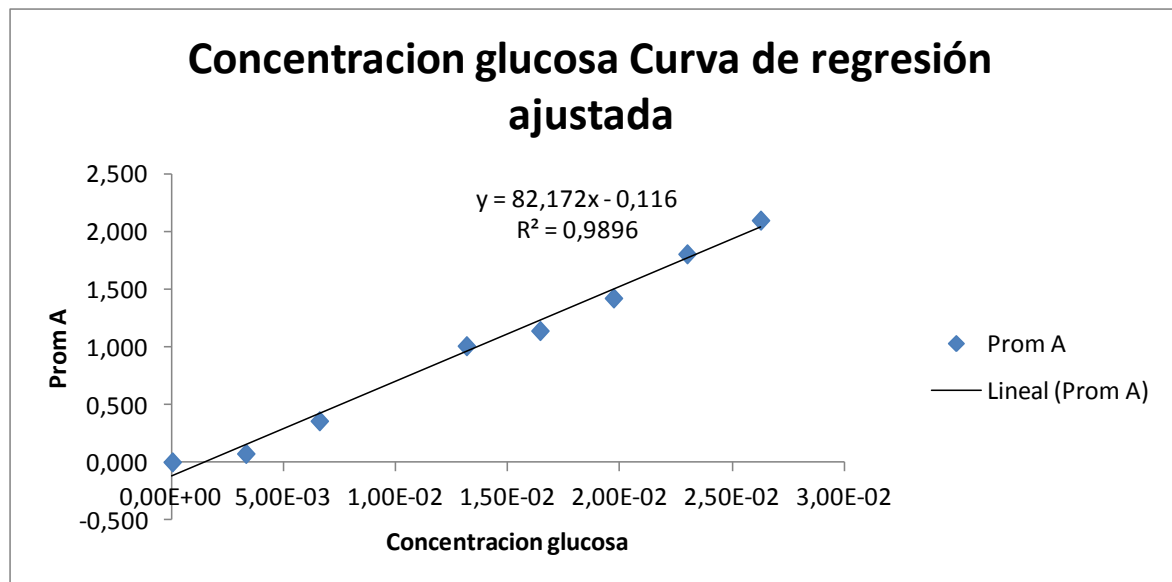


## 5.2 Curva de calibración para la determinación de los contenidos de azúcares reductores

Vol glucosa	Concentracion glucosa	Prom A a 520 nm
0	0	8,00E-03
5	0,003280255	8,13E-02
10	0,00656051	3,65E-01
20	0,013121019	1,02E+00
25	0,016401274	1,15E+00
30	0,019681529	1,43E+00
35	0,022961783	1,81E+00
40	0,026242038	2,11E+00

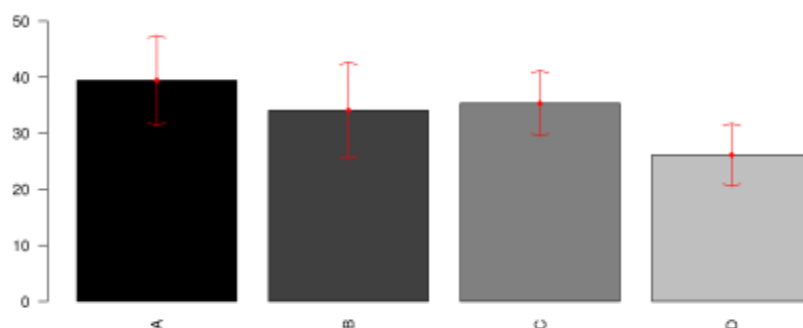
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	4,277554654	4,277554654	568,7339616	3,56953E-07
Residuos	6	0,045127124	0,007521187		
Total	7	4,322681778			

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,994766499
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,989560387
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	<b>0,987820452</b>
Error típico	0,086724779
Observaciones	8



## Anexo 6. Análisis estadístico para las variables agronómicas

### 6.1 Variable: Longitud de raíz



**Figura 1.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable Longitud de raíz

#### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

##### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared** = 4.6176  
**df** = 3  
**p-value** = 0.202

De los resultados de la prueba se infiere que **hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

#### 2. ANOVA a una vía

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Tratamiento</b>	3	1673	558	10.9	0.000006 ***
<b>Residuals</b>	68	3467	51		

De los resultados del ANOVA se encuentra que **existen diferencias significativas** en los promedios de los tratamientos

#### 3. Prueba del supuesto de normalidad en los residuos

##### Shapiro-Wilk normality test

**W** = 0.9921,  
**p-value** = 0.9349

Según la prueba de Shapiro-Wilk **los residuos son normales** y las conclusiones del ANOVA son válidas.

#### 4. Prueba de comparaciones múltiples.

**Tabla 1. Comparaciones múltiples de medias de Tukey**

Nivel de confianza del 95%

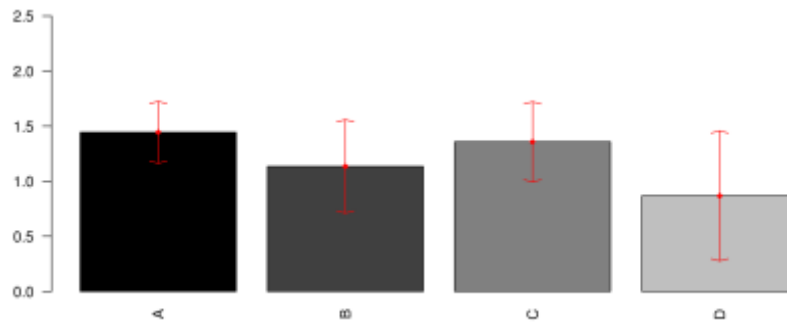
Diferencias Tratamiento	diff	lwr	upr	p adj
B-A	-5.3500	-11.6189	0.91889	0.12092
C-A	-4.0944	-10.3633	2.17444	0.32133
D-A	-13.3000	-19.5689	-7.03111	<b>0.00000</b>
C-B	1.2556	-5.0133	7.52444	0.95214
D-B	-7.9500	-14.2189	-1.68111	<b>0.00729</b>
D-C	-9.2056	-15.4744	-2.93667	<b>0.00139</b>

En la anterior tabla los p-valores (última columna), que tienen valores menores a 0.05 indican diferencias significativas entre los tratamientos.

**Tabla 2.** Resumen de las diferencias por grupos

Tratamiento	Media	Error típico	Grupo
Control	39.43	8.03	a
Inundación	34.08	8.60	a
Inoculación	35.33	5.84	a
Inoculación + Inundación	26.13	5.61	b

## 6.2 Variable: Peso seco de raíz



**Figura 2.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable Peso seco de raíz

### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

#### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared = 9.6377**

**df = 3**

**p-value = 0.02191**

De los resultados de la prueba se infiere que **no hay homoscedasticidad** por cada tratamiento por tanto se procede a realizar las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis

## 2. Kruskal-Wallis rank sum test

**chi-squared** = 16.137

**df** = 3

**p-value** = 0.001063

De la prueba de Kruskal-Wallis se infiere que **existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos

**Tabla 3. Comparaciones múltiples de medianas de Kruskal-Wallis**

p.value: 0.05

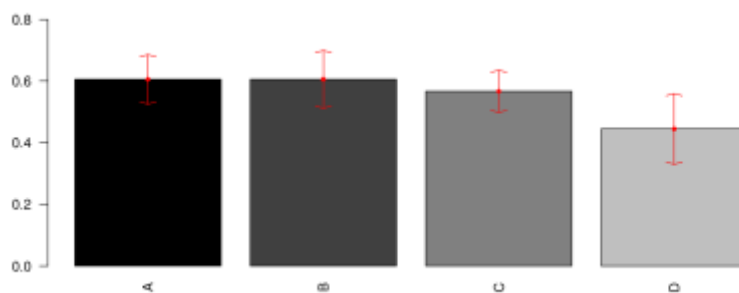
Comparaciones	obs.dif	critical.dif	difference
A-B	17.8889	18.405	FALSE
A-C	7.5278	18.405	FALSE
<b>A-D</b>	<b>26.0278</b>	<b>18.405</b>	<b>TRUE</b>
B-C	10.3611	18.405	FALSE
B-D	8.1389	18.405	FALSE
<b>C-D</b>	<b>18.5000</b>	<b>18.405</b>	<b>TRUE</b>

En la anterior tabla, los TRUE implican que los tratamientos son estadísticamente distintos a un nivel del 5% de significancia

**Tabla 4. Resumen de las diferencias por grupos**

Tratamiento	Media	Error típico	Grupo
<b>Control</b>	1.44	0.28	a
<b>Inundación</b>	1.14	0.42	ab
<b>Inoculación</b>	1.36	0.36	a
<b>Inoculación + Inundación</b>	0.87	0.59	b

### 6.3 Variable: Diámetro del cuello de raíz



**Figura 3.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable diámetro del cuello de raíz

#### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

##### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared** = 4.8504

**df** = 3

**p-value = 0.1831**

De los resultados de la prueba se infiere que **hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

## 2. ANOVA a una vía

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Tratamiento</b>	3	0.314	0.1048	12.7	0.0000012 ***
<b>Residuals</b>	68	0.563	0.0083		

De los resultados del ANOVA se encuentra que **existen diferencias significativas** en los promedios de los tratamientos

## 3. Prueba del supuesto de normalidad en los residuos

### Shapiro-Wilk normality test

**W = 0.9226**

**p-value = 0.0002809**

Según la prueba de Shapiro-Wilk **los residuos no son normales**. Esto implica que debe hacerse uso de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que es el equivalente al ANOVA a una vía.

## 4. Kruskal-Wallis rank sum test

**chi-squared = 28.127**

**df = 3**

**p-value = 0.000003417**

De esta prueba se infiere que **existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos

**Tabla 5. Comparaciones múltiples de medianas de Kruskal-Wallis**  
p.value: 0.05

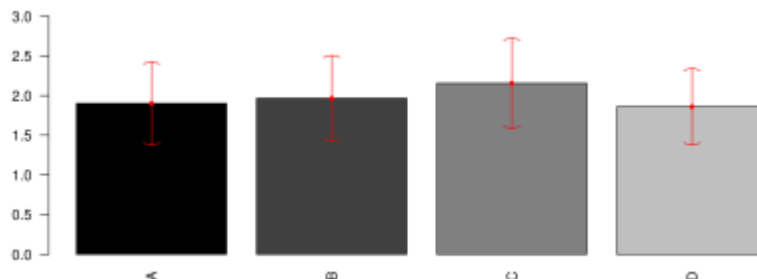
Diferencias Tratamiento	obs.dif	critical.dif	difference
A-B	1.3889	18.405	FALSE
A-C	7.4167	18.405	FALSE
<b>A-D</b>	<b>30.6389</b>	<b>18.405</b>	<b>TRUE</b>
B-C	6.0278	18.405	FALSE
<b>B-D</b>	<b>29.2500</b>	<b>18.405</b>	<b>TRUE</b>
<b>C-D</b>	<b>23.2222</b>	<b>18.405</b>	<b>TRUE</b>

En la anterior tabla, los TRUE implican que los tratamientos son estadísticamente distintos a un nivel del 5%.

**Tabla 6. Resumen de las diferencias por grupos**

Tratamiento	Media	Error típico	Grupo
<b>Control</b>	0.61	0.08	a
<b>Inundación</b>	0.61	0.09	a
<b>Inoculación</b>	0.57	0.07	a
<b>Inoculación + Inundación</b>	0.44	0.11	b

#### 6.4 Variable: Peso seco aéreo



**Figura 4.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable Peso seco aéreo

#### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

##### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared** = 0.47

**df** = 3

**p-value** = 0.9254

De los resultados de la prueba se infiere que **hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

#### 2. ANOVA a una vía

	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
<b>Tratamiento</b>	3	0.92	0.307	1.08	0.36
<b>Residuals</b>	68	19.39	0.285		

De los resultados del ANOVA se encuentra que **no existen diferencias significativas** en los promedios de los tratamientos

#### 3. Prueba del supuesto de normalidad en los residuos

##### Shapiro-Wilk normality test

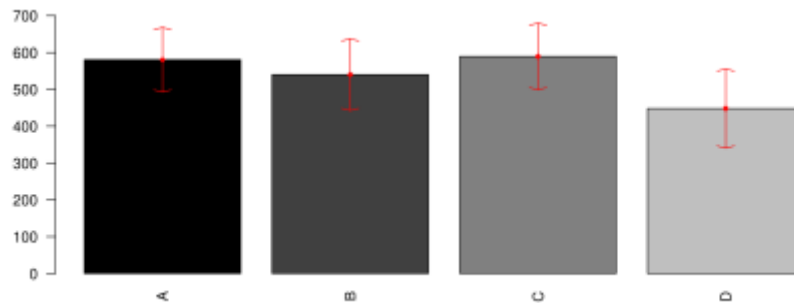
**W** = 0.9819

**p-value** = 0.3879

Según la prueba de Shapiro-Wilk **los residuos son normales y las conclusiones de la anova son válidas.**



## 6.5 Variable: Área Foliar



**Figura 5.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable área foliar

### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

#### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared** = 0.8379

**df** = 3

**p-value** = 0.8404

De los resultados de la prueba se infiere que **hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

### 2. ANOVA a una vía

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Tratamiento</b>	3	225572	75191	8.11	0.00011 ***
<b>Residuals</b>	68	630841	9277		

De los resultados del ANOVA se encuentra que **existen diferencias significativas** en los promedios de los tratamientos

### 3. Prueba del supuesto de normalidad en los residuos

#### Shapiro-Wilk normality test

**W** = 0.9859

**p-value** = 0.6047

Según la prueba de Shapiro-Wilk **los residuos son normales.**

#### 4. Comparaciones múltiples de Tukey

**Tabla 7. Comparaciones múltiples de medias de Tukey**

Nivel de confianza del 95%

Diferencias Tratamiento	obs.dif	lwr	upr	p adj
B-A	-40.4261	-124.984	44.1317	0.59182
C-A	8.9733	-75.584	93.5311	0.99231
<b>D-A</b>	<b>-132.3956</b>	<b>-216.953</b>	<b>-47.8378</b>	<b>0.00059</b>
C-B	49.3994	-35.158	133.9572	0.42047
<b>D-B</b>	<b>-91.9694</b>	<b>176.527</b>	<b>-7.4117</b>	<b>0.02776</b>
<b>D-C</b>	<b>-141.3689</b>	<b>-225.927</b>	<b>-56.8111</b>	<b>0.00022</b>

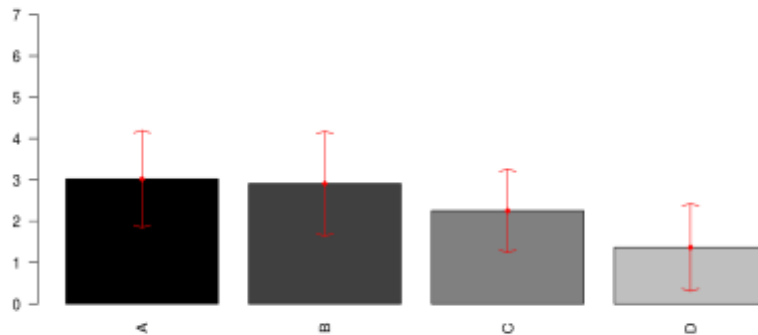
En la anterior tabla los p-valores (última columna), que tienen valores menores a 0.05 indican diferencias significativas entre los tratamientos.

**Tabla 8.** Resumen de las diferencias por grupos

Tratamiento	Media	Error típico	Grupo
<b>Control</b>	580.47	87.90	a
<b>Inundación</b>	540.04	97.65	a
<b>Inoculación</b>	589.44	90.70	a
<b>Inoculación + Inundación</b>	448.07	107.80	b

## Anexo 7. Análisis estadístico para variables de fisiológicas

### 7.1 Variable: Fotosíntesis



**Figura 1.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable Fotosíntesis

#### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

##### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared = 5.9321**

**df = 3**

**p-value = 0.115**

De los resultados de la prueba se infiere que **hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

#### 2. ANOVA a una vía

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Tratamiento</b>	3	165	55.1	42.9	<0.0000000000000002 ***
<b>Residuals</b>	374	480	1.3		

De los resultados del ANOVA se encuentra que **existen diferencias significativas** en los promedios de los tratamientos

#### 3. Prueba del supuesto de normalidad en los residuos

##### Shapiro-Wilk normality test

**W = 0.9717,**

**p-value = 0.000001**

Según la prueba de Shapiro-Wilk **los residuos no son normales** y las conclusiones del ANOVA no son válidas.

#### 4. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

**Kruskal-Wallis chi-squared = 94.928,**  
**df = 3,**  
**p-value=< 0.000000000000000022**

De la prueba de Kruskal-Wallis se infiere que **existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos

#### 5. Prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis

**Tabla 1. Comparaciones múltiples de medianas de Kruskal-Wallis**  
**p.value: 0.05**

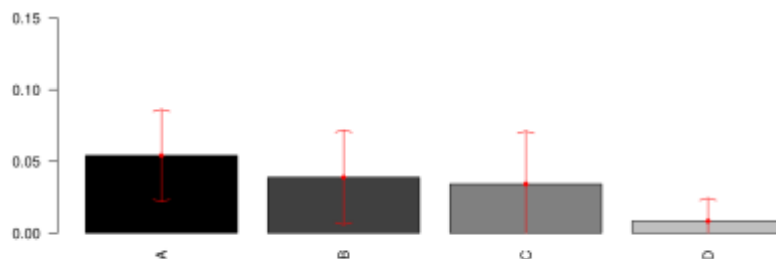
Diferencias Tratamiento	obs.dif	critical.dif	difference
A-B	6.291	41.942	FALSE
A-C	<b>60.478</b>	<b>42.273</b>	<b>TRUE</b>
A-D	<b>135.848</b>	<b>41.942</b>	<b>TRUE</b>
B-C	<b>54.188</b>	<b>41.942</b>	<b>TRUE</b>
B-D	<b>129.557</b>	<b>41.607</b>	<b>TRUE</b>
C-D	<b>75.370</b>	<b>41.942</b>	<b>TRUE</b>

En la anterior tabla, los TRUE implican que los tratamientos son estadísticamente distintos a un nivel del 5%.

**Tabla 2. Resumen de las diferencias por grupos**

Tratamiento	Media	Error típico	Grupo
<b>Control</b>	3.02	1.18	a
<b>Inundación</b>	2.91	1.27	a
<b>Inoculación</b>	2.25	1.01	b
<b>Inoculación + Inundación</b>	1.37	1.06	c

## 7.2. Variable: Conductancia estomática



**Figura 2.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable Conductancia estomática

1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

**Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas**

**Bartlett's K-squared** = 62.334  
**df** = 3  
**p-value** = 0.0000000000001864

De los resultados de la prueba se infiere que **no hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

2. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

**Kruskal-Wallis chi-squared** = 121.83  
**df** = 3,  
**p-value** = < 0.00000000000000022

De la prueba de Kruskal-Wallis se infiere que **existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos

3. Prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis

**Tabla 3. Comparaciones múltiples de medianas de Kruskal-Wallis**  
**p.value:** 0.05

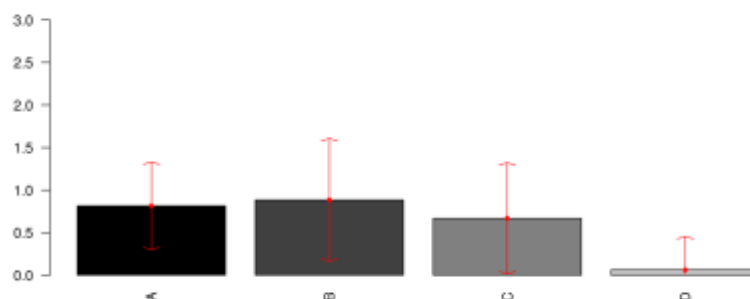
Diferencias Tratamiento	obs.dif	critical.dif	difference
<b>A-B</b>	<b>47.957</b>	<b>41.942</b>	<b>TRUE</b>
<b>A-C</b>	<b>73.263</b>	<b>42.273</b>	<b>TRUE</b>
<b>A-D</b>	<b>167.723</b>	<b>41.942</b>	<b>TRUE</b>
B-C	25.306	41.942	FALSE
<b>B-D</b>	<b>119.766</b>	<b>41.607</b>	<b>TRUE</b>
<b>C-D</b>	<b>94.460</b>	<b>41.942</b>	<b>TRUE</b>

En la anterior tabla, los TRUE implican que los tratamientos son estadísticamente distintos a un nivel del 5%.

**Tabla 4. Resumen de las diferencias por grupos**

Tratamiento	Media	Error típico	Grupo
<b>Control</b>	0.05	0.03	a
<b>Inundación</b>	0.04	0.03	b
<b>Inoculación</b>	0.03	0.04	b
<b>Inoculación + Inundación</b>	0.01	0.02	c

### 7.3. Variable: Transpiración



**Figura 3.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable Transpiración

#### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

##### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared = 38.492**

**df = 3**

**p-value = 0.0000002223**

De los resultados de la prueba se infiere que **no hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

#### 2. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

**Kruskal-Wallis chi-squared = 115.88**

**df = 3,**

**p-value=< 0.00000000000000022**

De la prueba de Kruskal-Wallis se infiere que **existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos

#### 3. Prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis

**Tabla 5. Comparaciones múltiples de medianas de Kruskal-Wallis**

**p.value: 0.05**

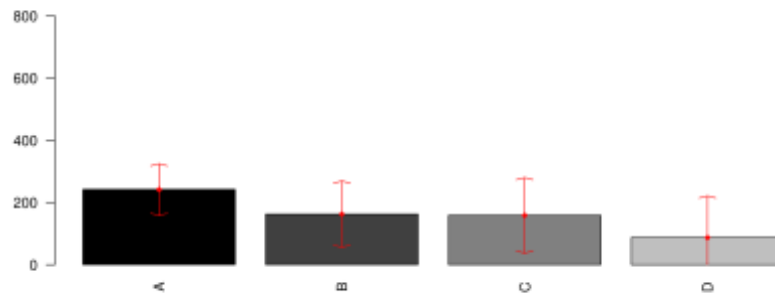
Diferencias Tratamiento	obs.dif	critical.dif	difference
A-B	2.6809	41.942	FALSE
A-C	37.2796	42.273	FALSE
A-D	<b>148.0664</b>	<b>41.942</b>	<b>TRUE</b>
B-C	34.5986	41.942	FALSE
B-D	<b>145.3854</b>	<b>41.607</b>	<b>TRUE</b>
C-D	<b>110.7868</b>	<b>41.942</b>	<b>TRUE</b>

En la anterior tabla, los TRUE implican que los tratamientos son estadísticamente distintos a un nivel del 5%.

Tabla 6. Resumen de las diferencias por grupos

Tratamiento	Media	Error típico	Grupo
Control	0.81	0.51	a
Inundación	0.88	0.72	a
Inoculación	0.67	0.65	a
Inoculación + Inundación	0.06	0.39	b

#### 7.4. Variable: Concentración interna de CO<sub>2</sub>



**Figura 4.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable Concentración interna de CO<sub>2</sub>

##### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

###### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared = 21.757**

**df = 3**

**p-value = 0.0000733**

De los resultados de la prueba se infiere que **no hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

##### 2. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

**Kruskal-Wallis chi-squared = 85.451**

**df = 3,**

**p-value=< 0.000000000000000022**

De la prueba de Kruskal-Wallis se infiere que **existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos

## 3. Prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis

**Tabla 7. Comparaciones múltiples de medianas de Kruskal-Wallis**  
p.value: 0.05

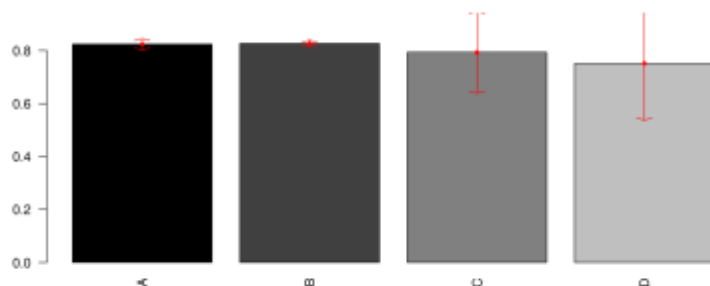
Diferencias Tratamiento	obs.dif	critical.dif	difference
A-B	73.46287	41.609	TRUE
A-C	74.04301	41.938	TRUE
A-D	145.73656	41.938	TRUE
B-C	0.58014	41.609	FALSE
B-D	72.27369	41.609	TRUE
C-D	71.69355	41.938	TRUE

En la anterior tabla, los TRUE implican que los tratamientos son estadísticamente distintos a un nivel del 5%.

**Tabla 8. Resumen de las diferencias por grupos**

Tratamiento	Media	Error típico	Grupo
Control	241.34	83.39	a
Inundación	162.40	106.62	b
Inoculación	158.60	121.54	b
Inoculación + Inundación	87.03	134.34	c

## 7.5 Variable: Fv/Fm



**Figura 5.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable Fv/Fm

## 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

**Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas**

**Bartlett's K-squared** = 1168.5

**df** = 3

**p-value** = < 0.00000000000000022

De los resultados de la prueba se infiere que **no hay homoscedasticidad** por cada tratamiento



## 2. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

**Kruskal-Wallis chi-squared =51.291**  
**df = 3,**  
**p-value= 0.00000000004242**

De la prueba de Kruskal-Wallis se infiere que **existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos

## 3. Prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis

**Tabla 9. Comparaciones múltiples de medianas de Kruskal-Wallis**  
**p.value: 0.05**

Diferencias Tratamiento	obs.dif	critical.dif	difference
A-B	1.6935	55.634	FALSE
A-C	38.2440	55.634	FALSE
<b>A-D</b>	<b>132.2338</b>	<b>55.886</b>	<b>TRUE</b>
B-C	36.5506	55.634	FALSE
<b>B-D</b>	<b>130.5403</b>	<b>55.886</b>	<b>TRUE</b>
<b>C-D</b>	<b>93.9897</b>	<b>55.886</b>	<b>TRUE</b>

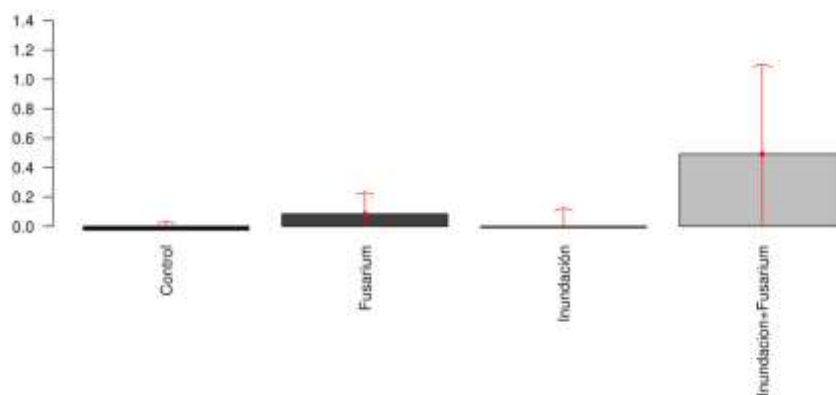
En la anterior tabla, los TRUE implican que los tratamientos son estadísticamente distintos a un nivel del 5%.

**Tabla 10. Resumen de las diferencias por grupos**

Tratamiento	Media	Error típico	Grupo
<b>Control</b>	0.82	0.02	a
<b>Inundación</b>	0.83	0.01	a
<b>Inoculación</b>	0.79	0.15	a
<b>Inoculación + Inundación</b>	0.75	0.21	b

## Anexo 8. Análisis estadístico para variables bioquímicas

### 8.1 Variable: Contenido de prolina en hojas



**Figura 1.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable prolina en hojas

#### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

##### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared** = 14.121

**df** = 3

**p-value** = 0.002745

De los resultados de la prueba se infiere que **no hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

#### 2. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

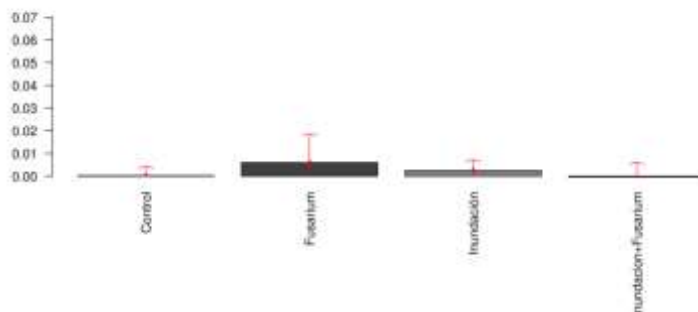
**Kruskal-Wallis chi-squared** = 4.3465,

**df** = 3,

**p-value**=0.2264

De la prueba de Kruskal-Wallis se infiere que **no existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos, gráficamente se aprecia una gran variabilidad.

## 8.2. Variable: Contenidos de prolina en raíces



**Figura 2.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable prolina en raíces

### 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

#### Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas

**Bartlett's K-squared** = 4.2037,  
**df** = 3  
**p-value** = 0.2403

De los resultados de la prueba se infiere que **hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

### 2. ANOVA a una vía

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<b>Tratamiento</b>	3	0.000102	0.0000341	0.55	0.65
<b>Residuals</b>	12	0.000737	0.0000614		

De los resultados del ANOVA se encuentra que **no existen diferencias significativas** en los promedios de los tratamientos

### 3. Prueba del supuesto de normalidad en los residuos

#### Shapiro-Wilk normality test

**W** = 0.8419,  
**p-value** = 0.01039

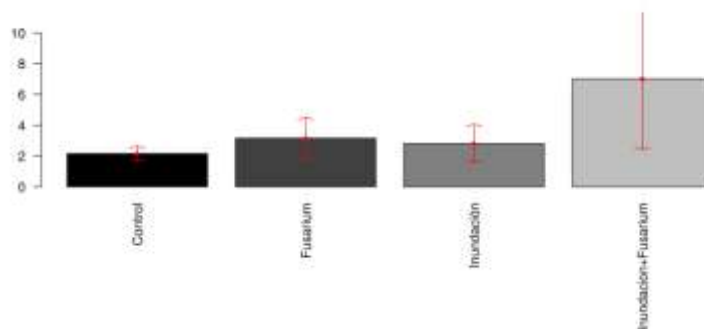
Según la prueba de Shapiro-Wilk **los residuos no son normales** y las conclusiones del ANOVA no son válidas.

## 4. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

**Kruskal-Wallis chi-squared = 2.1913,**  
**df = 3,**  
**p-value=0.5337**

De la prueba de Kruskal-Wallis se infiere que **no existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos, gráficamente se aprecia una gran variabilidad.

## 8.3 Variable: Contenidos de azúcares reductores en hojas



**Figura 3.** Gráfico de barras con sus respectivas desviaciones estándar de los tratamientos para la variable azúcares reductores en hojas

## 1. Prueba de homoscedasticidad en las poblaciones de los tratamientos

**Prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas**

**Bartlett's K-squared = 12.117,**  
**df = 3**  
**p-value = 0.006992**

De los resultados de la prueba se infiere que **no hay homoscedasticidad** por cada tratamiento

## 2. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

**Kruskal-Wallis chi-squared =2.1913,**  
**df = 3,**  
**p-value=0.5337**

De la prueba de Kruskal-Wallis se infiere que **no existen diferencias significativas** en las medianas de los tratamientos, gráficamente se aprecia una gran variabilidad.





## Bibliografía

Agrios, G. N. (2005). Vascular wilts caused by ascomycetes and deuteromycetes (Mitosporic fungi). pp. 522-526. En: Agrios, GN. (2005). Plant pathology. New York: 5th ed. Elsevier Academic Press. 948 pp.

Agrocadenas. 2005. Documento de Trabajo No. 67. 2005. La cadena de los frutales de exportación en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica, 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. Bogotá. En: [www.agrocadenas.gov.co](http://www.agrocadenas.gov.co). Consultado: 23 de Junio de 2010.

Agronet. 2009. Análisis y estadísticas de producción departamental por producto, para Antioquía, Boyacá y Cundinamarca. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. En: [www.agronet.gov.co](http://www.agronet.gov.co). Consultado el: 25 de Junio de 2012.

Aldana F. García P. 2012. Efecto del estrés por anegamiento sobre el crecimiento, desarrollo y fisiología de uchuva (*Physalis peruviana* L.) bajo condiciones de invernadero. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Almanza P., Fischer G. 1993. Nuevas tecnologías de la uchuva *Physalis peruviana* L. Agro-Desarrollo 4(1-2), 292-304.

Angulo R. 2005a. Capítulo 7. Crecimiento, desarrollo y producción de la uchuva en condiciones de invernadero y campo abierto. pp. 111-129. En: Avances en el cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Colombia. Fischer, G., Piedrahita, W., Miranda, D., Romero, J. (eds). Editorial Unibiblos. Bogotá D.C. 221 p.

Angulo R. 2005b (ed.). Uchuva el cultivo. Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá.

Arbona V., Argamasilla R., Gómez-Cadenas A. 2010. Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *Journal of Plant Physiology* 167 (2010) 1342–1350.

Bailey-Serres J., Voesenek L. 2008. Flooding stress: Acclimations and Genetic diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 313-39.

Baker N.R. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review Plant Biology.* 59:89 – 113.

Boomsma C., Vyn T. 2008. Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Field Crops research* 108: 14-31.

Bonilla M., Arias P., Landínez L, Moreno J., Cardozo F., Suárez M. 2009. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de la uchuva en fresco para exportación en Colombia. 151 p. ISBN: 978-958-8536-09-5.

Castillo S., Hoyos-Carvajal L. 2013. Efecto del exceso hídrico sobre poblaciones de microorganismos promotores de crecimiento vegetal asociados a la rizosfera de uchuva. *Fitopatología colombiana.* Volumen 37 número 1 (suplemento). ISBN 0120-0143. 78p.

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

Cruz M., Hoyos L., Melgarejo L. 2011. Capítulo 5. Respuesta fisiológica de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims) frente al ataque por *Fusarium* spp. pp. 91-113. En: *Ecofisiología del cultivo de la gulupa (Passiflora edulis Sims)*. Melgarejo L. (Ed.). Editorial Produmedios. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.



Cruz M. 2013. Respuesta fisiológica y bioquímica de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) afectada por fusariosis (*Fusarium* sp.). Trabajo de grado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Cuellar N., Arrieta J. 2010. Evaluación de respuestas fisiológicas de la planta arbórea *Hibiscus rosasinensis* L, (Cayeno) en condiciones de campo y vivero. Corpoica Cienc. Technol. Agropecu. (11(1), 61-72.

Ezin V., De la Pena R., Ahanchede A. 2010. Flooding tolerance of tomato genotypes during vegetative and reproductive stages. Brazilian Journal of Plant Physiology. 22 (1): 131-142. 2010.

Fischer G. 1995. Effect of root zone temperature and tropical altitude on the growth, development and fruit quality of the cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). Tesis de doctorado. Universidad de Humboldt, Berlin, Alemania.

Fischer G., Miranda D. 2012. Uchuva (*Physalis peruviana* L.). pp. 851-870. En: Fischer G. (ed.). Manual para el cultivo de frutales en Colombia. Produmedios. Bogotá.

Flexas J, Medrano H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. Annals of botany. 89:183 – 189.

Freitas de Campos M., Carvalho K., Suano de Souza F., Marur C., Protasio Pereira L., Bessalho Filho J., Esteves Vieira L. 2011. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle' citrumelo plants over-accumulating proline. Environmental and Experimental Botany 72: 242–250.

Hong Bo S, Zong Suo L, Ming An S. 2006. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 47: 132–139.

Ideam. Boletín informativo sobre el monitoreo de los Fenómenos de variabilidad climática "El Niño" y "La Niña". Boletín número 42. Fecha de preparación: 09 de marzo de 2012. Consultado: 4 de Abril de 2012. En: [www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co).

Jaroszuk-Scisel J, Kurek E, Winiarczyk K, Baturo A, Lukanowski A. 2008. Colonization of root tissues and protection against *Fusarium* wilt of rye (*Secale cereale*) by non pathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Biological Control* 45: 297–307.

Jiménez J., Moreno L., Magnitskiy S. 2012. Respuesta de las plantas a estrés hídrico por inundación. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 6(1): 96-109.

Li C., Bai T., Ma F., Han M. 2010. Hypoxia tolerance an adaptation of anaerobic to hipoxia stress in two *Malus* species. *Scientia Horticulturae* 124: 274-279.

Kozłowski, T.T., Pallardy, S. 1997. *Physiology of woody plants*. 2a edition. Academic Press, Londres.

Melgarejo L. 2011. Ecofisiología vegetal y respuesta fisiológica al estrés en plantas tropicales. *Revista Comalfi*. 1: 95-103.

Melgarejo L. Romero M., Hernández S., Barrera J., Solarte M., Suárez D., Pérez L., Rojas A., Cruz M., Moreno L., Crespo S., Pérez W. 2010. Experimentos en fisiología vegetal. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Miranda D., Fischer G., Ulrichs C. 2010. Growth of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) plants affected by salinity. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83, 175-181.

Munné-Bosch S., Peñuelas J. 2003. Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. *Annals of Botany* 92: 385–391

Ortiz E. 2011. Etiología y caracterización patogénica de aislamientos de *Fusarium* asociados al cultivo de gulupa en la región del Sumapaz. Tesis de maestría en Ciencias Agrarias, línea de investigación en fitopatología. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Osorio, J. 2011. Ola invernal, tecnologías para recuperar el agro colombiano. Corpoica, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia.

Pabón J., Torres G. 2008. Impacto socioeconómico de los fenómenos El Niño y La Niña en la Sabana de Bogotá durante el siglo XX. Cuadernos de Geografía 16, 81-94.

Pascual I., Azcona I., Morales F., Aguirreolea J., Sánchez-Díaz M. 2010. Photosynthetic response of pepper plants to wilt induced by *Verticillium dahliae* and soil water deficit. Journal of Plant Physiology 167: 701–708

Pérez L., Melgarejo L. 2011. Capítulo 1. Caracterización ecofisiológica de la gulupa (*passiflora edulis* Sims) bajo tres condiciones ambientales en el departamento de cundinamarca respuesta. pp. 13-32. En: Ecofisiología del cultivo de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims). Melgarejo L. (Ed.). Editorial Produmedios. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

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

Ramírez M., Roveda G., Bonilla R., Cabra L., Peñaranda A., López M., Serralde D., Tamayo A., Navas G., Díaz C. 2008. Uso y Manejo de Biofertilizantes en el cultivo de la Uchuva. Roveda G, Ramírez M, Charry C, Ed. 58 p. Produmedios, Bogotá.

Rao R., Li Y. 2003. Management of flooding effects on growth of vegetable and selected field crops. HortTechnology 13(4): 610-616.

Sanchez-Díaz M., Aguirreolea J.. 2008. Capítulo 4. Absorción de agua por la raíz y transporte por el xilema. Balance hídrico de la planta. pp. 44. En: Fundamentos de fisiología vegetal. Azcón-Bieto J., Talón M. (Eds).. Segunda edición. Editorial McGraw Hill-Interamericana, Barcelona, España. 651 p.

Tadeo F., Gomez-Cadenas A. 2008. Capítulo 29: Fisiología de las plantas y el estrés (pp 577 – 586). En: Fundamentos de fisiología vegetal. Azcon-Bieto J. y Talón M. Segunda edición. Editorial McGraw Hill–Interamericana, Barcelona, España. 651 p.

Trigiano R., Windham M., Windham A. 2004 (Eds.). Plant pathology. Concepts and laboratory exercises. pp. 413.

Unger I., Kennedy A., Muzika RM. 2009. Flooding effects on soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 42: 1–8.

Waldhoff D, Furch B, Junk W. 2002. Fluorescence parameters, chlorophyll concentration, and anatomical features as indicators for flood adaptation of an abundant tree species in Central Amazonia: *Symmeria paniculata*. *Environmental and Experimental Botany* 48: 225-235.

Wei W., Li D., Wang L., Ding X., Zhang X., Gao Y., Zhang X. 2013. Morpho-anatomical and physiological responses to waterlogging of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Science* 208: 102–111.

Yang F., Wang Y., Wang J., Deng W., Liao L, Li M. 2011. Different eco-physiological responses between male and female *Populus deltoides* clones to waterlogging stress. *Forest Ecology and Management* 262: 1963–1971.

Yeboah M., Xuehao C., Feng C., Alfandi M., Liang G., Gu M. 2008. Mapping quantitative loci for waterlogging tolerance in cucumber using SRAP and ISSR markers. *Biotech.* 7 (2): 157-167.

Yin D., Chen S., Chen F., Guan Z., Fang W. 2010. Morpho-anatomical and physiological responses of two *Dendrothema* species to waterlogging. *Environmental and Experimental Botany* 68: 122-130.

Yiu J., Tseng M., Liu C. 2011. Exogenous catechin increases antioxidant enzyme activity and promotes flooding tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Soil*.

Zapata J., Saldarriaga A., Londoño M., Díaz C. 2005. Capítulo 6. Las enfermedades limitantes en cultivo y poscosecha de la uchuva y su control. pp. 97-110. En: *Avances en el cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (Physalis peruviana L.) en Colombia*. Fischer G., Piedrahita W., Miranda D., Romero J. (Eds). Editorial Unibiblos. Bogotá . 221 p.